

UCH-FC
DOC-Microbiología
E77

C.1 "Función del regulador transcripcional CbbR durante

la fijación de CO₂ en la bacteria biolixivante

Acidithiobacillus ferrooxidans"

Tesis presentada a la

UNIVERSIDAD DE CHILE

En cumplimiento de los requisitos para optar al grado de

Doctor en Ciencias

Mención en Microbiología

FACULTAD DE CIENCIAS



Por *Mario Rodrigo Esparza Mantilla*

Marzo, 2009

Directores de Tesis

Dr. David Holmes

Dra. Eugenia Jedlicki

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

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

MARIO RODRIGO ESPARZA MANTILLA

Ha sido APROBADA por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Enero del 2009.

Directores de Tesis:

Dr. David Holmes

Dra. Eugenia Jedlicki

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Romilio Espejo

Dr. Omar Orellana

Dr. Carlos Jerez



DEDICATORIA



- ✓ A ti mi señor que nos brindas la vida y la capacidad de contemplar el don de la Sabiduría porque todas tus obras son tuyas puesto que “el hombre no puede conocer toda la obra que se hace debajo del sol ya que por mucho que trabaje el hombre buscándola, no la hallará; y aunque diga el sabio que la conoce, no por eso podrá alcanzarla” (Eclesiastés 8:16-17).
- ✓ A mi abuela *Eumelia* que desde el cielo guía mis pasos.
- ✓ A mi mamá *Edith* y mi papá *Luis* que con tanto esfuerzo y sacrificio me han dedicado grandes momentos de felicidad.
- ✓ A mis hermanas Catherine y Sarita, mi hermano Jean, mis sobrinos Alessandro y Bárbara y a todos mis familiares que con su comunicación y apoyo siempre han estado presentes durante mi formación académica.
- ✓ A ti *Milagros* que con mucho Amor me brindas todo tu cariño y tiempo para vivir cada día.
- ✓ A ti *Santiago* que eres el fruto de esta unión y la continuidad de nuestros pasos.

BIOGRAFÍA DEL AUTOR



Mario Esparza Mantilla, nació el 3 de septiembre de 1977 en Trujillo, ciudad ubicada a 550 Km al norte de Lima, la capital del Perú. Durante su infancia estudió educación básica en la escuela “Antonio Raimondi” (1984-1989), luego en su adolescencia realizó sus estudios de educación media en el Colegio Nacional “San Juan” (1990-1994). Durante los años 1995-1996 se preparó académicamente para el ingreso a la Universidad. En agosto de 1996 inició sus estudios universitarios en la Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional de Trujillo (UNT). En la UNT participó como presidente del centro de estudiantes de Microbiología (1998) y fue miembro del Consejo de la Facultad de Ciencias Biológicas (1999-2000). Egreso de la UNT como bachiller en Ciencias Biológicas (2001). En abril del 2001 inició sus estudios de postgrado en ciencias y participó en docencia en la UNT. El 2002 realizó su Tesis en Microbiología Industrial, obteniendo el Título de Biólogo-Microbiólogo. En Julio del 2003 obtiene el grado de Magíster en Biotecnología y Bioingeniería y un mes después inició sus estudios de Doctorado en Microbiología en la Universidad de Chile con financiamiento otorgado por la Beca Alemana DAAD. Actualmente forma parte del equipo de investigación de Centro de Bioinformática y Biología Genómica de la Fundación Ciencia para la Vida en Santiago de Chile.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Chile y a los profesores del programa de Microbiología por brindarme la oportunidad de completar los estudios de Doctorado.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por la Beca de estudios de Doctorado en Microbiología y la Beca de estancia de Investigación en Alemania.

A la Fundación Ciencia Vida y Microsoft por brindarme financiamiento durante la redacción del informe de Tesis.

Al Dr. David Holmes y a la Dra. Eugenia Jedlicki por su amistad, enseñanzas y por la confianza que depositaron en la realización de esta Tesis.

Al Dr. Botho Bowien y a los integrantes de su laboratorio por brindar su colaboración y aportes científicos durante mi estancia de investigación en el Instituto de Microbiología de la Universidad de Göttingen-Alemania.

Al Dr. Claudio Vásquez de la Universidad de Santiago por su colaboración en la donación del vector de expresión pBAD-TOPO y al Dr. Edio Maldonado de la Universidad de Chile por la donación de los anticuerpos anti-Histag.

A los integrantes del laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Facultad de Medicina en la Universidad de Chile y del Centro de Bioinformática y Biología Genómica de la Fundación Ciencia Vida por su aporte de variada índole y brindarme siempre su amistad.

A mi esposa Milagros y mi hijo Santiago por su amor y brindarme su apoyo incondicional durante el desarrollo de esta Tesis y a mis familiares que a la distancia contribuyeron a darme el ánimo y alegría.

ÍNDICE DE MATERIAS



Carátula	i
Informe de aprobación	
Dedicatoria	ii
Biografía del autor	
Agradecimientos	iii
Índice de materias	iv
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Lista de abreviaturas	xiii
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La fijación de CO ₂ : mecanismos de asimilación e importancia	1
1.2. El ciclo de Calvin: fijación, transporte y almacenamiento de CO ₂	1
1.3. Organización de los genes del ciclo de Calvin	3
1.4. Regulación de los genes del ciclo de Calvin por CbbR	4
1.5. La región de control de los genes del ciclo de Calvin	6
1.6. Efecto de las señales metabólicas y medioambientales en la regulación mediada por CbbR	8
1.7. Antecedentes generales y fijación de CO ₂ en <i>A. ferrooxidans</i>	10



II. MATERIALES Y MÉTODOS	13
2.1. Material	13
2.1.1. Cepas bacterianas, plásmidos y partidores	13
2.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano	18
2.1.3. Reactivos	19
2.2. Métodos	20
2.2.1. Métodos Bioinformáticos	20
2.2.1.1. Reconstrucción metabólica de la fijación de CO ₂	20
2.2.1.2. Búsqueda de sitios de regulación para CbbR	21
2.2.2. Análisis de cotranscripción de los genes <i>cbb</i>	24
2.2.2.1. Aislamiento de RNA total de <i>A. ferrooxidans</i>	24
2.2.2.2. Ensayos de transcripción reversa por RT-PCR	24
2.2.3. Análisis de expresión en tiempo real de los genes <i>cbb</i>	24
2.2.4. Clonamiento de los promotores <i>cbb</i> en el vector pBK de fusión a <i>lacZ</i>	25
2.2.4.1. Preparación de DNA plasmidial a pequeña escala	25
2.2.4.2. Preparación de DNA cromosómico de <i>A. ferrooxidans</i>	26
2.2.4.3. Separación de DNA por electroforesis	26
2.2.4.4. Digestión de DNA	26
2.2.4.5. Desfosforilación de DNA plasmidial	27
2.2.4.6. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa	27
2.2.4.7. Reacción de amplificación de DNA por PCR	27
2.2.4.8. Diseño de partidores	28

2.2.4.9. Cuantificación de ácidos nucleicos	28
2.2.4.10. Ligación de fragmentos de DNA en plásmidos digeridos y desfosforilados	29
2.2.4.11. Construcción de la fusión plasmidial promotor <i>cbb::lacZ</i> en el vector pBK	29
2.2.4.12. Construcción de la fusión plasmidial promotor <i>cbb::lacZ</i> en presencia del gen <i>cbbR</i>	30
2.2.4.13. Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación y selección de clones	31
2.2.5. Secuenciación de DNA	31
2.2.6. Transferencia de DNA plasmidial por conjugación desde células de <i>E. coli</i> S17-1 a células de <i>R. eutropha</i>	32
2.2.6.1. Preparación de células de <i>E. coli</i> y <i>R. eutropha</i>	32
2.2.6.2. Conjugación bacteriana entre células de <i>E. coli</i> y <i>R. eutropha</i>	32
2.2.6.3. Selección de transconjugantes	32
2.2.7. Determinación de la actividad del promotor por análisis de la actividad específica de β -galactosidasa [EC 3.2.1.23]	33
2.2.8. Clonamiento y sobreexpresión de CbbR de <i>A. ferrooxidans</i> en <i>E. coli</i>	35
2.2.8.1. Visualización de las proteínas separadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida	36
2.2.9. Purificación de CbbR a partir de cuerpos de inclusión	37

2.2.10. Obtención de anticuerpos policlonales	38
2.2.10.1. Producción de anticuerpos anti-CbbR de <i>A. ferrooxidans</i>	38
2.2.11. Inmunodetección de proteínas por western blotting	39
2.2.12. Análisis de expresión de CbbR, CbbS y CbbP de <i>A. ferrooxidans</i> a diferentes concentraciones de CO ₂	40
2.2.13. Ensayos de complementación de la cepa <i>R. eutropha</i> HB14	41
2.2.14. Ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA)	41
2.2.15. Recursos materiales y financiamiento	43
III. RESULTADOS	44
3.1. Capítulo I. Reconstrucción metabólica de la fijación de CO ₂ en <i>A. ferrooxidans</i>	44
3.1.1. Identificación y caracterización de los genes <i>cbb</i> en <i>A. ferrooxidans</i>	44
3.1.2. Reconstrucción del ciclo de Calvin en <i>A. ferrooxidans</i>	46
3.1.3. Identificación de reguladores transcripcionales para los genes <i>cbb</i> en <i>A. ferrooxidans</i>	47
3.1.3.1. Búsqueda de genes <i>cbbR</i> en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	48
3.1.3.1.1. Caracterización del regulador CbbR de <i>A. ferrooxidans</i>	49
3.1.3.1.2. <i>A. ferrooxidans</i> posee un ortólogo adicional para CbbR	50
3.1.4. Caracterización de los operones <i>cbb</i> en <i>A. ferrooxidans</i>	51
3.1.4.1. Predicción de promotores para sigma 70, del inicio de la transcripción y de las secuencias de unión al ribosoma	51

3.1.4.2. Predicción del término de la transcripción en los operones <i>cbb</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	52
3.1.4.3. Los genes <i>cbb</i> de <i>A. ferrooxidans</i> se expresan formando cuatro unidades transcripcionales	53
3.2. Capítulo II. Efecto del CO ₂ en la expresión de mRNA y proteína de los genes <i>cbb</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	56
3.3. Capítulo III. CbbR regula los genes del ciclo de Calvin de <i>A.</i> <i>ferrooxidans</i>	60
3.3.1. Presencia de sitios de unión para CbbR en los promotores <i>cbb</i> de <i>A.</i> <i>ferrooxidans</i>	60
3.3.2. CbbR ^{AF} regula la expresión de los genes <i>cbb</i> de <i>A. ferrooxidans</i> presentes en <i>R. eutropha</i> HB14	62
3.3.3. CbbR de <i>A. ferrooxidans</i> permite el crecimiento de <i>R. eutropha</i> HB14 en presencia de CO ₂	64
3.4. Capítulo IV. CbbR de <i>A. ferrooxidans</i> se une específicamente a las secuencias TNA-N ₇ -TNA presentes en los promotores de los genes del ciclo de Calvin	66
3.4.1. CbbR ^{AF} se expresa eficientemente en <i>E. coli</i> y forma cuerpos de inclusión	66
3.4.2. CbbR ^{AF} forma oligómeros en solución	67
3.4.3. CbbR ^{AF} se une específicamente a los promotores <i>pcbbL1</i> , <i>pcbbL2</i> y <i>pcbb3</i> de <i>A. ferrooxidans</i> y al promotor <i>pcbbL</i> de <i>R. eutropha</i> H16	69

IV. DISCUSIÓN	71
4.1. Los genes <i>cbb</i> en <i>A. ferrooxidans</i> se organizan formando cuatro operones	72
4.2. El CO ₂ afecta la expresión de los genes <i>cbb</i> en <i>A. ferrooxidans</i>	77
4.3. CbbR de <i>A. ferrooxidans</i> funciona como regulador transcripcional de los genes del ciclo de Calvin	81
4.4. Modelo de la regulación de la fijación de CO ₂ por CbbR ^{AF} en la bacteria biolixivante <i>A. ferrooxidans</i>	84
V. CONCLUSIONES	88
VI. BIBLIOGRAFÍA	91
VII. ANEXOS	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Lista de cepas usadas en esta tesis	13
Tabla 2. Lista de plásmidos usados en esta tesis	14
Tabla 3. Lista de partidores usados en esta tesis	16
Tabla 4. Lista de aplicaciones y recursos bioinformáticos para el análisis de secuencias de DNA y proteínas	22
Tabla 5. Lista de los genes candidatos (y sus enzimas codificadas) involucrados en la fijación de CO ₂ en <i>A. ferrooxidans</i>	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Alineamientos de las secuencias de nucleótidos que corresponde a la región intergénica cromosomal entre los genes *cbbL* y *cbbR* de bacterias autótrofas 8
- Figura 2. Organización de los genes del ciclo de Calvin en *A. ferrooxidans* 46
- Figura 3. Reconstrucción metabólica del ciclo de Calvin en el quimioautótrofo *A. ferrooxidans* 47
- Figura 4. Caracterización de la estructura secundaria del regulador CbbR de *A. ferrooxidans* 50
- Figura 5. Predicciones para el inicio de la transcripción y las cajas -35 y -10 presentes en los promotores de los operones *cbb* de *A. ferrooxidans* 52
- Figura 6. Estructuras secundarias predichas para los terminadores transcripcionales tipo Rho independiente presentes en los operones *cbb* de *A. ferrooxidans* 53
- Figura 7. Análisis de la organización transcripcional de los genes *cbb* en *A. ferrooxidans* 55
- Figura 8. Efecto del CO₂ en la expresión de los genes del ciclo de Calvin en *A. ferrooxidans* 59
- Figura 9 Alineamiento de secuencias predichas para la unión de CbbR en las regiones de control de los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans* 61
- Figura 10. Actividades de los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans* en presencia y ausencia de CbbR^{AF} 63

Figura 11. Análisis de complementación en <i>R. eutropha</i> HB14 (<i>cbbR</i> ⁻) por el regulador transcripcional CbbR ^{AF} en condiciones litoautotróficas	65
Figura 12. Expresión heteróloga e inmunoblot de CbbR de <i>A. ferrooxidans</i>	67
Figura 13. Purificación de CbbR de <i>A. ferrooxidans</i>	68
Figura 14. Unión específica de CbbR de <i>A. ferrooxidans</i> a las secuencias TNA-N ₇ -TNA presentes en las regiones de control de los promotores <i>pcbbL1</i> , <i>pcbbL2</i> , <i>pcbb3</i> y <i>pcbb4</i> de <i>A. ferrooxidans</i> y del promotor <i>pcbbL</i> de <i>R. eutropha</i> H16	70
Figura 15. Mecanismo de regulación de los genes del ciclo de Calvin de <i>A. ferrooxidans</i> por la proteína CbbR ^{AF}	83
Figura 16. Modelo de la regulación de la fijación de CO ₂ por CbbR ^{AF} en <i>A. ferrooxidans</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>hyp3</i> ,	Gen que codifica para una proteína hipotética que integra el operón <i>cbb3</i>
Amp ,	Ampicilina
β-gal ,	β -galactosidasa
BD ,	Amortiguador de Diálisis
BSA ,	Seroalbúmina bovina
<i>can</i>	Gen que codifica para la anhidrasa carbónica
CbbG ,	Gliceraldehido-3P-dehidrogenasa
<i>cbbG</i> ,	Gen que codifica para CbbG
CbbL1 ,	Subunidad mayor de la RuBisCO copia 1
<i>cbbl1</i> ,	Gen que codifica para CbbL1
CbbL2 ,	Subunidad mayor de la RuBisCO copia 2
<i>cbbl2</i> ,	Gen que codifica para CbbL2
CbbP ,	Fosforribuloquinasa
<i>cbbp</i> ,	Gen que codifica para CbbP
CbbS1 ,	Subunidad menor de la RuBisCO copia 1
<i>cbbs1</i> ,	Gen que codifica para CbbS1
CbbS2 ,	Subunidad menor de la RuBisCO copia 2
<i>cbbs2</i> ,	Gen que codifica para CbbS2
CbbR^{AF} ,	Regulador transcripcional de los genes <i>cbb</i> en <i>A. ferrooxidans</i>
<i>cbbr^{AF}</i> ,	Gen que codifica para CbbR ^{AF}
CbbR^{RE} ,	Regulador transcripcional de los genes <i>cbb</i> en <i>R. eutropha</i>
<i>cbbr^{RE}</i> ,	Gen que codifica para CbbR ^{RE}
CIAP ,	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
COG ,	Cluster of Orthologous Groups
DTT ,	Ditiotreitol.
EDTA ,	Acido etilén diaminotetraacético
EMSA ,	Electrophoretic Mobility Shift Assays
gDNA ,	DNA genómico
Kb ,	kilobases
kDa ,	kilo Daltons
<i>lacZ</i> ,	Gen que codifica para la β -galactosidasa
LB ,	Luria Bertani
NADPH ,	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato + H
NCBI ,	The National Center for Biotechnology Information
nt ,	Nucleótidos
OD ,	Densidad óptica
ONPG ,	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
ORF ,	Open reading frame (Marco abierto de lectura)
PAGE ,	Poliacrilamide gel electrophoresis
<i>pcbbL1</i> ,	Promotor del operón <i>cbbl1</i> (RuBisCO copia 1)
<i>pcbbL2</i> ,	Promotor del operón <i>cbbl2</i> (RuBisCO copia 2)
<i>pcbb3</i> ,	Promotor del operón <i>cbb3</i>
<i>pcbb4</i> ,	Promotor del operón <i>cbb4</i>

pcbbR^{AF} ,	Promotor del gen <i>cbbR^{AF}</i>
pb,	Pares de bases
PCR,	The polymerase chain reaction
pI,	Punto isoeléctrico
PMSF,	Polimetilsulfonilfluoruro.
RBS,	Ribosome binding site
recA,	Gen que codifica para RecA
regA,	Gen que codifica para el regulador transcripcional RegA que integra un sistema de dos componentes que responde a señal para CO ₂
RNAP,	RNA Polimerasa
rrna16S,	Gen que codifica para el RNA ribosomal 16S
RT,	Transcripción reversa
RR,	Fragmento que contiene el gen <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> con su propio promotor
S,	Similitud
SD,	Shine Dalgarno
SDS,	Sodium dodecyl sulfate
TIGR,	The Institute for Genomic Research
X-gal,	5-bromo-4-cloro-3-indol-b-D-galactopiranosido

RESUMEN

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria que obtiene su energía de la oxidación de Fe^{2+} , azufre elemental, compuestos de azufre reducido (como tiosulfato y tetratiionato), hidrógeno y formiato. *A. ferrooxidans* usa esta energía para fijar CO_2 mediante el ciclo reductivo de la pentosa fosfato, conocido como ciclo de Calvin-Benson-Bassham (*cbb*).

Análisis bioinformáticos, basados en la secuencia completa del genoma de la cepa tipo ATCC 23270 identificaron cuatro grupos de genes *cbb*. Experimentos de RT-PCR demostraron que estos cuatro grupos de genes constituyen operones. Estos operones codifican para: (i) los componentes del carboxisoma y una de las copias de la RubisCO forma I (operón *cbbL1*), (ii) una segunda copia de la RubisCO forma I (operón *cbbL2*), (iii) enzimas del metabolismo central de carbono (operón *cbb3*) y (iv) una fosforribuloquinasa y enzimas del metabolismo del azufre (operón *cbb4*). La inspección bioinformática de la secuencia del genoma predijo además la presencia del gen *cbbR* que codifica para un regulador transcripcional tipo LysR. Este gen está localizado inmediatamente río arriba y en orientación divergente al operón *cbbL1*.

A. ferrooxidans es capaz de crecer en presencia de bajas (0.036%) o en altas concentraciones (2.5% a 20%) de CO_2 . La abundancia de los mRNAs de las dos copias de la RubisCO forma I disminuyó en presencia de altas concentraciones de CO_2 mientras que la abundancia del mRNA de *cbbR* aumentó en las mismas condiciones. Algoritmos bioinformáticos predijeron la presencia de putativos promotores tipo σ^{70} (denominados *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3*, *pcbb4* y *pcbbR*) río arriba de los cuatro operones *cbb* y también del gen *cbbR*. Se encontraron sitios de unión consensos TnA-N₇-TnA para CbbR asociados con

cada uno de los cinco promotores candidatos tipo σ^{70} .

Se utilizaron procedimientos estandarizados de biología molecular para construir plásmidos recombinantes que contenían *cbbR* y los promotores predichos *cbb* de *A. ferrooxidans*, los cuales fueron subsecuentemente transformados en la bacteria autótrofa *Ralstonia eutropha* HB14 que carece de *cbbR*. Los resultados sugirieron que CbbR de *A. ferrooxidans* incrementó la expresión de *pcbbL1* y *pcbbL2* pero disminuyó la expresión de *pcbb3*, *pcbb4* y *pcbbR* en el huésped heterólogo.

Ensayos en geles de retardo (EMSA), mostraron que CbbR se unió específicamente a los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3* y *pcbbR*, pero no al promotor *pcbb4*. Adicionalmente, CbbR fue capaz de: (i) complementar la función de *cbbR* de *R. eutropha* H16 (cepa silvestre) ya que mostró la capacidad de promover el crecimiento de *R. eutropha* HB14 en presencia de $H_2:CO_2:O_2$ [8.1.1] y (ii) unirse específicamente al promotor *pcbbL* de *R. eutropha* H16.

Es importante destacar que la proteína CbbR de una γ -proteobacteria quimioautótrofa obligada como es *A. ferrooxidans* fue capaz de funcionar como un activador de la expresión de los genes *cbb* en la bacteria autótrofa facultativa *R. eutropha* H16 (β -proteobacteria). Esto representa la primera demostración de actividad cruzada de CbbRs entre especies.

Se desarrolló un modelo en el cual CbbR regula la expresión de los genes *cbb*. Se sugiere que CbbR funciona como un activador de los operones de la RubisCO forma I y como un represor del operón *cbb3* y de si mismo (*cbbR*) (autorregulación negativa). Este modelo constituye un avance en nuestra comprensión de la fijación de CO_2 en bacterias quimiolitotótrofas y sirve como base para emprender investigaciones adicionales en la fijación de CO_2 y en el metabolismo central de carbono en *A. ferrooxidans*.

ABSTRACT

Acidithiobacillus ferrooxidans is a γ -proteobacterium that obtains energy by the oxidation of Fe^{2+} , elemental sulfur, reduced forms of sulfur (such as thiosulfate and tetrathionate), hydrogen and formate. It uses this energy to fix CO_2 by the Calvin-Benson-Bassham (*cbb*) reductive pentose phosphate cycle.

Bioinformatic analyses, based on the complete genome sequence of the type strain ATCC 23270, identified four *cbb* genes clusters. RT-PCR experiments demonstrated that the four gene clusters are operons. These operons are predicted to encode: (i) the components of the carboxysome and one of the copies of RubisCO form I (*cbbL1* operon), (ii) a second copy of RubisCO form I (*cbbL2* operon), (iii) enzymes of central carbon metabolism (*cbb3* operon) and (iv) a phosphorribulokinase and enzymes of sulfur metabolism (*cbb4* operon). In addition, bioinformatics examination of the genome sequence predicted the presence of a gene *cbbR*, encoding a LysR-type transcriptional regulator. This gene is located immediately upstream and in divergent orientation to the *cbbL1* operon.

A. ferrooxidans is able to grow in the presence of low (0.036%) or high (2.5% to 20%) CO_2 concentrations. The abundance of the mRNAs of both copies of the form I RubisCO decreased in high CO_2 concentrations while the abundance of mRNA for *cbbR* increased in the same conditions. Bioinformatic algorithms predicted the presence of putative σ_{70} -like promoters (termed *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3*, *pcbb4* and *pcbbR*) upstream of the four *cbb* operons and also the *cbbR* gene. The binding site consensus TnA-N₇-TnA for CbbR was discovered associated with each of the five candidate σ_{70} -like promoters.

Standard procedures of molecular biology were used to construct recombinant

plasmids containing *cbbR* and predicted *cbb* promoters from *A. ferrooxidans* that were subsequently transformed into the autotrophic bacterium *Ralstonia eutropha* HB14 that lacks *cbbR*. The results suggested that CbbR from *A. ferrooxidans* increased the expression of *pcbbL1* and *pcbbL2* but decreased the expression of *pcbb3*, *pcbb4* and *pcbbR* in the heterologous host.

Gel shift assays (EMSA) showed that CbbR binds specifically at the promoters *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3* and *pcbbR*, but does not bind the *pcbb4* promoter. Additionally, CbbR was able to: (i) complement the function of *cbbR* from *R. eutropha* H16 (wild strain) as shown by its ability to promote the growth of *R. eutropha* HB14 in the presence of H₂:CO₂:O₂ [8.1.1] and (ii) to bind specifically to the *pcbbL* promoter from *R. eutropha* H16.

Additionally, the CbbR protein of a chemoautotrophic obligate γ -proteobacterium (*A. ferrooxidans*) is able to function as an activator of *cbb* gene expression in a facultative autotrophic bacterium *R. eutropha* H16 (β -proteobacterium). This represents the first demonstration of cross-species activity of CbbR.

A model was developed in which CbbR regulates the expression of the *cbb* genes. It is suggested that CbbR functions as an activator of the RubisCO form I operons and as a repressor of both the *cbb3* operon and of itself (*cbbR*) (negative autoregulation). This model advances our understanding of CO₂ fixation in chemolithoautotrophic bacteria and serves as a basis for undertaking additional research into CO₂ fixation and central carbon metabolism in *A. ferrooxidans*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. La fijación de CO₂: mecanismos de asimilación e importancia

En la naturaleza el CO₂ es usado como fuente de carbono por la gran mayoría de organismos autótrofos. Estos organismos tienen un rol primordial en el ecosistema proporcionando un suministro continuo de carbono orgánico para los heterótrofos (Madigan y cols., 2006). Los mecanismos de asimilación de CO₂ más estudiados en autótrofos son: el ciclo reductivo de las pentosas fosfato (Ciclo de Calvin) (Bassham y Calvin, 1957), el ciclo reductivo de los ácidos tricarbóxicos (Evans y cols., 1966; Fuchs y cols., 1980) y el ciclo del 3-hidroxiacetato (Holo, 1989; Strauss y Fuchs, 1993; Hüglér y cols., 2003). El ciclo de Calvin-Benson-Bassham (Raven, 1996; Shively y cols., 2001) constituye la ruta ampliamente usada para la fijación de carbono. A pesar de su importancia global, este ciclo se restringe a los organismos quimioautótrofos o fotoautótrofos que presentan un alto rendimiento en la producción de energía. Algunos de estos microorganismos habitan en ambientes extremos, por ejemplo: en anaerobiosis, altas temperaturas o en condiciones muy ácidas (Fuchs y cols., 1980; Madigan y cols., 2006).

1.2. El ciclo de Calvin: fijación, transporte y almacenamiento de CO₂

La fijación CO₂ por el ciclo de Calvin (Kusian y Bowien, 1997) es dependiente de doce reacciones enzimáticas. Las enzimas principales del ciclo son: la Ribulosa bifsosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO) y la fosforribuloquinasa (CbbP). La RubisCO cataliza la carboxilación de ribulosa-1,5-bifsosfato para formar dos

moléculas de fosfoglicerato y la CbbP cataliza la regeneración de ribulosa-1,5-bisfosfato. Las demás reacciones enzimáticas del ciclo de Calvin son empleadas para la biosíntesis de hexosas a partir de fosfoglicerato, al mismo tiempo estas enzimas participan del metabolismo central de carbono (glicólisis/gluconeogénesis, biosíntesis de pentosas) (Kusian y Bowien, 1997).

En los organismos autótrofos la RubisCO se presenta en cuatro formas (I-IV) (Watson y cols., 1999; Hanson y Tabita, 2001). La forma I (CbbL) es la predominante en plantas, algas, cianobacterias y está presente en la mayoría de las bacterias quimioautótrofas. Esta enzima es un hexadecámero constituido por 8 subunidades grandes y 8 subunidades pequeñas (L_8S_8). La forma II (CbbM) de la enzima consiste en multímeros conformados por diferentes números de subunidades grandes (L_2 , L_4 y L_8) y está presente sólo en algunas bacterias autótrofas (English y cols., 1992; Cheng y cols., 1993; Cavanaugh y Robinson, 1995; Igarashi y Kodama, 1996). En el quimioautótrofo *Hydrogenovibrio marinus* la RubisCO forma I es la enzima dominante en una atmósfera de CO_2 al 2% mientras que la forma II se sintetiza en presencia de CO_2 al 10% (Toyoda y cols., 2005). Los microorganismos que sólo poseen la RubisCO forma III (arqueas) y IV (*Bacillus spp.* y algunas proteobacterias) son incapaces de fijar CO_2 (Shively y cols., 2001).

Para aumentar la eficiencia de la fijación de CO_2 por la RubisCO, las bacterias autótrofas obligadas y las cianobacterias usan los carboxisomas. Dentro del carboxisoma existe una anhidrasa carbónica, la cual asegura una adecuada disponibilidad de CO_2 para la RubisCO (Heinhorst y cols., 2006). En la bacteria *Thiobacillus neapolitanus* se ha descrito que en presencia de CO_2 atmosférico, las

células responden sintetizando elevadas cantidades de RubisCO las cuales son luego almacenadas dentro de los carboxisomas; pero en exceso de CO₂ la RubisCO es débilmente sintetizada y disminuye el porcentaje de carboxisomas (Shively y cols., 1998).

1.3. Organización de los genes del ciclo de Calvin

Los genes que codifican para las enzimas bacterianas que funcionan exclusivamente en el ciclo de Calvin son designados como genes *cbb* (Tabita y cols., 1992). Los genes *cbb* pueden estar localizados en plásmidos (*Oligotropha carboxidovorans*), en el cromosoma (lo más común) o en ambos (*Ralstonia eutropha*) (Bowien y Kusian, 2002). En distintas bacterias los genes *cbb* difieren en tamaño, organización y en algunas especies presentan duplicación. La organización más conservada de los genes *cbb* incluye a los genes que codifican para la forma I y forma II de la RubisCO. En algunos quimioautótrofos obligados los genes del carboxisoma (*csa*) residen inmediatamente río abajo de los genes *cbbL-cbbS* (*cbbLS*) y en autótrofos facultativos los genes *cbbLS* están seguidos por los genes que codifican para la fosforribuloquinasa (CbbP), fosfoglicolato fosfatasa (CbbZ) y las actividades restantes del ciclo de Calvin.

En la mayoría de las bacterias el gen *cbbR*, que codifica para un regulador transcripcional de la familia LysR, está localizado río arriba y de orientación divergente a los genes que codifican para RubisCO (*cbbLS* o *cbbM*). En *Thiobacillus denitrificans*, *H. marinus* y *Rhodobacter capsulatus* existe más de una copia funcional del gen *cbbR* (Dubbs y Tabita, 2003; Dubbs y cols., 2004; Toyoda y

cols., 2005; Beller y cols., 2006). La región intergénica entre el gen *cbbR* y *cbbL*, sirve como una región de control para la unión de la proteína CbbR la cual regula ambas unidades transcripcionales (Kusian y Bowien, 1997).

Actualmente se tiene escasa información acerca de las secuencias completas de los genes *cbb* para los quimioautótrofos obligados. Sólo se cuenta con información publicada de *T. denitrificans*, *H. marinus*, *Thiomonas intermedia*, *Nitrosococcus oceani*, *Thiomicrospira crunogena* (Toyoda y cols., 2005; Beller y cols., 2006; Scott y cols., 2006; Klotz y cols., 2006), las cuales indican que los genes *cbb* se agrupan en dos o tres probables operones en donde coexisten los genes de las formas I y II de la RubisCO, además de la presencia de dos a tres copias para el gen *cbbR*.

1.4. Regulación de los genes del ciclo de Calvin por CbbR

La asimilación de CO₂ por el ciclo de Calvin es un proceso que requiere de mucha energía, por tal razón las bacterias autótrofas han desarrollado dos mecanismos para el control de esta ruta: (1) regulación a nivel génico modulando la transcripción de los genes *cbb* y (2) regulación metabólica de las enzimas del ciclo de Calvin. Los antecedentes acumulados en autótrofos facultativos señalan que el metabolismo de CO₂ se regula a nivel de su asimilación y depende del regulador CbbR. La activación dirigida por CbbR parece ser un principio común en la regulación de operones *cbb* en la mayoría de proteobacterias autótrofas y es razonable asumir una conservación de las secuencias del promotor y sus relativas posiciones dentro de la región de control de los operones *cbb* en diferentes organismos (Umeda y cols., 1991; Tabita, 1995; Kusian y Bowien, 1997).

Las proteínas CbbR pertenecen a la familia de reguladores bacterianos tipo LysR (Schell, 1993). Estas proteínas se caracterizan por presentar tres dominios funcionales: un dominio amino terminal que contiene el motivo estructural de unión al DNA (hélice-vuelta-hélice), un dominio central y un dominio carboxilo terminal probablemente requerido en la multimerización (Bowien y Kusian, 2002). A estos reguladores se unen diferentes efectores de bajo peso molecular los cuales actúan como correguladores por inducción de cambios conformacionales en estas proteínas. El dominio central de varios de los reguladores está involucrado en la unión del efector (Dangel y cols., 2005).

La represión de las enzimas del ciclo de Calvin durante el crecimiento heterotrófico es una característica propia de los quimioautótrofos facultativos (Bowien, 1989). El organismo más estudiado es *R. eutropha* H16, en donde el operón *cbb* es fuertemente expresado en condiciones litoautotróficas (H_2 como fuente de energía), pero en heterotrofia (piruvato o fructosa como fuente de energía) se produce una parcial o completa represión (Kusian y Bowien, 1997). Por otra parte, en la bacteria fotoautótrofa *R. sphaeroides* la regulación de los genes *cbb* es más compleja por la presencia de dos operones *cbb* diferentes (*cbb_I* y *cbb_{II}*), los cuales son independientemente controlados por CbbR. En esta bacteria la RubisCO forma I es predominante en condiciones fotoautotróficas, mientras que la síntesis de la enzima forma II es relativamente favorecida durante el crecimiento fotoheterotrófico (Jouanneau y Tabita, 1986; Falcone y cols., 1988).

Mutaciones en el gen *cbbR* de *R. eutropha* (Windhoëvel y Bowien, 1991) y *Xanthobacter flavus* (Van den Bergh y cols., 1993) inactivan la expresión de los

operones *cbb* en estas bacterias. Un mutante en este gen en *R. sphaeroides* demostró que CbbR es requerido para la expresión del operón que codifica para la forma I de la RubisCO mientras que, en el operón de la forma II es parcialmente dependiente de CbbR (Gibson y Tabita, 1993). En *Cromatium vinosum* el producto del gen *cbbR* puede funcionar como activador y represor del operón *cbbLS* dependiendo de la disponibilidad de moléculas efectoras (Viale y cols., 1991).

La función de CbbR no sólo se limita a la regulación de operones *cbb* que codifican para RubisCO sino que también funciona como activador en la regulación del operón *cbbG-cbbK* (que codifica para gliceraldehido-3P-dehidrogenasa y para fosfoglicerato kinasa) en *X. flavus*. Según esto, el control de otros genes del metabolismo central de carbono es también integrado dentro de una red mayor de regulación (Meijer y cols., 1996). Sin embargo, a la fecha no se ha publicado información acerca de otros operones del metabolismo central del carbono que sean regulados por CbbR.

1.5. La región de control de los genes del ciclo de Calvin

Los reguladores CbbR se unen a las regiones del promotor en secuencias parcialmente simétricas que contienen el motivo T-N₁₁-A (N₁₁: indica separación de once nucleótidos), típicamente centrado cerca de la posición -65 río arriba del inicio de la transcripción del operón que regulan (Goethals y cols., 1992). Los alineamientos de las secuencias río arriba de los operones *cbb* de quimioautótrofos y fotoautótrofos presentan alta similitud entre las posiciones -30 y -70, relativas a los sitios conocidos del inicio de la transcripción.

La unión de CbbR a la región de control *cbbL* ha sido demostrada *in vitro* en *A. ferrooxidans* Fe1 (Kusano y Sugawara, 1993), *R. eutropha* (Windhoëvel y Bowien, 1991; Kusian y Bowien, 1995), *X. flavus* (van Keulen y cols., 1998) *R. sphaeroides* (Dubbs y cols., 2000), *R. capsulatus* (Vichivanives y cols., 2000), *Hydrogenophilus thermoluteolus* (Terazono y cols., 2001) y *H. marinus* (Toyoda y cols., 2005).

En *A. ferrooxidans* Fe1, CbbR se une en las posiciones -76 a -14 relativas al inicio de la transcripción del operón *cbbL* (Kusano y Sugawara, 1993), de la misma manera ocurre en *R. eutropha* en donde dichas regiones son similares y corresponden a las posiciones -76 y -27. Estas regiones se denominan regiones intergénicas de unión a CbbR (RI) y comprenden la región R (sitio de reconocimiento) y la región A (sitio de activación) del operador (Figura 1).

Cuando CbbR está en altas concentraciones, éste se une a una región extendida que abarca hasta la posición +13, denominada región extendida de unión (RE). La unión de CbbR a dos sitios independientes (RI-1 y RI-2) en *R. eutropha* es de manera cooperativa (Bowien y Kusian, 2002). Las relativas localizaciones de las RI en *R. eutropha* y su correspondiente contraparte en *A. ferrooxidans* Fe1 son muy similares a lo encontrado en otros sistemas regulatorios tipo LysR (Schell, 1993; Bowien y Kusian, 2002). La superposición del operador con la región -35 de los promotores regulados permite presumir la existencia de contactos entre las proteínas regulatorias y las subunidades de la RNA polimerasa, que son esenciales en los procesos de activación (Ishihama, 1993).

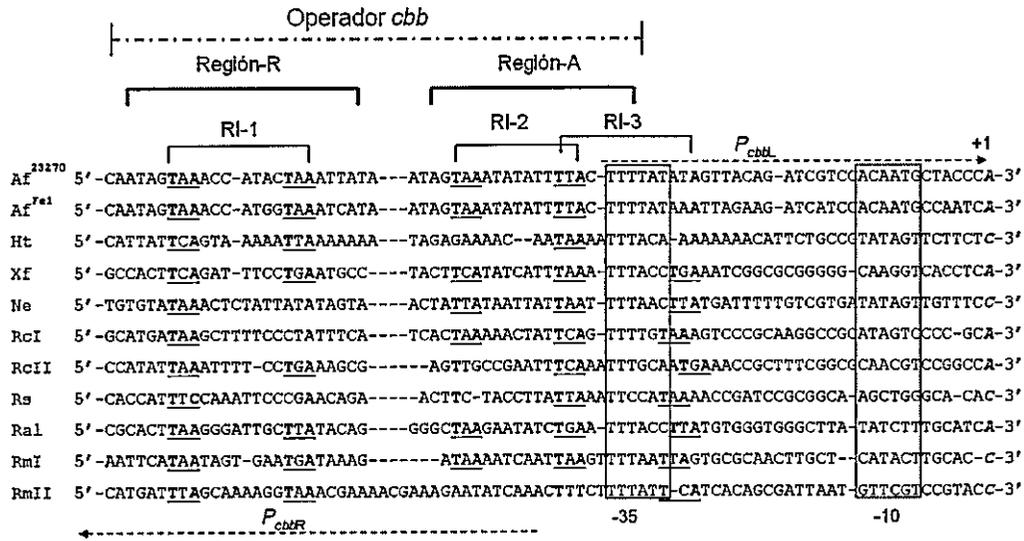


Figura 1. Alineamientos de las secuencias de nucleótidos que corresponde a la región intergénica entre los genes *cbbL* y *cbbR* de bacterias autótrofas. Las secuencias contienen los elementos de control *cbb* que comprende el operador, el promotor del operón *cbb* (p_{cbbL}) y el promotor *cbbR* (p_{cbbR}). El regulador CbbR se une tanto a la región R (sitio de reconocimiento) como a la región A (sitio de activación) del operador. Los nucleótidos conservados (TNA-N_{7/8}-TNA, T-N₁₁-A) para la unión de CbbR se localizan en las regiones intergénicas RI-1, RI-2 y RI-3. La predicción del promotor y los sitios de unión para σ^{70} se muestran en las columnas (secuencias -35 y -10). La posición del sitio de inicio de la transcripción se indica como +1, con el nucleótido en cursiva. Las bacterias se indican a continuación *A. ferrooxidans* (Af), *H. thermoluteolus* (Ht), *X. flavus* (Xf), *N. europea* (Ne), *R. capsulatus* (Rc), *R. sphaeroides* (Rs), *R. eutropha* H16 (RaI), *R. metallidurans* CH34 (Rm). I y II indican operón *cbb*_I y *cbb*_{II}. Af²³²⁷⁰ indica la cepa tipo de *A. ferrooxidans*.

1.6. Efecto de las señales metabólicas y medioambientales en la regulación mediada por CbbR

Un aspecto central concerniente al control de los operones *cbb* en varias bacterias autótrofas es la acción de señales metabólicas que son generadas intracelularmente en el metabolismo de carbono (Kusian y Bowien, 1997; Shively y cols., 1998). En efecto, la expresión de la RubisCO y otros genes del ciclo de Calvin en bacterias quimioautótrofas y fotoautótrofas responden a diferentes señales del

medio ambiente, incluyendo la concentración de CO₂ y la disponibilidad apropiada de carbono orgánico (Shively y cols., 1998; Tabita, 1999). De hecho, en *R. sphaeroides* (Phillips-Jones y Hunter, 1994; Eraso y Kaplan, 1995) y *R. capsulatus* (Sganga y Bauer, 1992; Mosley y cols., 1994) existe un sistema de señales de transducción de dos componentes RegB-RegA (Bauer, 1995) que tiene una significancia más global, el cual involucra el control de la asimilación de CO₂ con la fijación de N₂ (Joshi y Tabita, 1996; Qian y Tabita, 1996), en donde tanto CbbR como RegA son requeridos para la regulación positiva de los operones *cbb* (Qian y Tabita, 1996; Tabita, 2007).

Una señal metabólica para la expresión de los genes *cbb* en *R. eutropha* H16 lo constituye la concentración intracelular de fosfoenolpiruvato (PEP). El PEP es un producto indirecto del ciclo de Calvin que produce un control por retroalimentación de la ruta. El PEP actúa como un efector negativo de CbbR. A rangos fisiológicos (0,2-2,0 mM), el PEP se une a CbbR e inhibe la activación de la transcripción del operón *cbb* (Grzeszik y cols., 2000).

Por otra parte, en *X. flavus* se ha descrito que CbbR es un sensor del NADPH (van Keulen y cols., 1998), este cofactor se une a CbbR y forma el complejo CbbR^{NADPH}, el cual se une al operador *cbb* produciendo un dobléz en el DNA y la activación de la expresión de los operones *cbb* y *gap-pgk*. Adicionalmente, CbbR de *H. thermoluteolus* también interactúa con NADPH produciendo alteración en la unión de CbbR sobre el operador *cbb* (Terazono y cols., 2001).

Otras señales metabólicas distintas, a PEP y NADPH, pueden ser usadas en autótrofos que poseen varias proteínas CbbR las cuales interactuarían con diferentes

ligandos (Bowien y Kusian, 2002). En efecto, en los fotoautótrofos *R. sphaeroides* y *R. capsulatus*, la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), el sustrato de la RubisCO, constituye un efector positivo para CbbR.

1.7. Antecedentes generales y fijación de CO₂ en *A. ferrooxidans*

A. ferrooxidans es una γ -proteobacteria acidófila, mesófila, aerobia facultativa, capaz de utilizar Fe²⁺, azufre elemental, compuestos de azufre reducido como tiosulfato y tetrionato, formiato o hidrógeno como fuente de electrones y de energía para fijar CO₂ y N₂ (Eccleston y Kelly, 1978; Kelly, 1982; Holmes, 1998; Rawlings y cols., 1999; Ohmura y cols., 2002). Esta bacteria crece en condiciones de acidez extrema (pH: 1,6-3,5) y es uno de los microorganismos utilizados en la recuperación biológica de metales a partir de minerales azufrados (Rawlings y Silver, 1995; Holmes, 1998). *A. ferrooxidans* se ha convertido en el microorganismo modelo en biominería por ser la primera bacteria descrita capaz de solubilizar metales (Colmer y Hinkel, 1947) y una de las más importantes en el proceso de biolixiviación y como tal es la primera cuyo genoma ha sido secuenciado (Integrated Genomics y TIGR). Sin embargo, esta bacteria presenta una enorme dificultad para realizar trabajos genéticos y como alternativa para evaluar la función génica *in vivo* se requiere de un hospedero heterólogo (Liu y cols., 2000).

Para cubrir los requerimientos del crecimiento, *A. ferrooxidans* fija CO₂; para ello, esta bacteria necesita reducir grandes cantidades de CO₂ a carbono orgánico con un elevado consumo de energía de tal manera que para la fijación de una molécula de CO₂ requiere tres ATP y dos NADH (Eccleston y Kelly, 1978). En consecuencia,

cerca del 80% del ATP disponible es usado por el ciclo de Calvin y el ATP restante es requerido en la biosíntesis de hexosas para cubrir las demás funciones metabólicas (Forrest y Walter, 1971; Stouthamer, 1973; Kelly y cols., 1977).

A. ferrooxidans en su habitat natural y a nivel de laboratorio crece en presencia de CO₂ atmosférico (0,036%), sin embargo estudios fisiológicos y de aplicaciones en biominería (Makita y cols., 2004) han demostrado que es capaz de crecer en ambientes con exceso de CO₂ (1% al 15%) (Cadwell y cols., 2007) lo que permite obtener un mejor rendimiento del crecimiento (Holuigue y cols., 1987) y un incremento de la recuperación del metal biolixiviado (Torma y cols., 1972; Eccleston y Kelly, 1978; Hazeu y cols., 1986).

La existencia del ciclo de Calvin fue demostrada en *A. ferrooxidans* (Gale y Beck, 1967) y algunos de los genes involucrados en la fijación de CO₂, como los genes que codifican para la RubisCO forma I, se han clonado y caracterizado (Pulgar y cols., 1991; Kusano y cols., 1991). Río arriba de los genes *cbbLS1* se localiza de manera divergente el gen *cbbR* (Kusano y Sugawara, 1993; Heinhorst y cols., 2002; Cannon y cols., 2003). La presencia de la RubisCO forma I ha sido examinada en cultivos de *A. ferrooxidans* en Fe²⁺ o azufre con CO₂ atmosférico (Ramírez y cols., 2004; Appia-Ayme y cols., 2006) y con CO₂ al 1% (Cadwell y cols., 2007).

A la fecha, la información publicada de la regulación del ciclo de Calvin está centrada en la autotrofia facultativa sin tener mayores antecedentes de la regulación de este ciclo en autótrofos obligados. Además, los estudios conocidos de la regulación por CbbR han sido realizados *in vitro* y la función *in vivo* de CbbR sólo ha sido probada en algunos autótrofos facultativos. Bajo este panorama, algunas de

las preguntas de la autotrofia obligada requieren ser resueltas: (i) ¿Cómo están organizados los genes *cbb* en un autótrofo obligado?, (ii) ¿Cuál es el rol de CbbR en la regulación de los genes *cbb*?, y (iii) ¿Cómo afectan las concentraciones de CO₂ en la expresión de los genes *cbb* y de *cbbR*?. Por esta razón, el estudio detallado de la regulación de la fijación de CO₂ en *A. ferrooxidans* como modelo de autotrofia obligada podría favorecer al entendimiento del ciclo de Calvin, contribuyendo así al desarrollo de esta área fundamental de la biología.

A. ferrooxidans posee una gran diversidad metabólica, pero sin duda una línea primordial de investigación es la que intenta dilucidar los mecanismos implicados en la regulación de la fijación de CO₂ en autotrofia obligada. El presente trabajo de investigación planteó la hipótesis de que en *A. ferrooxidans* el regulador transcripcional CbbR controla la expresión de los genes del ciclo de Calvin. El objetivo general fue estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el control de la expresión de los genes de asimilación y metabolismo de CO₂ en *A. ferrooxidans* por CbbR, así como determinar el efecto del CO₂ en la expresión de los genes *cbb*. Los objetivos específicos fueron: (1°) establecer la organización transcripcional de los genes del ciclo de Calvin presentes en el genoma de *A. ferrooxidans*, (2°) evaluar el efecto de diferentes concentraciones de CO₂ en la expresión del regulador CbbR y (3°) determinar la funcionalidad de CbbR como regulador transcripcional de los genes *cbb* en *A. ferrooxidans*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Cepas bacterianas, plásmidos y partidores

Las cepas bacterianas, plásmidos comerciales y partidores usados durante el desarrollo de esta tesis se describen en las tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 1. Lista de cepas usadas en esta tesis

Cepas	Características relevantes	Referencias
<i>A. ferrooxidans</i>	Cepa tipo, su genoma completo está anotado en TIGR e Integrated Genomics	ATCC 23270
<i>R. eutropha</i>	Cepa tipo, su genoma completo está anotado en KEGG (sinónimo <i>Cupriavidus necator</i> H16)	
H16	Cfx ⁺ Hox ⁺ Fox ⁺ , pHG1 ⁺ , tipo silvestre	ATCC 17699
HB14	Cfx ⁻ Hox ⁺ Fox ⁺ , pHG1 ⁺ , <i>cbbRΔ</i> , derivada de la cepa H16	Jeffke (1999)
<i>E. coli</i>		
JW1	<i>ara Δ (lac-proAB) rpsL φ 80(lacZΔM15)</i> F' <i>(lacI^q lacZΔM15 proA⁺B⁺)</i>	Kolmar (1990)
S17-1 λpir	Sm ^r Tp ^r <i>mod1 res thi pro recA</i> ; integrated RP4 (Tc::Mu-Km::Tn7)	Simon (1983)
TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> φ80 <i>lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tabla 2. Lista de plásmidos usados en esta tesis

Plásmidos	Característica relevante	Referencia
pUC18	Amp ^r <i>lacPOZ9</i>	Yanisch (1985)
pAEC1200	pUC18::1.8-kb <i>HindIII-SalI</i> fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>R. eutropha</i> H16	Jeffke (1999)
pUW7	Tc ^r ; pVK101::1,031-bp <i>DdeI</i> fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>R. eutropha</i> H16	Windhövel (1991)
pBK	Tc ^r ; plásmido de fusión con <i>lacZ</i> (β -galactosidasa) y <i>gusA</i> (β -glucuronidasa) como genes reporteros	Kusian (1995)
pBK2241	pBK::236-bp <i>XbaI-PstI</i> fragmento que contiene la región del promotor <i>cbbL</i> de <i>R. eutropha</i> H16	Kusian (1995)
pGEMT [®]	Amp ^r promotor <i>lacZ</i>	Promega
pGEMT-RR	pGEMT::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis
pBAD-TOPO [®]	Amp ^r promotor <i>araBAD</i> (P _{BAD}) C-terminal: V5 epitope tag-polihistidina (6xHis)	Invitrogen
pBAD- <i>cbbR</i>	pBAD-TOPO::927-bp del fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 fusionado al tag 6xHis	Esta tesis
pBK-P <i>cbbL1</i>	pBK::209-bp <i>XbaI-PstI</i> fragmento que contiene la región del promotor <i>cbbL1</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	Esta tesis
pBK-P <i>cbbL2</i>	pBK::222-bp <i>XbaI-XbaI</i> fragmento que contiene la región del promotor <i>cbbL2</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	Esta tesis

Tabla 2. Lista de plásmidos usados en esta tesis (continuación)

Plásmidos	Característica relevante	Referencia
pBK-Pcbb3	pBK::218-bp <i>XbaI-XbaI</i> fragmento que contiene la región del promotor <i>cbb3</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	Esta tesis
pBK-Pcbb4	pBK::218-bp <i>XbaI-PstI</i> fragmento que contiene la región del promotor <i>cbb4</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	Esta tesis
pBK-PcbbR	pBK::198-bp <i>XbaI-PstI</i> fragmento que contiene la región del promotor <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	Esta tesis
pBK-PcbbL1/RR	pBK-PcbbL1::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis
pBK-PcbbL2/RR	pBK-PcbbL2::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis
pBK-Pcbb3/RR	pBK-Pcbb3::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis
pBK-Pcbb4/RR	pBK-Pcbb4::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis
pBK-PcbbR/RR	pBK-PcbbR::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis
pBK/RR	pBK::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis
pBK2241/RR	pBK2241::1.1-kb fragmento que contiene <i>cbbR</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con su propio promotor	Esta tesis

Tabla 3. Lista de partidores usados en esta tesis

Operón <i>cbbL1</i>					
gen		Partidor 5'-3'	gen		Partidor 5'-3'
<i>cbbR</i>	1fw	CAACGCCGTGTTGCTCGAA	<i>cbbL1</i>	2rev	CTAGACTTTTTTTACGGCCATGCTT
<i>cbbL1</i>	3fw	CTGCCAATCGTGTGCGCGC	<i>csoS2</i>	4rev	CGCACGGGAAAGCGACTT
<i>csoS2</i>	5fw	CCTATGGTGCCGTGCCAAC	<i>csoS3</i>	6rev	GTGCATGACGCACGCCC
<i>csoS3</i>	7fw	GTCAGCGGGTCAAAGCCG	<i>csoS1B</i>	8rev	GCCGCCTTGGTCATCG
<i>csoS1B</i>	9fw	GGAGCAGATGCGTGTGAGCG	<i>parA</i>	12rev	CTGATCGAACCCCTGAGGATCGG
<i>bfrA</i>	10fw	CGCGCAGAAGAGTTACAAGCCTTG	<i>parA</i>	11rev	AGTAGAACCCCGCCGAGCCAA
<i>parA</i>	13fw	GTGCTGCGGTTGAAGGGGT	<i>recQ</i>	14rev	GTGGAGTTCGATAATGGCGGAG
<i>recQ</i>	15fw	CGAGAAGCCTCCGCCATTATC	<i>cbbQ</i>	16rev	GCCTGTGGGTCTTTTCAGCAT
<i>cbbO</i>	19fw	GCAGAGGCTGCCAGAAAAGCT	<i>cbbO</i>	17rev	CAGGGATTTCAGGCTGGTFCG
<i>cbbO</i>	18fw	TGACGCCAGGAAAGCGGTG	<i>cbbA</i>	20rev	AAGCACCTACCGCGTATCCGT
<i>bioD</i>	22fw	ACTGGTTGGCGTGGTGTCTGA	<i>bioD</i>	21rev	CAGTGCCACC GCCACCC
			<i>sua5</i>	23rev	GCCATATGCACGATCAGCGG

Operón <i>cbbL2</i>					
gen		Partidor 5'-3'	gen		Partidor 5'-3'
<i>tatC</i>	1fw	ACGACGGCGTCTAGAACCGCC	<i>cbbL2</i>	2rev	CCGGTAATFCCTCTAGACCCGCGTT
<i>cbbL2</i>	3fw	CATCGAGAAGGAAGGCAAGGC	<i>cbbS</i>	4rev	CGCAACCTGTTGACGGATCTG
<i>cbbS</i>	5fw	ACCGGAAAACGCCTTCGGC	<i>cbbQ</i>	6rev	GGTCAATGGGCCATCCTGCC
<i>cbbQ</i>	7fw	AGGGTGTGAGGGCAAGGCC	<i>cbbO</i>	8rev	GTACGATGGGCGTGTGCCG
<i>cbbO</i>	9fw	GCCTACAGCGAGGAGGCCATG	<i>yfeA</i>	10rev	GCGGAGCCTTGTCCTCGG

Operón <i>cbb3</i>					
gen		Partidor 5'-3'	gen		Partidor 5'-3'
<i>hyp2</i>	1fw	TACGAAGGCGGCTCCCCG	<i>hyp3</i>	2rev	CGACGGCAATCGGAGTCTTT
<i>hyp3</i>	3fw	CGGGTGATCGCGCTGGAT	<i>cbbT</i>	4rev	CAGAATGCCGTCGTGACCA
<i>cbbT</i>	5fw	ATCGGCATCGACCACTTT	<i>cbbK</i>	6rev	TCCATCATACGCAGGACA
<i>cbbK</i>	7fw	CCTACATCAGTACGGGTG	<i>cbbA</i>	9rev	CACCTGCTCCAGTTGTT
<i>pyrA</i>	8fw	TTGATCCTCATACCATCGG	<i>cbbE</i>	11rev	GATATGGATATAGTCGGCACCC
<i>cbbA</i>	10fw	GCAGGCCAGCAAGATCAA	<i>trpE</i>	14rev	GCCGACAAGGGAGTATCGA
<i>trpE</i>	12fw	CTATCGAACTGGAAGTGGATGG	<i>trpG</i>	16rev	CGATAGCCGCCACGTCG
<i>cbbZ</i>	13fw	TCGGCGATTACGTAACG	<i>trpC</i>	17rev	AGGGCCACTGCCGCTGC
<i>trpE</i>	15fw	GAAACCATGAACAAACGCCG			

Operón <i>cbb4</i>					
gen		Partidor 5'-3'	gen		Partidor 5'-3'
<i>ompA</i>	1fw	GGTATTTCTATTTTTGGGGTGGC	<i>sahA</i>	3rev	CGGCAATGCGGACTTCCTTAC
<i>metK</i>	2fw	TTGGGAGCGGACCGACAAG	<i>metF</i>	5rev	AAGCATACTCGGGACCCAAGG
<i>sahA</i>	4fw	CTTCGCGGGGGTGCTGA	<i>cbbP</i>	7rev	GACGGGATGTTTTTTGGACATGG
<i>metF</i>	6fw	CACCGAGCCTGCATTTTTACACC	<i>ynbD</i>	9rev	GGCTACAGCCACCACGGGAT
<i>cbbP</i>	8fw	ATGTTGCCGGGCAGTTTTATGTC	<i>fbnA</i>	10rev	GCGAGTGGACTGGACGGA

Tabla 3. Lista de partidores usados en la tesis (continuación)

qRT-PCR			
gen	Partidor directo 5'-3'	gen	Partidor reverso 5'-3'
<i>cbbS1</i>	GCATCGAGCATGTGGAGCCT	<i>cbbS1</i>	GCGGAACACCACAAAAGCG
<i>cbbS2</i>	TAGAACATAACCGAACCGGAAAACG	<i>cbbS2</i>	GCCCCGATAGACTACCAGGGAAG
<i>hyp3</i>	ATCAGGCCCTCATTCTGCAGC	<i>hyp3</i>	GATCCATCTGGCAGGTACACACC
<i>cbbG</i>	AGCACCACATCGTCTCCAACG	<i>cbbG</i>	GCTGGTGGGGATCATGCTCAT
<i>cbbP</i>	AGACACCATCCTGCGCCGTAT	<i>cbbP</i>	GCAGGAGGGTGGGGAAATTCT
<i>cbbR</i>	TCAGCCGCCGGAACACATA	<i>cbbR</i>	CAACGCCGTGTTGCTCGAA
<i>recA</i>	CACCGGTGGTAATGCCCTTAAAT	<i>recA</i>	ACACCGAGGTCCACCAGTTCCG
Clonamientos			
*prom	Partidor directo 5'-3'	prom	Partidor reverso 5'-3'
<i>pcbbR-XbaI</i>	CGGTAT TCTAGAA CTCCGGCCTCA	<i>pcbbR-XbaI</i>	GCAAGG CTGCAGG ACGGATAGA
<i>pcbbL1-XbaI</i>	CGGCAG TCTAGAT CTTGAGTTGGTGCC	<i>pcbbL1-XbaI</i>	CTCCGG CTGCAGACT TTTTTACGG
<i>pcbbL2-XbaI</i>	ACGACGGCG TCTAGA ACCGCC	<i>pcbbL2-XbaI</i>	CCGGTAAT CTCTAG ACCCGCGTT
<i>pcbb3-XbaI</i>	TCTAGAA CAGGGTCAGCTCCTGG	<i>pcbb3-XbaI</i>	TCTAGAGT CTTTGATCATGCGCC
<i>pcbb4-XbaI</i>	TTTGGGGTGGCA TCTAGA AGTCCT	<i>pcbb4-XbaI</i>	GGAAACGG CTGCAGG GTGAA
<i>pcbbL^{RE}</i>	GTCGATCTGCAACTGGCGAA	<i>pcbbL^{RE}</i>	GTGAT TCAGGTGCG TTTCATGC
pBK	TTTCCCACCAACGCTGATCA	pBK	GGATGTGCTGCAAGGCGATT
<i>cbbRfw</i>	TCTATCCGTCATGCAACCTTG	<i>cbbRrev</i>	GCGCCATTCTTTTACCATTG
pGEMT- <i>pcbbR</i>	CTAGACTTTTTTACGGCCATGCTT	pGEMT- <i>cbbR</i>	CCATTACTTCATTCTTGAGCG
pBAD	ATGCCATAGCATTTTTATCC	pBAD	GATTTAATCTGTATCAGG
EMSA (DNA ^{Biotina})			
prom	Partidor directo 5'-3'	prom	Partidor reverso 5'-3'
Bio- <i>pcbbL1</i>	CGGCAGCGAAGATCTTGAGTTGGTGCC	Bio- <i>pcbbL1</i>	CTCCGGCCTCATACTTTTTTACGG
Bio- <i>pcbbL2</i>	ACGACGGCGGCAAGCACCGCC	Bio- <i>pcbbL2</i>	CCGGTAATCCTTCACACCCGCGTT
Bio- <i>pcbb3</i>	CATTGAACAGGGTCAGCTCCTGG	Bio- <i>pcbb3</i>	ATCGGAGTCTTTGATCATGCGCC
Bio- <i>pcbb4</i>	TTTGGGGTGGCAGCAAGAAGT	Bio- <i>pcbb4</i>	GGAAACGGATTTCAGAGGTGAAAAG
Bio- <i>pcbbL^{RE}</i>	GTCGATCTGCAACTGGCGAA	Bio- <i>pcbbL^{RE}</i>	GTGAT TCAGGTGCG TTTCATGC

Los partidores usados para ensayos de cotranscripción por RT-PCR se agrupan en los operones *cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3* y *cbb4*; para los ensayos de RT-PCR en tiempo real se agrupan en qRT-PCR, los usados en experimentos de construcciones génicas se agrupan en clonamientos y los empleados en ensayos de movilidad electroforética se agrupan en EMSA. El (*) indica promotor, fw: partidor directo y rev: partidor reverso, RE: *R. eutropha*, Bio: Biotina.

2.1.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano

Para cultivar células de *A. ferrooxidans* se preparó el medio 9K suplementado con Fe^{2+} (pH 1,6) o azufre elemental (pH 3,5) como describe Yates y Holmes (1987) o el medio MM-azufre (pH 2,5). El medio MM se preparó según protocolo de Kusian y Bowien (1995). Los cultivos de *A. ferrooxidans* se incubaron a 30°C con agitación de 200 RPM. El crecimiento bacteriano se determinó por recuento directo en una cámara Petroff-Hausser. Las bacterias se colectaron en la fase de crecimiento semi-logarítmica mediante centrifugación a 10000 x g por 20 min a 4°C.

Para los cultivos de *Escherichia coli* se usaron los medios y condiciones de crecimiento descritos por Ausubel y cols. (1999): medios LB, SOC y SOB. Para preparar los medios sólidos LB, se agregó agar a una concentración de 1,5% p/v. En algunos casos, el medio LB se suplementó con antibiótico a la concentración apropiada (LBT: LB más tetraciclina 20 $\mu\text{g/ml}$, LBA: LB más ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$). Para la selección por expresión del gen *lacZ* se suplementó con IPTG a 0.5 mM y X-gal a 80 $\mu\text{g/ml}$. Para los cultivos de *R. eutropha* crecidos en heterotrofia se preparó MM-tetraciclina con piruvato (MMTP) al 0,2% final y para los cultivos crecidos en litoautotrofia se usó MMTL con NaHCO_3 0,05% (p/v) final y se llevó a atmósfera de 80% (v/v) de H_2 , 10% (v/v) de CO_2 y 10% (v/v) de O_2 . La mayoría de los medios antes detallados se esterilizaron por autoclave por 20 min a 15 atm. Sin embargo algunos componentes como el Fe^{2+} o azufre elemental se esterilizaron por filtración usando filtro de 0,2 μm o por tratamiento con etanol al 100%

respectivamente. Las distintas cepas de *E. coli* y las cepas de *R. eutropha* se incubaron a 37°C o 30°C según corresponda, con agitación constante hasta la concentración celular requerida. El crecimiento bacteriano se controló midiendo la turbidez en un espectrofómeto a DO₄₃₆ o DO₆₀₀. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 5000 x g a 4°C durante 10 min.

2.1.3. Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (USA): lisozima, BSA, ampicilina, TEMED, persulfato de amonio, bromuro de etidio, azul de Coomassie R250, DTT, 2-mercaptoetanol. El SDS se obtuvo de United States Biochemicals Co. (USA) y el reactivo de Bradford de BioRad. El azufre elemental, el sulfato de hierro II y el agua de calidad HPLC se obtuvieron de Merck. El ONPG (O-Nitrofenil-β-D-galactopiranosido) se adquirió de Fluka. La agarosa de ultra calidad se obtuvo de ROTH. El papel 3MM fue de Whatman y los filtros de nitrocelulosa BA85 de Schleicher and Shüell. La inmunodetección de proteínas se realizó con un kit de inmunodetección por quimioluminiscencia (Super Signal Chemiluminiscent Substrate Kit "Pierce"). El papel radiográfico y soluciones de revelado se adquirieron de Kodak.

Todas las endonucleasas de restricción utilizadas procedieron de Fermentas. La RNasa A fue de Boehringer Mannheim. Las enzimas T4 DNA ligasa y polinucleótido kinasa se obtuvieron de Invitrogen y de New England Biolabs. La fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP), la *Taq* DNA polimerasa, *Taq* DNA Elongasa (mezcla de *Taq* DNA polimerasa y DNA polimerasa de *Pyrococcus sp.*

GB-D) y los nucleótidos dATP, dCTP, dTTP y dGTP fueron de Fermentas y Gibco BRL.

Los marcadores de tamaño de DNA y de proteínas se obtuvieron de Fermentas. Para DNA se usó: fago λ digerido con *Pst*I, 1 kb DNA ladder, 50 y 100 pb DNA ladder y para proteínas se empleó el marcador preteñido de masa molecular.

Todas las sales, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron de grado analítico y procedieron de Sigma Co., Merck, Fluka o JT Backer. Los reactivos para medios de cultivo: triptona, extracto de levadura y agar, procedieron de Difco Laboratories.

2.2. Métodos

2.2.1 Métodos Bioinformáticos

2.2.1.1. Reconstrucción metabólica de la fijación CO₂

La vía de fijación de CO₂ en autótrofos se obtuvo de la base de datos KEGG (Kanehisa y cols., 2002). Las secuencias de aminoácidos derivadas de los genes que están involucrados en la asimilación de carbono se usaron para buscar por similitud los posibles genes candidatos existentes en la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 presente en base de datos Comprehensive Microbial Resource (CMR) (J. Craig Venter Institute, www.jcvi.org), ERGO y en GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers CP001219 y NC_011761. Se

empleó las herramientas TblastN o BlastP (Altschul y cols., 1997) usando los parámetros por defecto. Cuando el gen candidato fue identificado, su secuencia de aminoácidos se usó para confirmar la asignación de función mediante análisis de búsqueda por BlastP en la base de datos no redundante del NCBI. Únicamente el mejor resultado del BlastP bi-direccional (Valdés y cols., 2003) se aceptó como evidencia de haber encontrado un ortólogo putativo. Las secuencias de los genes candidatos y sus proteínas fueron luego caracterizadas mediante el empleo de herramientas bioinformáticas disponibles en la web (Tabla 4). La información de la organización genética de los genes *cbb* en *A. ferrooxidans* se obtuvo mediante los programas SoftBerry Gene Finding y Microbes online Gene Context (Tabla 4).

2.2.1.2. Búsqueda de sitios de regulación para CbbR

Las secuencias de unión T-N₁₁-A (ver Fig. 1) presentes en los promotores de los genes *cbb* de varios autótrofos (Kusian y Bowien, 1997) se usaron como molde para la búsqueda de los sitios de unión para CbbR en los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3*, *pcbb4* y *pcbbR* de *A. ferrooxidans*. Los análisis bioinformáticos permitieron caracterizar a los promotores (BPROM) y los sitios de unión para CbbR (FOOTPRINTER) (Tabla 4). Para cada promotor en estudio se caracterizó los sitios de unión -35 y -10 de la RNA polimerasa, el sitio de unión al ribosoma (SD), el inicio de la traducción (ATG) y las distancias relativas (pares de bases) entre el inicio de la transcripción y el primer codón de inicio de la traducción.

Tabla 4. Lista de aplicaciones y recursos bioinformáticos para el análisis de secuencias de DNA y proteínas

Aplicación web	Análisis y herramientas	Dirección en internet
NCBI	Búsqueda de genes y proteínas	www.ncbi.nlm.nih.gov
TIGR	Genómica y proteómica	www.tigr.org
ERGO	Genómica y proteómica	www.integratedgenomics.org
COG	Grupo de Genes Ortólogos	www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/index.html
SOFTBERRY	Alineamientos y predicciones	www.softberry.com/berry.phtml
KEGG	Rutas Metabólicas	www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.htm
BLASTP	Similitud	www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp
CLUSTAW	Alineamientos	www.ebi.ac.uk/ClustalW/
PROTPARAM	Parámetros de proteína	www.expasy.ch/tools/protparam.html
ORF FINDER	Predicción de ORFs	www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf
PRODOM	Dominios de Proteínas	http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/2004.1/html/form.php?CG=0
PROSITE	Sitios funcionales de Proteínas	www.expasy.ch/prosite
INTERPRO	Análisis de proteínas	www.ebi.ac.uk/interpro/
PFAM	Familias de Proteínas	www.sanger.ac.uk/cgi-bin/pfam

Tabla 4. Lista de aplicaciones y recursos bioinformáticos para el análisis de secuencias de DNA y proteínas (continuación)

Aplicación web	Análisis y herramientas	Dirección en internet
FOOTPRINTER	Motivos conservados en DNA	http://wingless.cs.washington.edu/htbin-post/unrestricted/FootPrinterWeb/FootPrinterInput2.pl
CONSENSO	Motivos consensos de DNA	www.bork.embl-heidelberg.de/Alignment/consensus.html
LOGO CONSENSO	Motivos consensos de DNA	http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi
FGENESB	Predicción de operones	www.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesb&group=programs&subgroup=gfindb
PROMOTOR PREDICTION	Predicción del promotor	www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
BPROM	Predicción del promotor	www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb
CLC-RNA Workbench	Predicción del terminador	www.clcrnaworkbench.com
MFOLD	Estructura 2ª del RNA	http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/mfold-simple.html
PAIRWISE	Alinear dos secuencias	www.ebi.ac.uk/emboss/align/
BLAST 2SEQ	Alinear dos secuencias	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi
MICROBES ONLINE	Contexto genético	http://www.microbesonline.org/

2.2.2 Análisis de cotranscripción de los genes *cbb*

2.2.2.1. Aislamiento de RNA total de *A. ferrooxidans*

El RNA total se aisló desde células de *A. ferrooxidans* en fase semi-logarítmica, siguiendo el protocolo de Quatrini y cols. (2005). Luego el RNA total se trató con deoxiribunucleasa I (DNase I-RNase free) fermentas según protocolo del proveedor.

2.2.2.2. Ensayos de transcripción reversa por RT-PCR

El ensayo de transcripción reversa acoplado a PCR para el análisis de cotranscripción de los genes *cbb* se realizó usando el sistema “one step RT-PCR” (QIAGEN) incluyendo los controles respectivos según protocolo del fabricante. Los partidores empleados para este experimento se describen en la Tabla 3. Cada pareja de partidores flanquean una región de genes contiguos presentes en cuatro putativos operones *cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3* y *cbb4*. Los ensayos de expresión por cotranscripción para cada par de partidores se realizaron en tubos independientes en presencia de RNA total o DNA genómico (control positivo) y se realizaron por duplicado. Como control de expresión constitutiva se empleo el gen *recA*.

2.2.3. Análisis de expresión en tiempo real de los genes *cbb*

Los análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR) se realizaron con pares de partidores específicos para los genes candidatos del ciclo de Calvin: *cbbS1*, *cbbS2*, *cbbG*, *cbbP* y *cbbR* (Tabla 3). El gen *recA* se usó como control interno de

expresión constitutiva como previamente fue descrito (Rivas y cols, 2005). El RNA total se obtuvo desde células de *A. ferrooxidans* crecidas hasta fase semi-logarítmica en presencia de diferentes concentraciones de CO₂ (2,5, 5, 10 y 20%). El cultivo control se creció únicamente con aire (CO₂ al 0,036%). El ensayo de transcripción reversa se realizó usando la transcriptasa reversa RevertAid™ H. Minus M-MuLV (Fermentas). EL cDNA sintetizado sirvió como molde para los ensayos de PCR cuantitativo incorporando IQ SYBR green supermix (Bio-Rad). Todas las reacciones se realizaron por duplicado a partir de RNA total de dos cultivos independientes. En el análisis de expresión para cada gen en estudio incluyó la desviación estándar. La abundancia relativa de los mRNAs de los genes *cbb* fue normalizada con respecto a la abundancia del mRNA del gen *recA* y los cálculos respectivos se realizaron con iQ™5 Optical System Software siguiendo protocolo del fabricante (Bio-Rad)..

2.2.4. Clonamiento de los promotores *cbb* en el vector pBK de fusión a *lacZ*

2.2.4.1. Preparación de DNA plasmidial a pequeña escala

Para la purificación del DNA plasmidial a pequeña escala se usó el sistema QIAGEN Plasmid Midi kit. Las células de *E. coli* se cultivaron con agitación toda la noche a 37°C y se colectaron por centrifugación a 12000 x g por 10 min. El DNA plasmidial se purificó según las indicaciones del proveedor.

2.2.4.2. Preparación de DNA cromosómico de *A. ferrooxidans*

Las bacterias se cultivaron en medio 9K suplementado con azufre hasta alcanzar una densidad de 10^8 cel/ml. Las células se colectaron por centrifugación a $12000 \times g$ por 20 min a 4°C y se lavaron con H_2SO_4 10 mM y en Tris 10 mM-EDTA 1 mM pH 8,0. La extracción del DNA cromosomal se realizó según protocolo descrito por Yates y Holmes (1987).

2.2.4.3. Separación de DNA por electroforesis

Las muestras de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa horizontales con bromuro de etidio $0,5 \mu\text{g/ml}$. La concentración de agarosa dependió del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. La electroforesis se realizó a 80 V por tiempos variables en amortiguador TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8,3, EDTA 1 mM) y el DNA se visualizó en un transiluminador de radiación UV. Los geles se fotografiaron con una cámara digital (Kodak Digital Science) y la imagen se procesó en el computador.

2.2.4.4. Digestión de DNA

El DNA a una concentración de $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, se digirió con enzimas de restricción utilizando 5 unidades de enzima por μg de DNA en las condiciones de tiempo, temperatura y fuerza iónica recomendada por los proveedores. Las reacciones enzimáticas se detuvieron por calentamiento a $65-70^\circ\text{C}$.

2.2.4.5. Desfosforilación de DNA plasmidial

Al digerir el DNA plasmidial con enzimas de restricción se generaron extremos 5' fosfato que debían ser eliminados para aumentar la eficiencia de unión del inserto. Para desfosforilar los plásmidos se utilizó fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP). Para ello el DNA se trató con 2 U de CIAP por pmol de extremo 5' fosfato en la solución amortiguadora (Tris-HCl 50 mM pH 9,3, MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 0,1 mM y espermidina 1 mM) y se incubó a 37°C por 60 min. La reacción se detuvo incubando a 65 °C por 30 min. El DNA desfosforilado se purificó según protocolo del proveedor (QIAGEN).

2.2.4.6. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

Para purificar los fragmentos derivados de reacciones de PCR o de digestiones con enzimas de restricción se utilizó el kit Wizard PCR Preps DNA Purification Systems (Promega Corp). La muestra de DNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó el trozo de gel que contenía la banda de DNA a purificar y se fundió a 65°C en un tubo de 1,5 ml. siguiendo el protocolo entregado por el proveedor. Luego el DNA se eluyó en agua ultrapura calidad HPLC Merck hasta alcanzar la concentración deseada.

2.2.4.7. Reacción de amplificación de DNA por PCR

La reacción se realizó en la solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl₂ 0,67 mM, dNTPs 0,3 mM cada uno, 1 µM de

oligonucleótidos y 0,04 U/ μ l de *Taq* DNA polimerasa. Se utilizó 1-100 ng de DNA molde. La reacción de PCR, para todos los partidores de la Tabla 3, consistió en una primera etapa de desnaturalización a 95°C por 5 min, seguida de 29 ciclos de: (1) desnaturalización a 94°C durante 30 s, (2) alineamiento del partidador durante 30 s a 57°C y (3) extensión del fragmento por la *taq* DNA polimerasa a 72°C durante un tiempo aproximado de 1 min por 1 kpb de DNA a sintetizar. Finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. El producto de amplificación se analizó por electroforesis en geles de agarosa.

2.2.4.8. Diseño de partidores

Los partidores utilizados en todas las reacciones de PCR (Tabla 3) se diseñaron utilizando el programa VECTOR NTI (Invitrogen). Este programa permitió analizar los partidores diseñados, estableciendo si éstos formaban estructuras secundarias no deseadas o si podían generar dímeros.

2.2.4.9. Cuantificación de ácidos nucleicos

Para cuantificar los ácidos nucleicos presentes en las diferentes muestras se utilizaron dos métodos: (1) cuantificación por absorbancia; se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración de ácidos nucleicos considerando que una $DO_{260} = 1$ corresponde a 50 μ g/ml de DNA de doble hebra, 40 μ g/ml de DNA de 1 hebra o RNA (Sambrook y cols., 1989) y (2) cuantificación utilizando el marcador de DNA Ladder 100 bp Fermentas. Se

realizaron diluciones de la muestra de DNA a cuantificar y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa junto a cantidades conocidas del marcador. Se comparó la intensidad de la banda del DNA con una de tamaño similar del marcador. Las muestras de DNA plasmidial fueron previamente linealizadas por digestión con la enzima de restricción adecuada.

2.2.4.10. Ligación de fragmentos de DNA en plásmidos digeridos y desfosforilados

Para obtener los plásmidos recombinantes se utilizó la enzima T4 DNA ligasa Invitrogen. El plásmido digerido con la enzima de restricción apropiada fue desfosforilado y purificado desde columna (QIAGEN). Luego se mezcló con el inserto en una relación molar de ~1:2 (plásmido: inserto) en presencia de amortiguador Ligasa y 6 U de T4 DNA ligasa. La reacción se incubó a temperatura ambiente por dos horas.

2.2.4.11. Construcción de la fusión plasmidial promotor *cbb::lacZ* en el vector pBK

Los fragmentos de DNA correspondientes a los promotores de los operones del ciclo de Calvin (*pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3*, *pcbb4*) y del gen *cbbR* de *A. ferrooxidans*, se obtuvieron por amplificación por PCR a partir de DNA genómico usando partidores específicos (Tabla 3) con sitios *XbaI* y *PstI*. Estos fragmentos se clonaron en los sitios *XbaI* o *PstI* presentes en los plásmidos comerciales pUC18 o pGEMT y se transfirieron a células de *E. coli* JW1 para posteriores manipulaciones. Después el plásmido específico fue digerido con *XbaI*, y *PstI*, según el caso, para liberar el fragmento conteniendo el promotor respectivo. Luego este fragmento se

purificó desde columna (QIAGEN) y se clonó en el vector pBK de fusión a *lacZ* (Bowien y Kusian, 1995) previamente digerido con *XbaI-PstI* y desfosforilado con CIAP (Promega). Las fusiones en pBK generaron las siguientes construcciones: pBK-*PcbbL1::lacZ*, pBK-*PcbbL2::lacZ*, pBK-*Pcbb3::lacZ*, pBK-*Pcbb4::lacZ* y pBK-*PcbbR::lacZ* (Anexo 1).

2.2.4.12. Construcción de la fusión plasmidial promotor *cbb::lacZ* en presencia del gen *cbbR*

Para generar las construcciones del promotor *cbb* en presencia del gen que codifica para CbbR se procedió a amplificar por PCR el fragmento de DNA (~1,1 Kpb), que contiene la secuencia que codifica para el gen *cbbR* con su propio promotor (fragmento RR), a partir de DNA genómico de *A. ferrooxidans*. El fragmento RR se purificó desde columna (QIAGEN) y se clonó en el vector pGEMT easy (Promega) generándose el plásmido recombinante pGEMT-RR. La presencia del gen *cbbR* con su propio promotor se verificó por secuenciación.

El fragmento RR obtenido por digestión del plásmido pGEMT-RR con *EcoRI*, se insertó en el sitio *EcoRI* del vector pBK que contiene la fusión respectiva (*pcbb::lacZ*) y se generaron las siguientes construcciones conteniendo el gen del regulador CbbR con su propio promotor: pBK-*PcbbL1::lacZ/RR*, pBK-*PcbbL2::lacZ/RR*, pBK-*Pcbb3::lacZ/RR*, pBK-*Pcbb4::lacZ/RR* y pBK-*PcbbR::lacZ/RR* (Anexo 1).

2.2.4.13. Transformación de *E. coli* por electroporación y selección de clones

Cada una de las construcciones plasmidiales generadas en los pasos 2.2.4.11. y 2.2.4.12. se transfirió a cepas independientes de *E. coli* (JW1 y S17-1). Las electroporaciones se realizaron en el equipo Cell-Porator (Gibco BRL Life Technologies, INC). Las bacterias electrocompetentes (20-25 μ l) se mezclaron con 1 μ l de mezcla de ligación y se depositaron entre los electrodos de la cubeta. Se aplicó un pulso de 2,4 kV (25 UF, 330 Ω). Las muestras se transfirieron en forma estéril a un tubo de cultivo que contenía 1 ml de medio SOC. Las células se recuperaron incubando a 30°C o 37°C por 1 h, según el caso. Luego entre 50 a 200 μ l de cultivo celular se depositaron en placas de agar LBT y se incubaron toda la noche a la temperatura deseada. Las colonias obtenidas se evaluaron mediante PCR para definir la presencia y orientación del inserto. La identidad e integridad del fragmento clonado se verificó por secuenciación.

2.2.5. Secuenciación de DNA

Las muestras de DNA de los plásmidos pUC18 y pGEMTeasy que contenían los fragmentos de interés se secuenciaron en el centro de secuenciación del laboratorio de Genómica del Instituto de Microbiología de la Universidad de Göttingen-Alemania.

2.2.6. Transferencia de DNA plasmidial por conjugación desde células de *E. coli* a células de *R. eutropha*

2.2.6.1. Preparación de células de *E. coli* y *R. eutropha*

Cada una de las cepas de *E. coli* S17-1 (Simon y cols., 1983) que contenían los plásmidos pBK con su respectiva fusión del promotor *cbb::lacZ* se crecieron en medio nutritivo a 37°C durante toda la noche con agitación constante hasta alcanzar una $DO_{600} \sim 1,5$.

R. eutropha H16 o *R. eutropha* HB14 se crecieron en medio MMTP a 30°C hasta la fase exponencial tardía. Luego un inóculo de 1 ml de células se sembró en 20 ml de medio nutritivo y se incubó a 30°C toda la noche con agitación constante hasta alcanzar una $DO_{600} \sim 1,5$.

2.2.6.2. Conjugación bacteriana entre células de *E. coli* y *R. eutropha*

Las células donantes (*E. coli* S17-1) y receptoras (*R. eutropha*), preparadas como se describió en el paso anterior, se mezclaron en una proporción de 1:1 en 2 ml de la suspensión bacteriana total y se incubó sin agitación por 12 horas a temperatura ambiente.

2.2.6.3. Selección de transconjugantes

Un inóculo de 100 μ l de mezcla de células conjugantes de *E. coli* S17-1 y *R. eutropha* se añadió a 900 μ l agua destilada estéril y se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} . Una alícuota de 100 μ l de cada suspensión se sembró por

diseminación en placas con medio MMTP. Posteriormente cada placa se llevo a incubación durante tres días a 30°C. Las colonias que crecieron en el medio selectivo MMTP fueron las células que portan el vector pBK (resistencia a tetraciclina) con la construcción respectiva y que metabolizan el piruvato en presencia del medio de sales minerales, tales células correspondieron a transconjugantes de *R. eutropha*. El análisis de los clones consistió en la identificación del inserto, mediante PCR de colonias.

2.2.7. Determinación de la actividad del promotor por análisis de la actividad específica β -galactosidasa [EC 3.2.1.23]

Los clones que portaban las construcciones del promotor *cbb::lacZ* (construcción en ausencia del gen *cbbR*) y promotor *cbb::lacZ/RR* (construcción en presencia del gen *cbbR*) se usaron para el análisis de la actividad específica β -galactosidasa. Para ello, se cultivaron células de *E. coli* JW1 en medio LBT y células de *R. eutropha* en medio MMTP, MMTF o MMTL. Las cepas de *E. coli* JW1, *R. eutropha* H16 y *R. eutropha* HB14 se cultivaron independientemente por triplicado en matraces de 500 ml con 50 ml de medio de cultivo con un inóculo inicial de $DO_{436} \sim 0,1$ y se incubaron a 30°C con agitación constante de 180 R.P.M hasta alcanzar una $DO_{436} \sim 2,5$. Para cada cultivo se procedió como sigue: se centrifugó 25 ml de cultivo a 8000 x g, 10 min a 4°C. Las células se lavaron en amortiguador β -galactosidasa a 4°C, pH 7,0 (componentes en g/l: 16,1 de $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$, 5,5 de $NaH_2PO_4 \times 1H_2O$, 0,75 de KCl, 0,246 de $MgSO_4$ y β -mercaptoetanol a concentración final de 3,5 mM) y se centrifugó a 8000 x g, 5 min

a 4°C. Luego se resuspendieron las células en 0,5 ml de amortiguador β -galactosidasa y se sonicaron por 7 min, a pulso continuo del 50% con una amplitud de 0,5 Hertz en baño de hielo a 0°C. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 20000 x g por 15 min a 4°C. El extracto celular se colocó en un tubo estéril en hielo. El ensayo para cada cultivo se realizó por triplicado en tubos de 2 ml. Se adicionó 990 μ l de amortiguador β -galactosidasa y 10 μ l de extracto celular. Se mezcló por inversión e incubó a 37°C por 2 min. Luego se agregó 200 μ l de sustrato ONPG (*o*-Nitrofenil- β -D-galactopiranosido) al 0,2% en amortiguador β -galactosidasa. La reacción se detuvo con 500 μ l de Na₂CO₃ cuando se observó la presencia de un color amarillo pálido y se anotó el tiempo transcurrido. Después, se extrajo 1 ml de la reacción final y se analizó a DO₄₂₀. La concentración de proteínas presentes en el extracto celular se determinó según la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976); para ello, 10 μ l de extracto celular se adicionaron a 990 μ l de reactivo de Bradford, se mezcló por inversión e incubó 5 min a temperatura ambiente, luego se analizó a DO₅₉₅ y se cuantificó la concentración de proteínas según la curva estándar para la BSA. La actividad específica β -galactosidasa se cálculo según la fórmula propuesta por Dawson y cols. (1986):

$$\text{mU/mg} = \frac{E_{420} [\text{cm}^{-1}] 1,7[\text{ml}] 10^6}{21\ 300[\text{ml} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] T [\text{min}^{-1}] \text{Vol}[\text{ml}] Q[\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]}$$

E_{420} : medición de la DO_{420} , **T**: tiempo de duración de la reacción, **Vol**: volumen total para cuantificación de proteínas (1 ml), **Q**: concentración de proteínas según DO_{595} , **mU/mg**: mili unidades de actividad específica β -galactosidasa por mg de proteína.

2.2.8. Clonamiento y sobreexpresión de CbbR de *A. ferrooxidans* en *E. coli*

El fragmento de DNA que codifica para la proteína CbbR de *A. ferrooxidans* se obtuvo por amplificación desde DNA cromosomal utilizando los partidores *cbbRfw* y *cbbRrev* (Tabla 3). Luego el producto de amplificación se insertó al vector de expresión pBAD-TOPO (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El vector resultante pBAD-*cbbR*, conteniendo la fusión del gen *cbbR* al Histag (6xHis), se usó para transformar células de *E. coli* TOP10. La proteína de fusión recombinante se purificó como se indica: Se crecieron cultivos de *E. coli* TOP10 + pBAD-*cbbR* en LBA a 37°C hasta obtener una DO_{600} ~0,8-0,9, luego se adicionó arabinosa a una concentración final de 0,2% como inductor y se incubó a 37°C por 4 h adicionales. Posteriormente las células se centrifugaron a 5000 x g por 10 min. a 4°C y se lavaron en amortiguador con 50 mM tris-HCl pH 8,0, se resuspendieron en 200 μ l de amortiguador de lisis (tris HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM pH 8,0, tritón X-100 0,1 %, β -mercaptoetanol 20 mM y PMSF 1mM), en presencia de lisozima a una concentración final de 0.1 mg/ml, se mantuvo en hielo por 30-45 min y se procedió a romper las células por sonicación dando 5 pulsos de 15 segundos a 50 Watt de potencia. El lisado celular obtenido se centrifugó a 20000 x g por 10 min a 4°C.

Tanto el sobrenadante (fracción soluble) como el precipitado (cuerpos de inclusión) obtenidos en esta etapa se analizaron por SDS-PAGE y la presencia de la proteína de fusión CbbR-Histag se detecto por western blotting con anticuerpos anti-Histag.

2.2.8.1. Visualización de las proteínas separadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida

La fracción soluble y los cuerpos de inclusión se sometieron a electroforesis en geles de poliácridamida en presencia de SDS preparado como se describe en Sambrook y cols. (1989). Las muestras se prepararon en solución de carga Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5% v/v y se calentaron a 100°C durante 5 min. Luego se sometieron a electroforesis en geles de poliácridamida en amortiguador Tris 25 mM pH 8,3, glicina 0,25 M, SDS 0,1% a 150 V durante 90 min. Posteriormente los geles se lavaron durante 5 min en agua destilada y se tiñeron en solución de tinción durante 20 min (preparada por disolución de 0,2 g de azul brillante R250 en 30 ml de metanol seguido de la adición de 10 ml de ácido acético glacial y 60 ml de agua destilada). Finalmente se destiñeron los geles en metanol 20% y ácido acético glacial 5%. Las bandas de proteína correspondientes a CbbR-Histag se visualizaron en un transiluminador y se fotografiaron para su documentación.

2.2.9. Purificación de CbbR a partir de cuerpos de inclusión

Se siguió la técnica descrita por Dangel y cols., (2005) con algunas modificaciones y que consistió básicamente a la fase descrita a continuación: un cultivo de 1.5 l de *E. coli* TOP10 + pBAD-*cbbR* se creció aeróbicamente en LBA a 37°C hasta una $DO_{600} \sim 0,8$. Después se indujo la expresión de *cbbR* por la adición de arabinosa (0.1% final), seguida de agitación constante e incubación adicional de 12 horas a 37°C. Luego se recolectaron las células por centrifugación y se resuspendieron en amortiguador de lisis desnaturalante pH 7,8 (Gu-HCl 6M, NaCl 500 mM y amortiguador fosfato 20 mM) con agitación rotatoria por 1 hora a temperatura ambiente. El lisado celular se centrifugó a 20000 x g a 7°C por 30 min. Se recuperó el sobrenadante (extracto total celular desnaturalado: ETD) y se colocó en un frasco de vidrio estéril. Los pasos siguientes del tratamiento desnaturalante se realizaron a temperatura ambiente. Paralelamente una resina de Ni-NTA (QIAGEN) se empaco en columna (Farmacia^R 50 cm x 4 cm) y equilibrada con amortiguador de unión desnaturalante pH 7,8 (urea 8 M, NaCl 500 mM y amortiguador fosfato 20 mM) según protocolo del proveedor. Posteriormente el ETD se pasó dos veces por la resina y luego se pasó amortiguador de unión desnaturalante pH 7.8. Después se adicionó amortiguador de lavado desnaturalante pH 6.0 (urea 8 M, NaCl 500 mM y amortiguador fosfato 20 mM). Los pasos siguientes de renaturación de la proteína se realizaron a 4°C. En la misma columna, se agregó amortiguador de lavado nativo pH 8,0 (50 mM $NaH_2PO_4 \cdot xH_2O$, 300 mM NaCl y 20 mM Imidazol) y luego se eluyó la proteína en presencia de amortiguador de elución nativo pH 8,0 (50 mM $NaH_2PO_4 \cdot xH_2O$, 300 mM NaCl y 250 mM de

imidazol) y se recolectaron fracciones de 1 ml en tubos estériles. Luego para cada fracción se midió la DO_{280} y se cuantificó la cantidad de proteína eluída por el método de Bradford. Las fracciones con mayor concentración de CbbR-Histag se agruparon y se sometieron a doble diálisis a 4°C contra amortiguador BD (Hepes 50 mM, KCl 200 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, PMSF 0.05 mM y Glicerol 50%) a pH 7,8 estéril. Se verificó la pureza de la proteína CbbR-Histag por electroforesis en geles de SDS-PAGE. Finalmente la proteína CbbR-Histag se cuantificó por el método de Bradford y se almacenó a -20°C.

2.2.10. Obtención de anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti-CbbP (fosforribuloquinasa) y anti-CbbS (subunidad pequeña de RubisCO) de *R. eutropha* H16 fueron proporcionados por el Dr. Botho Bowien del laboratorio de Fisiología Microbiana del Instituto de Microbiología y Genética de la Universidad de Göttingen, Göttingen, Alemania. Los anticuerpos anti-Histag fueron proporcionados por el Dr. Edio Maldonado del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

2.2.10.1. Producción de anticuerpos anti-CbbR de *A. ferrooxidans*

La proteína CbbR-Histag previamente purificada (~1 mg/ml) se sometió a emulsión en adyuvante incompleto de Freund (primera dosis) y luego se inoculó vía sanguínea (vena marginal de la oreja) y subcutánea en un ejemplar de *Oryctolagus cuniculus* raza *Californian giant* (conejo doméstico) de dos meses de edad. Cada una de las siguientes cuatro dosis se prepararon en adyuvante completo

de Freund e inoculadas en intervalos de 15 días. La primera sangría se realizó antes de la primera inoculación de CbbR-Histag (suero pre-immune), luego se realizaron cuatro sangrías, después de tres días de cada inoculación de CbbR-Histag en los intervalos antes mencionados. El suero conteniendo los anticuerpos anti-CbbR-Histag se separó de la sangre por centrifugación a 8000 x g por 10 min a 4°C, se alícuotó y almacenó a -20°C. La reactividad del suero pre inmune y del suero con anticuerpo anti-CbbR-Histag se analizó por western blotting utilizando entre 20 ng a 100 ng de proteína CbbR-Histag.

2.2.11. Inmunodetección de proteínas por western blotting

Se utilizó el sistema de quimioluminiscencia "Pierce" que consiste en la generación de luz como producto de una reacción química. El extracto de proteínas de las muestras bacterianas respectivas, se sometió a separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS preparado como se describe en Sambrook y cols. (1989). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó en una solución de transferencia 10% (ácido bórico 500 mM, NaOH 190 mM, pH 9,0), etanol 20%, SDS 0,1% y se aplicó una corriente de 350 mA durante 1,5 h. La membrana se bloqueó con 0,1 ml/cm² de leche al 1% en TBS/T (Tris-HCl a 20 mM pH 7,6, NaCl a 137 mM, Tween 20 a 0,1% v/v) incubando 0.5 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó con TBS/T tres veces por 10 min y se incubó con antisuero policlonal (anticuerpo primario) diluido 1/1000 en TBS/T durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se lavó tres veces durante 10 min en TBS/T.

Posteriormente se incubó con anticuerpo secundario (anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa, diluido 1/20000 con TBS/T) por 30 min con agitación lenta. Luego se lavó la membrana tres veces durante 10 min en TBS/T. La reacción de quimioluminiscencia se desarrolló sobre la membrana mezclando iguales volúmenes de los sustratos reactantes como lo indica el fabricante (Pierce) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó sobre la membrana una película autorradiográfica Kodak y se reveló la reacción en cuarto oscuro siguiendo las instrucciones del proveedor Kodak.

2.2.12. Análisis de expresión de CbbR, CbbS y CbbP a diferentes concentraciones de CO₂

Las proteínas totales de *A. ferrooxidans* se obtuvieron desde fase semi-logarítmica en cultivos crecidos en 9K-azufre con diferentes concentraciones de CO₂ externo (0,036, 25, 5, 10 y 20 %). La preparación de extractos celulares de *A. ferrooxidans* fue realizada como previamente fue descrito (Levican y cols, 2007). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford usando suero de albúmina bovina como estándar (Bradford, 1976). La cantidad a evaluar de proteínas totales obtenidas desde células crecidas en una determinada concentración de CO₂ fue la misma, para ello se cargó ~20 µg de proteínas totales en cada carril de un gel de SDS-poliacrilamida. Luego, las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE y se siguió el análisis para CbbR, CbbS y CbbP por western blotting usando anticuerpos anti-CbbR, anti-CbbS y anti-CbbP respectivamente.

2.2.13. Ensayos de complementación de la cepa *R. eutropha* HB14

El vector pGEMT-RR que contiene la secuencia que codifica para *cbbR* con su propio promotor fue digerido con *EcoRI* para liberar el fragmento RR. Luego este fragmento se insertó en el sitio *EcoRI* del vector pBK generando pBK-RR. El vector pBK-RR fue transferido a células de *E. coli* S17-1. Se realizó un ensayo de conjugación entre *E. coli* S17-1 + pBK-RR (cepa dadora) y *R. eutropha* HB14 (cepa receptora). Las células transconjugantes se seleccionaron en medio MMTP. Luego *R. eutropha* HB14 + pBK-RR se incubó en presencia de H₂:O₂:CO₂ [8:1:1] en placas de agarosa ultra calidad (ROTH) con MMTP a 30°C por 10 días. Como controles se usaron a *R. eutropha* HB14 + pBK (control negativo), *R. eutropha* HB14 + pUW7 (expresa *cbbR* de *R. eutropha*) (Jeffke y cols., 1999) y *R. eutropha* H16 + pBK como cepa silvestre (controles positivos).

2.2.14. Ensayos de retardo de la movilidad eletrofóretica (EMSA)

Se amplificó por PCR los fragmentos correspondientes a la región del promotor conteniendo los sitios de unión predichos para CbbR presentes en los promotores de los operones del ciclo de Calvin: *pcbL1* (221 pb), *pcbL2* (241 pb), *pcb3* (218 pb), *pcb4* (238 pb) de *A. ferrooxidans* y del promotor *pcbL* (238 pb) de *R. eutropha* a partir de DNA genómico usando los pares de partidores específicos marcados con biotina (Metabion) en el extremo 5' (Tabla 3). El ensayo de retardo se efectuó según Kusano y Sugawara (1993) en 17 µl de amortiguador A [HEPES-NaOH 12 mM pH 7,9, Tris-HCl 4 mM pH 7,9; EDTA 1 mM, KCl 60 mM; DTT 1 mM; BSA 5 mg/ml; glicerol 10% v/v; DNA competidor no específico (DNA de

esperma de salmón 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ o poly(dI-dC) 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$] con las siguientes modificaciones: se usó sonda específica marcada con biotina (~ 20 pM) y CbbR de *A. ferrooxidans* purificado (~ 290 μM). Para cada promotor a evaluar se realizaron cuatro reacciones por duplicado tal como sigue: (1) sin CbbR, (2) con CbbR, (3) con CbbR más sonda no marcada en exceso (50X) y (4) con CbbR en presencia de anticuerpos específicos contra CbbR de *A. ferrooxidans*. Las reacciones de unión se incubaron a 30°C por 15 min. Los ensayos de “supershift” en presencia de anticuerpos se incubaron durante 15 min adicionales. Los productos de las reacciones se sometieron a electroforesis en geles no desnaturalantes de poliacrilamida al 4,8% (p/v) corridos a 77 V durante 1 h en amortiguador TBE 0,5X a temperatura ambiente. Luego los geles se colocaron junto a una membrana Nylon Biodyne^{PALL} en TBE 0,5X y se realizó la transferencia en cámara semiseca a 380-400 mA por 60 min. Después, la membrana se sometió a irradiación UV 312 nm por 10 min para entrecruzar el DNA presente. Para la detección de las sondas de DNA marcadas con biotina se usó el sistema quimioluminiscente LightShift® EMSA “Pierce” con streptavidina conjugada a peroxidasa. La membrana resultante fue expuesta a una película BioMax Light Film (Kodak), luego la imagen se visualizó bajo luz blanca y su análisis se documentó en el computador.

2.2.15. Recursos materiales y financiamiento

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1050063, la Beca DAAD y Microsoft Sponsored Research. Parte de los experimentos fueron realizados en los siguientes ambientes: (1) Laboratorio de Genética Bacteriana Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile a cargo de la Dra. Eugenia Jedlicki, (2) Centro de Bioinformática y Biología Genómica de la Fundación Ciencia para la Vida a cargo del Dr. David Holmes y (3) Laboratorio de Fisiología Microbiana del Instituto de Microbiología y Genética de la Universidad de Göttingen, Göttingen, Alemania a cargo del Dr. Botho Bowien.

III. RESULTADOS

3.1. Capítulo I. Reconstrucción metabólica de la fijación de CO₂ en la bacteria quimiolitautótrofa *A. ferrooxidans*

3.1.1. Identificación y caracterización de los genes *cbb* en *A. ferrooxidans*

Los genes candidatos y sus productos proteicos predichos, que potencialmente están involucrados en la asimilación y fijación de CO₂, se identificaron en la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mediante análisis bioinformáticos. Para ello, las secuencias de aminoácidos de las proteínas deducidas a partir de las secuencias nucleotídicas de los genes involucrados en el ciclo de Calvin en *A. ferrooxidans* se utilizaron para realizar análisis de similitud con sus respectivos ortólogos presentes en las bases de datos KEGG y NCBI. La predicción de dominios y motivos funcionales y su designación en el grupo de genes ortólogos (COG) se muestran en la tabla 5.

Los genes que codifican para la subunidad grande y pequeña de la RubisCO forma I se presentan en dos copias (Fig. 2). Los demás genes que codifican para las siguientes enzimas del ciclo son: fosforribuloquinasa (CbbP), fructosa-1,6-/seudoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (CbbF), gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (CbbG), fosfoglicerato kinasa (CbbK), pentosa-5-fosfato-3-epimerasa (CbbE), transcetolasa (CbbT), fosfoglicolato fosfatasa (CbbZ), y fructosa-1,6-/seudoheptulosa-1,7-bisfosfato aldolasa (CbbA).

Tabla 5. Lista de genes candidatos (y sus enzimas codificadas) involucrados en la fijación de CO₂ en *A. ferrooxidans*

Gen ^a	Actividad Enzimática Propuesta ^b	Mejor Blast hit ^c	%Sim ^d	Puntaje ^e	E-value ^f	Motivos ^g
<i>cbbL1</i>	Ribulosa bisfosfato carboxilasa subunidad grande forma I [EC: 4.1.1.39]	<i>Halothobacillus neapolitanus</i>	94	882	0	PD417314, PD0000044, Pfam00016, Pfam02788, COG1850
<i>cbbS1</i>	Ribulosa bisfosfato carboxilasa subunidad pequeña forma I [EC: 4.1.1.39]	<i>Methylococcus capsulatus</i>	80	161	8e-39	PD000290, Pfam00101, COG4451
<i>cbbQ1</i>	Oxido nítrico reductasa, proteína NorQ [EC:1.7.99.7]	<i>Nitrosomonas europaea</i>	92	489	5e-137	PD490543, Pfam08406; Pfam07728; COG0714; COG5271
<i>cbbO1</i>	Proteína CbbO activadora de la RubisCO	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	74	940	0	PD140693; PD679436; Pfam00092; COG4867; COG4548
<i>cbbL2</i>	Ribulosa bisfosfato carboxilasa subunidad grande forma I [EC: 4.1.1.39]	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	97	920	0	PD417314, PD0000044, Pfam00016, Pfam02788, COG1850
<i>cbbS2</i>	Ribulosa bisfosfato carboxilasa subunidad pequeña forma I [EC: 4.1.1.39]	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	88	203	3e-51	PD000290, Pfam00101, COG4451
<i>cbbQ2</i>	Oxido nítrico reductasa, proteína NorQ [EC:1.7.99.7]	<i>Nitrosomonas europaea</i>	92	483	6e-135	PD490543, PD372819, Pfam08406; Pfam07728; COG0714
<i>cbbO2</i>	Proteína CbbO activadora de la RubisCO	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	76	965	0	PD140693; PD025507; COG4548
<i>cbbF</i>	Fructosa-1,6-bisfosfatasa [3.1.3.11]	<i>Mariprofundus ferrooxydans</i>	71	823	3e-86	PD007014, PD863173, Pfam03320, COG1494
<i>cbbT</i>	Transcetolasa [2.2.1.1]	<i>Methylococcus capsulatus</i>	75	2264	0.0	PD308336, Pfam00456, Pfam02779, COG3959, COG0021
<i>cbbG</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [1.2.1.-]	<i>Burkholderia thailandensis</i>	82	1189	1e-128	PD959395, PD859695, Pfam02800, Pfam00044, COG0057
<i>cbbK</i>	Fosfoglicerato kinasa [2.7.2.3]	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	80	1296	6e-141	PD000619, PDA014E1, Pfam00162, COG0126
<i>pykA</i>	Piruvato kinasa [2.7.1.40]	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	79	1491	2e-163	PD983049; PD745602; Pfam00224; Pfam02887; COG0469
<i>cbbA</i>	Fructosa-bisfosfato aldolasa [4.1.2.13]	<i>Nitrosococcus oceanii</i>	90	1474	1e-161	PD875785, PD002376, Pfam01116, COG0191
<i>cbbE</i>	Ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa [5.1.3.1]	<i>Hermiminomonas arsenicoxydans</i>	80	753	2e-78	PD003683, PD591639, Pfam00834, COG0036
<i>cbbZ</i>	Fosfoglicolato fosfatasa [3.1.3.18]	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	64	484	4e-47	PD946755, PDA11895, Pfam00702, COG0546, COG0637
<i>cbbP</i>	Fosforribuloquinasa [2.7.1.19]	<i>Nitrosococcus oceanii</i>	78	402	2e-110	PD739884, PD015803, Pfam00485, COG3954

^aNombre propuesto para el gen según el banco de datos de genes (GeneBank). ^bActividad enzimática propuesta. ^cGen candidato presente en el organismo según el análisis del mejor Blast. ^dPorcentaje de similitud (% Sim) del gen candidato comparado con el gen del organismo encontrado en (c). ^ePuntaje del resultado por Blast. ^fValor E del resultado por Blast. ^gMotivos y dominios identificados en las proteínas candidatas. Pfam; Proteín families; PD; ProDom (Protein Domains).

responder a diferentes concentraciones intracelulares de metabolitos derivados del ciclo de Calvin, los cuales actúan como efectores de CbbR (Kusian y Bowien, 1997; Shively y cols., 1998). La segunda estrategia consiste en la regulación de los genes *cbb* y del transporte de CO₂ por un sistema de transducción de señales de dos componentes conformado por las proteínas RegB/RegA. RegB es una proteína histidina kinasa que responde a señales produciendo la fosforilación del regulador transcripcional RegA (Elsen y cols., 2004).

3.1.3.1. Búsqueda de genes *cbbR* en el genoma de *A. ferrooxidans*

El genoma de *A. ferrooxidans* presenta dos genes predichos para reguladores transcripcionales tipo LysR [*cbbR*₁ (AFE1393) y *cbbR*₂ (AF0939)] que se encuentran localizados de manera divergente a los genes *cbbL1* y *cbbM* (Fig.2). Esta organización constituye una característica genética altamente conservada con otras bacterias autótrofas, lo que sustenta que estos genes codificarían para potenciales reguladores CbbR.

Los análisis de la secuencia de aminoácidos de los reguladores CbbR de *A. ferrooxidans* mostraron que ambos comparten una identidad del 44% entre sí, además CbbR₁ de *A. ferrooxidans* comparte una identidad del 51 % con CbbR₁ de *R. capsulatus*, y CbbR₂ presenta una identidad del 53 % con CbbR₃ de *T. denitrificans*.

3.1.3.1.1. Caracterización del regulador CbbR de *A. ferrooxidans*

La secuencia de aminoácidos de la proteína CbbR₁ de *A. ferrooxidans* se usó para el análisis de búsqueda de motivos funcionales en la base de datos ProDom, Prosite e Interpro. Por otra parte, se realizó la predicción de la estructura secundaria para CbbR₁ usando la herramienta PSSFinder (www.softberry.com) y el alineamiento del dominio de unión a DNA entre CbbR₁ con otras proteínas CbbR de algunas bacterias autótrofas.

CbbR₁ de *A. ferrooxidans* posee 308 aminoácidos, un peso molecular estimado de 33,7 kDa y un punto isoeléctrico de 7,4. Además presenta tres dominios bien caracterizados. El dominio de unión a DNA (HTH, pfam00126, COG0583) que está localizado entre las posiciones 8 y 57 del extremo amino terminal, el dominio de oligomerización y el dominio de unión al efector, se encuentran ubicados en el extremo carboxilo terminal entre los residuos de aminoácidos 87 al 290 (Fig.4).

Los alineamientos del dominio HTH entre la proteína CbbR₁ de *A. ferrooxidans* con otras proteínas CbbR, muestran una alta conservación de residuos, lo que permite suponer que estos reguladores podrían unirse a una secuencia conservada de DNA (Fig. 4).

Los sitios de unión para CbbR (T-N₁₁-A) se localizan entre los promotores de los genes *cbbL-cbbR* y han sido bien caracterizados en varias bacterias autótrofas en donde CbbR activa la expresión de los genes para RubisCO y reprime su propia expresión (Kusian y Bowien, 1997). En *A. ferrooxidans* se encontró dos secuencias de unión en la región intergénica entre *cbbR₁-cbbL₁* (Fig. 2).

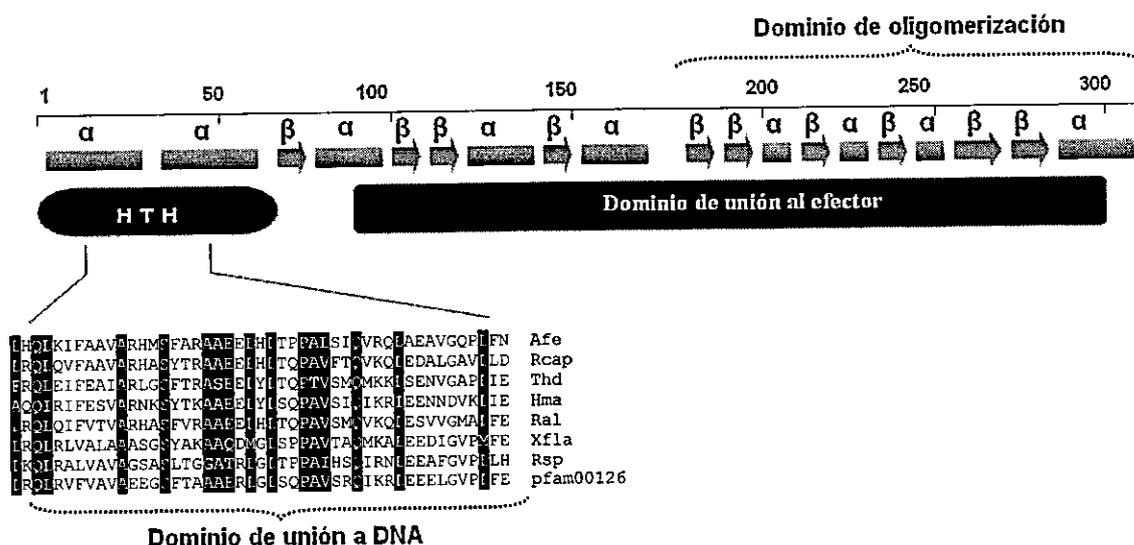


Figura 4. Caracterización de la estructura secundaria del regulador CbbR de *A. ferrooxidans*. En el extremo amino terminal se presenta la región de aminoácidos que conforman el dominio de unión a DNA (HTH: hélice vuelta hélice) y en el extremo carboxilo terminal se observa el dominio de oligomerización y el dominio de unión al efector. Los símbolos indican: α; estructura alfa hélice (barras grises) y β; estructura tipo hoja beta (flechas grises). En la parte inferior se observan los alineamientos múltiples del extremo amino terminal de los CbbRs en bacterias autótrofas. Las secuencias usadas corresponden a las siguientes bacterias: *A. ferrooxidans* (Afe), *R. capsulatus* (Rcap), *T. denitrificans* (Thd), *H. marinus* (Hma), *R. eutropha* H16 (Ral), *X. flavus* (Xfla) y *R. sphaeroides* (Rsp). pfam00126: indica el dominio conservado de unión a DNA de la familia de proteínas de los reguladores tipo LysR. La línea horizontal representa la secuencia completa de 308 aminoácidos de CbbR.

3.1.3.1.2. *A. ferrooxidans* posee un ortólogo adicional para CbbR

El segundo ortólogo de *A. ferrooxidans*, CbbR₂ es 44% idéntico al regulador CbbR₁. El ortólogo más similar disponible en la base de datos corresponde al regulador CbbR₃ de *T. denitrificans* con un 74% de similitud. La secuencia completa de aminoácidos para CbbR₂ de *A. ferrooxidans* posee 301 aminoácidos, un peso molecular de 33 kDa y un punto isoeléctrico de 7,3. El análisis de motivos predijo la presencia de un dominio HTH en el extremo N-terminal así como el dominio de unión al

efector en el extremo C-terminal, acordes con los presentes en todas las secuencias que forman la familia de reguladores tipo LysR.

3.1.4. Caracterización de los operones *cbb* en *A. ferrooxidans*

La caracterización de los operones *cbb* en *A. ferrooxidans* se basó en un grupo de criterios que se estableció a través de las comparaciones computacionales con otras predicciones para operones bacterianos conocidos y a través de trabajo experimental. En consecuencia, la predicción de promotores, de los sitios de inicio de la transcripción, la identificación de secuencias Shine-Dalgarno, la predicción de los terminadores Rho independiente y los análisis de cotranscripción entre genes contiguos, permitieron caracterizar detalladamente cada operón.

3.1.4.1. Predicción de promotores para sigma 70, del inicio de la transcripción y de las secuencias de unión al ribosoma

El programa BDGP (Neural Network Promoter Prediction) con un puntaje por defecto de 0,80 para promotores procariotas, predijo la presencia del sitio de inicio de la transcripción y de potenciales promotores para los operones *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3* y *pcbb4* de *A. ferrooxidans*. Para fortalecer dichas predicciones se validó el análisis de promotores con el programa BPROM (Prediction of bacterial promoters) y con la anotación de promotores para *A. ferrooxidans* disponible en el laboratorio. Posteriormente se identificó manualmente la secuencia de unión al ribosoma (secuencia Shine Dalgarno) en base al consenso descrito para *E. coli* (Fig. 5).

Promotor		Gen/ Operón	+1	Bacteria	Referencia
-35	-10				
ATAGTA	N ₁₇ -TATAGT	<i>cbbL1</i>	T	<i>A. ferrooxidans</i>	(Este estudio)
TAGCGC	N ₁₇ -TATAGT	<i>cbbL2</i>	A	<i>A. ferrooxidans</i>	(Este estudio)
TATAAG	N ₁₇ -TTACGA	<i>cbb3</i>	G	<i>A. ferrooxidans</i>	(Este estudio)
TCGCTT	N ₁₇ -TATAGT	<i>cbb4</i>	C	<i>A. ferrooxidans</i>	(Este estudio)
TCTGTA	N ₁₇ -TATATT	<i>cbbR₃</i>	T	<i>A. ferrooxidans</i>	(Este estudio)
TTTACC	N ₁₇ -TATCTT	<i>cbbL</i>	A	<i>R. eutropha</i> H16	(Jeffke y cols., 1999)
CCCACA	N ₁₅ -TATTCT	<i>cbbR</i>	C	<i>R. eutropha</i> H16	(Jeffke y cols., 1999)
CTGTTA	N ₁₉ -CATGAT	<i>cso</i>	C	<i>H. neapolitanus</i>	(Cannon y cols., 2003)

Figura 5. Predicciones para el inicio de la transcripción y las cajas -35 y -10 presentes en los promotores de los operones *cbb* de *A. ferrooxidans*. La región de nucleótidos que separa ambas cajas del promotor se representa por N. Las siglas *cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3*, *cbb4*, *cbbL* y *cso* corresponden a operones; *cbbR* y *cbbL* corresponden a gen.

3.1.4.2. Predicción del término de la transcripción en los operones *cbb* de *A. ferrooxidans*

La posibilidad de formar estructuras secundarias correspondientes a terminadores bacterianos Rho independientes (Nudler y Gottesman, 2002) fueron predichas a nivel de mRNA entre las regiones intergénicas de *cbbA* y *bioD* (operón *cbbL1*), *cbbO* y *yfeA* (operón *cbbL2*), *trpG* y *trpD* (operón *cbb3*), *ynbD* y *fbnA* (operón *cbb4*) (Fig. 6) mediante el uso del programa CLC-RNA workbench (material y métodos). Estos terminadores intrínsecos potenciales consisten de una horquilla seguida de nucleótidos de uracilo presentes en el transcrito.

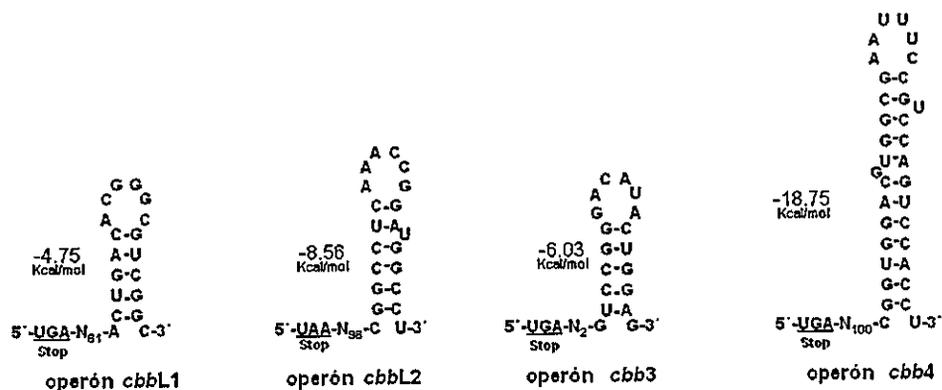


Figura 6. Estructuras secundarias predichas para los terminadores transcripcionales tipo Rho independiente presentes en los operones *cbb* de *A. ferrooxidans*. Se muestran las estructuras de horquilla entre los genes *cbbA* y *bioD* (operón *cbbL1*), *cbbO* y *yfeA* (operón *cbbL2*), *trpG* y *trpD* (operón *cbb3*), *recJ* y *fbpA* (operón *cbb4*). En el extremo 5' se indica el codón de término de la traducción (stop). La distancia del codón de término a la estructura secundaria del terminador transcripcional está representada por la separación de nucleótidos N_x ($x = n^\circ$ de nucleótidos).

3.1.4.3. Los genes *cbb* de *A. ferrooxidans* se expresan formando cuatro unidades transcripcionales

Con el fin de validar experimentalmente las predicciones bioinformáticas y determinar si los genes *cbb* conforman operones, se realizaron ensayos de cotranscripción usando como molde RNA total obtenido de *A. ferrooxidans* crecido en medio de cultivo en presencia de azufre. Los resultados muestran la obtención de fragmentos de DNA obtenidos desde experimentos de RT-PCR utilizando partidores adecuados (Tabla 3). En consecuencia, la cotranscripción entre los genes predichos bioinformáticamente fue demostrada para cada operón (Fig. 7). Se concluye entonces que los genes *cbb* de *A. ferrooxidans* forman cuatro unidades

transcripcionales tipo operón denominados *cbbL1* (16 genes), *cbbL2* (4 genes), *cbb3* (12 genes) y *cbb4* (7 genes) respectivamente.

El análisis de BlastP y motivos funcionales para las secuencias de aminoácidos derivada de cada gen *cbb* perteneciente a los operones *cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3* y *cbb4* se describió previamente (Tabla 5). Los genes adyacentes a los operones *cbb* que no forman parte de la misma unidad transcripcional se describen a continuación. El operón *cbbL1* está flanqueado por los genes *cbbR₁* y *bioD* (Fig 7A), los cuales codifican para el regulador transcripcional CbbR₁ y para dicitotina sintasa respectivamente. El operón *cbbL2*, por *tatC* y *yfeA* que codifican para una translocasa sec-independiente y diguanilato ciclasa (Fig. 7D); el operón *cbb3*, está flanqueado por una proteína hipotética (*hyp2*) y por el gen *trpD* (antranilato fosforribosil transferasa) (Fig. 7G) y el operón *cbb4*, por *ompA* (proteína de membrana externa) y *fbnA* (proteína de unión a fibronectina) (Fig. 7J).

Figura 7 (continuación). (A, D, G y J) Organización de los operones *cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3* y *cbb4* respectivamente. Los genes *cbb* se indican con las flechas amarillas, los genes del carboxisoma se indican con las flechas celestes. Los genes que no participan en el ciclo de Calvin se indican con flechas blancas. Los partidores (cabeza de flechas) flanquean los fragmentos esperados para los ensayos de PCR y RT-PCR. (B, E, H y K) Fragmentos de DNA amplificados por PCR utilizando DNA genómico (gDNA) como molde. (C, F, I y L) Fragmentos de DNA amplificados por RT-PCR utilizando RNA como molde. Los fragmentos de DNA se resolvieron en geles de agarosa 1,5%. Se usó marcadores de peso molecular 1 kbp y 100 bp.

3.2. Capítulo II. Efecto del CO₂ en la expresión de mRNA y proteína de los genes *cbb* de *A. ferrooxidans*

Según la literatura, *A. ferrooxidans* es capaz de crecer tanto en presencia de CO₂ atmosférico (0,036%) como a concentraciones de CO₂ del 1,0% al 15% (LaCombe y Lueking, 1990, Cadwell y cols., 2007; Makita y cols., 2004), sin embargo no se conoce si en esta bacteria tales concentraciones tienen algún efecto sobre la expresión de los genes involucrados en la fijación de carbono. Sin embargo, existen antecedentes en la bacteria autótrofa obligada *H. marinus* en donde el CO₂ al 15% afecta la expresión de los genes para RubisCO y CbbR (Toyoda y cols., 2005). Por tanto, en esta tesis se investigó el efecto de las concentraciones crecientes de CO₂ sobre la expresión de genes más importantes del ciclo de Calvin [genes de la RubisCO forma I (*cbbS1* y *cbbS2*) los cuales forman parte de los operones *cbbL1* y *cbbL2*; el gen *cbbG* que integra el operón *cbb3*, el gen *cbbP* que forma parte del operón *cbb4* y el gen del regulador transcripcional *cbbR*] en cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en medio 9K-S° a pH 3,5.

La abundancia relativa de los mRNAs de los genes del ciclo de Calvin fue determinada por transcripción reversa y PCR en tiempo real. Para ello, la

abundancia del RNA para todos los genes *cbb* evaluados se normalizó con la abundancia del RNA para el gen *recA*.

Los resultados (Fig. 8A) indicaron que cuando *A. ferrooxidans* creció en presencia de concentraciones elevadas de CO₂ (del 2,5 al 20%) cambio drásticamente la abundancia de los transcritos de los genes *cbb*. Por ejemplo, cuando se incrementó la concentración de CO₂, la abundancia de los transcritos de los genes fijación de carbono (*cbbS1* y *cbbS2*) disminuyó, mientras que la abundancia de los transcritos de los genes involucrados en el metabolismo (*cbbG*, *cbbP*) y regulación (*cbbR*) de CO₂ aumentó en la misma condición.

Al comparar la abundancia del mRNA, entre los genes para RubisCO (*cbbS1* y *cbbS2*) en concentraciones de 2,5% y 5% de CO₂, se observó que el transcrito para *cbbS1* fue dos a tres veces más abundante que el de *cbbS2* mientras que a concentraciones de 10% y 20% de CO₂, el transcrito del gen *cbbS2* fue dos veces más abundante que el gen *cbbS1*. En cambio los mRNAs para los genes *hyp3*, *cbbG* y *cbbP* fueron más abundantes en comparación con los mRNAs para los genes RubisCO, sin embargo la abundancia de los transcritos de los genes *hyp3* y *cbbG* disminuyó a concentraciones de CO₂ mayores a 2,5% mientras que la abundancia de los mRNAs para los genes *cbbP* y *cbbR* incrementó cuando *A. ferrooxidans* creció en presencia de mayores concentraciones de CO₂.

Los resultados de la expresión de proteínas para CbbR, RubisCO y CbbP demostraron que estas proteínas están presentes en todas las concentraciones de CO₂ evaluadas. No obstante la cantidad de cada una de ellas fue variable según el incremento de la concentración de CO₂. Por ejemplo, se observó una

menor cantidad de proteína CbbR en cultivos provenientes de CO₂ al 0,036%, pero hubo mayor cantidad de proteína en concentraciones del 2,5% a 20% de CO₂ (Fig. 8B). Al cuantificar estas señales, se observó que CbbR estuvo tres veces más abundante entre 2,5% a 5% de CO₂ y cinco veces más abundante entre 10% a 20% de CO₂ en comparación con la cantidad de CbbR presente en 0,036% de CO₂ (Fig. 8C).

Con respecto a la expresión de RubisCO (CbbS), se observó mayor cantidad de proteína en cultivos crecidos a baja concentración de CO₂ (0,036%) comparado con cultivos crecidos en altas concentraciones de CO₂. Por otro lado, se encontró mayor cantidad de proteína fosforribuloquinasa (CbbP) en cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos con CO₂ externo (2.5% al 20%) comparado con cultivos crecidos en CO₂ al 0,036% (Fig. 8B).

Agrupando los resultados se puede inferir que la concentración externa del CO₂ afecta la expresión del mRNA entre los genes *cbb* de *A. ferrooxidans* lo que sugiere que el CO₂ ejerce un efecto sobre la expresión génica a nivel transcripcional. Este resultado sugiere que cuando existe exceso de CO₂ externo en el habitat natural de *A. ferrooxidans*, esta bacteria responde disminuyendo la expresión de sus genes RubisCO forma I y aumentando la expresión de los genes *cbbG*, *cbbP* y *cbbR*.

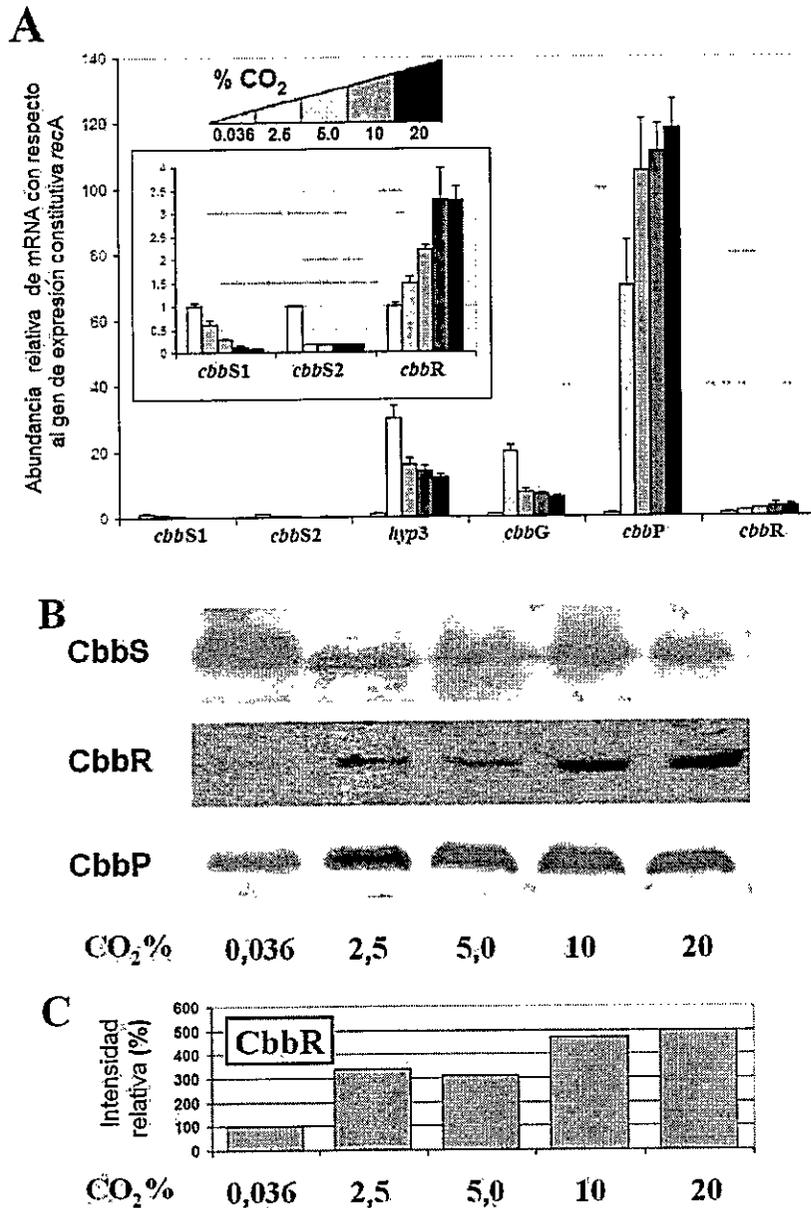


Figura 8. Efecto del CO₂ en la expresión de los genes del ciclo de Calvin durante el crecimiento litoautotrófico de *A. ferrooxidans* bajo concentraciones crecientes de CO₂. (A) Abundancia relativa del mRNA de los genes *cbbS1*, *cbbS2*, *hyp3*, *cbbG*, *cbbP* y *cbbR* con respecto al gen *recA*. La abundancia del mRNA se calculó por RT-PCR cuantitativo (n=4) a partir de dos cultivos independientes. En cada columna se incluye la desviación estándar. (B) Inmunoblot para las proteínas claves del ciclo de Calvin: CbbR, CbbS y CbbP. Cada carril se normalizó con ~20 µg de proteína total. (C) Cuantificación de la intensidad de las bandas de proteínas para CbbR mediante el programa Image Quant TL.

3.3. Capítulo III. CbbR regula la expresión de los genes del ciclo de Calvin de *A. ferrooxidans*

Ante la dificultad de manipulación génica y de obtener mutantes nulos en *A. ferrooxidans*, se optó por la alternativa de emplear un sistema heterólogo que asemeje la condición de crecimiento quimiolitotrófica de *A. ferrooxidans*, razón por la cual se usó la bacteria *R. eutropha*. Esta presenta la capacidad de manipulación génica y además es capaz de crecer en condición quimiolitotrófica, además se dispone de la cepa mutante nula para el gen del regulador CbbR (cepa HB14). Por otra parte, los genes del ciclo de Calvin y del regulador CbbR han sido ampliamente estudiados en base al sistema de *R. eutropha* (Bowien y Kusian, 2002; Pohlmann y cols., 2006).

3.3.1. Presencia de sitios de unión para CbbR en los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans*

Un primer acercamiento antes de abordar el estudio de la funcionalidad de CbbR, fue determinar la presencia de sitios de unión para este regulador en los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans*. En virtud de que se conoce el motivo de unión T-N₁₁-A para los reguladores CbbR descritos en bacterias autótrofas, se buscó manualmente esta secuencia en la región del operador de cada promotor de los operones *cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3*, *cbb4* y del gen *cbbR* de *A. ferrooxidans* (Fig. 9).

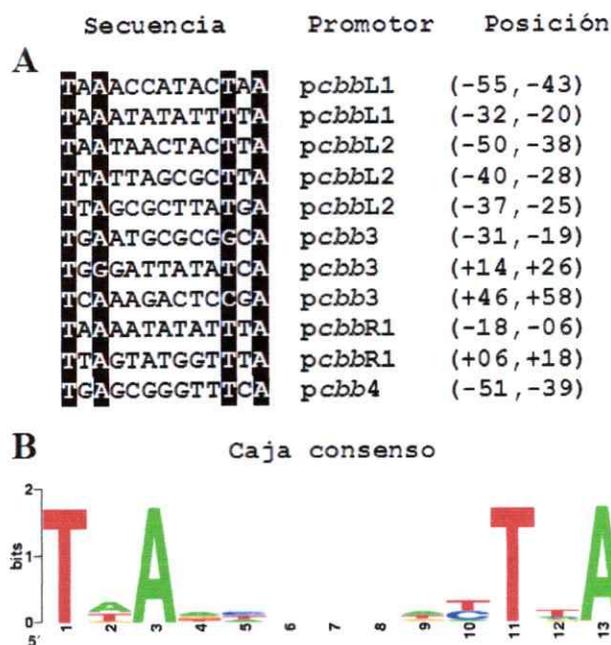


Figura 9. Alineamiento de secuencias predichas para la unión de CbbR en las regiones de control de los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans*. En (A) se muestran las secuencias alineadas y las posiciones de los nucleótidos con respecto al inicio de la transcripción de cada gen. Los nucleótidos altamente conservados se presentan en letras blancas con fondo negro. Al lado derecho, se indica la localización de cada motivo de unión para CbbR con respecto a la caja -10 y -35 del promotor reconocido por el factor σ^{70} de la RNA polimerasa. En (B) se observa la secuencia consenso (TNA-N₇-TNA) para CbbR de *A. ferrooxidans* obtenido mediante análisis bioinformático usando el programa WebLogo.

Los análisis indicaron que la mayoría de los promotores *cbb* presentan entre dos y tres motivos para la unión de CbbR, los cuales se encontraron ya sea cerca de la región -35 (promotores *pcbbL1* y *pcbbL2*) o de la región -10 (promotores *pcbb3* y *pcbbR*) para sigma 70 (Fig. 9A). El promotor *cbb4* presentó un sólo motivo T-N₁₁-A cerca de la caja -35 pero adicionalmente tuvo una secuencia tipo T-N₁₂-A que se localizo cerca de la caja -10.

El alineamiento de las secuencias completas T-N₁₁-A presentes en cada promotor *cbb* permitió caracterizar la caja consenso (TNA-N₇-TNA) para la unión de CbbR a los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans* (Fig. 9B).

3.3.2. CbbR^{AF} regula la expresión de los genes *cbb* de *A. ferrooxidans* presentes en *R. eutropha* HB14

En virtud de la presencia de sitios de unión para CbbR en los promotores para *cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3*, *cbb4* y *cbbR* de *A. ferrooxidans* entonces se investigó la función de CbbR^{AF} en la bacteria *R. eutropha* HB14. Para ello se realizaron construcciones plasmidiales (ver métodos, tabla 2) las cuales contenían el promotor *cbb* respectivo fusionado al gen *lacZ* en ausencia (actividad basal del promotor *cbb*) y en presencia del gen que codifica para el regulador transcripcional CbbR de *A. ferrooxidans* (actividad del promotor *cbb* con CbbR^{AF}), cada construcción respectiva fue incorporada en células de *R. eutropha* HB14 y luego se evaluó la actividad del promotor mediante el ensayo de β -galactosidasa.

Los resultados (Fig. 10, columnas amarillas) muestran que todos los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans* fueron funcionales en cultivos de *R. eutropha* HB14 crecidos con piruvato. Los promotores *pcbb4* y *pcbb3* presentaron la más alta actividad mientras que los promotores *pcbbR*, *pcbbL1* y *pcbbL2* tuvieron la más baja actividad. Por otro lado, en presencia de CbbR^{AF} (Fig. 10, columnas azules) se observó variaciones en la actividad de los promotores *cbb*. La actividad de los promotores *pcbbL1* y *pcbbL2* se incrementó mientras que la actividad para los promotores *pcbb3*, *pcbb4* y *pcbbR* disminuyó.

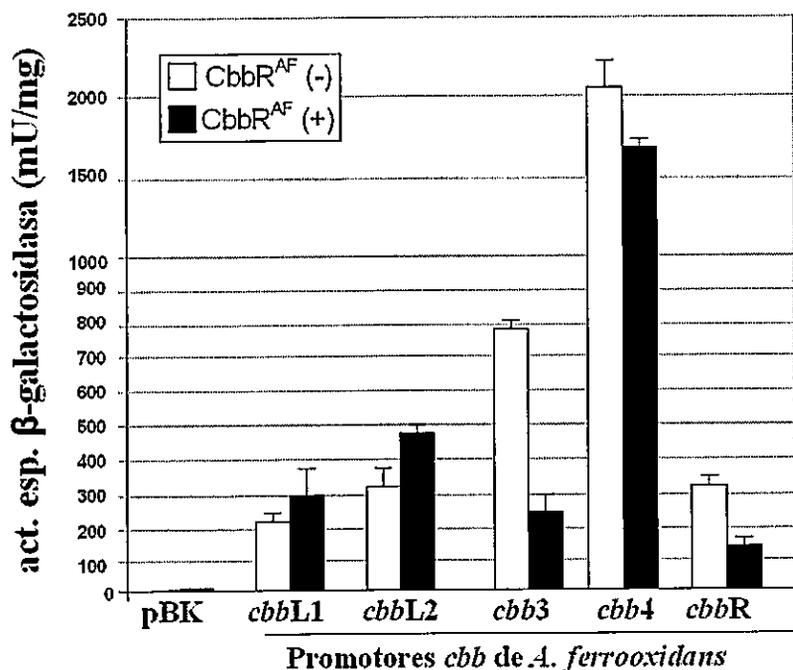


Figura 10. Actividades de los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans* en presencia y ausencia de CbbR^{AF}. La actividad de los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3*, *pcbb4* y *pcbbR* se evaluó en extractos celulares de cultivos de *R. eutropha* HB14 + pBK-*Pcbb::lacZ* (actividad en ausencia de CbbR) y en *R. eutropha* HB14 + pBK-*Pcbb::lacZ/RR* (actividad en presencia de CbbR) crecidos en piruvato. Las columnas indican el promedio del análisis de la actividad específica β -galactosidasa de tres cultivos independientes con su respectiva desviación estándar. pBK vector de fusión a *lacZ*.

Reuniendo los resultados antes mostrados, se puede inferir que CbbR^{AF} fue capaz de regular la actividad de los promotores *cbb* de *A. ferrooxidans* cuando ellos se expresan en *R. eutropha* HB14. Este patrón de regulación ejercido por CbbR^{AF} sobre los promotores *cbb* es consistente con la presencia de dos sitios de unión contiguos (Fig. 9) es decir, cuando dichos sitios se localizan juntos y cercanos al motivo -35 (*pcbbL1* y *pcbbL2*) se observó que, CbbR^{AF} produjo un incremento en la expresión (rol activador), en cambio

cuando se localizan superpuestos o río abajo del motivo -10 (*pcbb3*, *pcbb4* y *pcbbR*) se observó que, disminuyó la expresión (rol represor).

3.3.3. CbbR de *A. ferrooxidans* permite el crecimiento de *R. eutropha* HB14 en presencia de CO₂

En vista de la presencia de sitios de unión T-N₁₁-A en el promotor *pcbbL* de *R. eutropha* H16 (Bowien y Kusian; 2002) se investigó si CbbR^{AF} fue capaz de complementar la ausencia funcional de CbbR de *R. eutropha* H16 (CbbR^{RE}) y permitir el crecimiento autotrófico en la cepa mutante para *cbbR*.

Para desarrollar este objetivo se empleó la cepa *R. eutropha* HB14 con la construcción que porta el gen *cbbR* de *A. ferrooxidans* con su propio promotor (vector pBK/RR) y se determinó la complementación de la función mediante la evaluación del crecimiento autotrófico en presencia de H₂:CO₂:O₂ (8:1:1). Como controles positivos se emplearon la cepa silvestre *R. eutropha* H16 con el plásmido pBK y la cepa HB14 con el vector pUW7 (Windhövel y Bowien, 1991, ver Tabla 2). El control negativo fue la cepa HB14 conteniendo el vector pBK (Fig. 11).

Los resultados del análisis de complementación de *R. eutropha* HB14 por el regulador transcripcional CbbR (Fig. 11) sugieren que CbbR^{AF} se expresa y se une *in vivo* a la región de control del promotor *pcbbL* de *R. eutropha*; lo que activaría la expresión de la RubisCO permitiendo el crecimiento bacteriano. Estos resultados se sustentan porque no hubo crecimiento del control negativo (*R. eutropha* HB14 + pBK) y existió desarrollo de colonias de los controles positivos (*R. eutropha* H16 + pBK o *R. eutropha* H16 + pUW7).

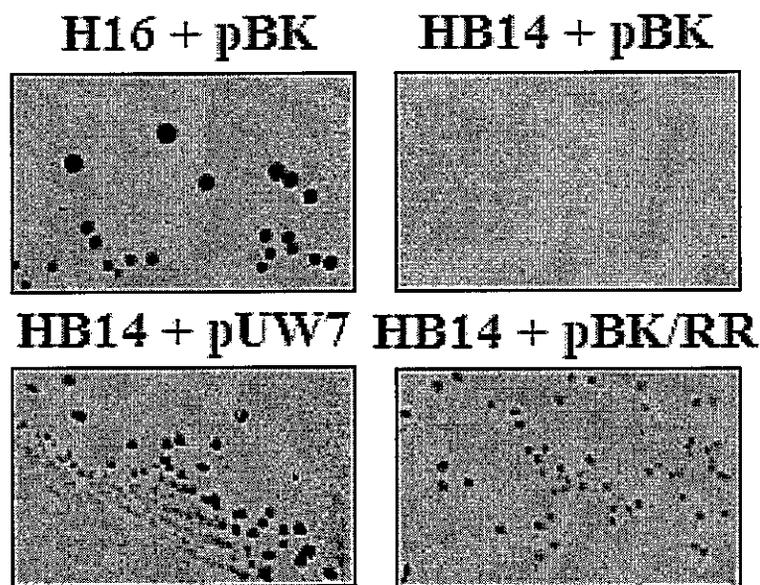


Figura 11. Análisis de complementación en *R. eutropha* HB14 (*cbbR*) por el regulador transcripcional CbbR^{AF} en condiciones quimiolitioautotróficas. Los cuadros muestran las características y tamaños relativos de las colonias de *R. eutropha* crecidas en presencia de H₂:CO₂:O₂ (8:1:1) a 30°C. En la parte superior se muestran las cepas *R. eutropha* H16 (control positivo) y HB14 (control negativo) transformadas con el vector pBK y en la parte inferior se muestran las cepas *R. eutropha* HB14 transformadas con los vectores pUW7 (que contiene la región que codifica para *cbbR* de *R. eutropha* bajo el control del promotor pT7) y con pBK/RR (que contiene el fragmento de DNA que codifica para *cbbR* de *A. ferrooxidans* con su propio promotor).

En resumen, lo antes expuesto constituye el primer resultado en el cual se informa que un regulador CbbR de un autótrofo obligado [*A. ferrooxidans* (γ -proteobacteria)] es capaz de complementar la deficiencia de la proteína CbbR de una bacteria autótrofa facultativa [*R. eutropha* (β -proteobacteria)].

3.4 Capítulo IV. CbbR de *A. ferrooxidans* se une específicamente a las secuencias TNA-N₇-TNA presentes en los promotores de los genes del ciclo de Calvin

Los antecedentes obtenidos *in vivo* indican que CbbR^{AF} fue capaz de activar la expresión de los promotores de los operones *cbbL1*, *cbbL2* y reprimir la expresión del promotor del operón *cbb3* y del gen *cbbR* de *A. ferrooxidans* lo cual sugirió, pero no determinó, que CbbR^{AF} puede reconocer las secuencias TNA-N₇-TNA y unirse a ellas con la afinidad suficiente como para controlar la expresión génica. Para probar si CbbR^{AF} se unió de modo específico a tales secuencias presentes en los promotores *cbb*, en este trabajo se expresó y purificó la proteína CbbR^{AF} desde una cepa de *E. coli* recombinante y luego se efectuaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) en presencia de CbbR^{AF} y DNA marcado con biotina.

3.4.1. CbbR^{AF} se expresa eficientemente en *E. coli* y produce cuerpos de inclusión

Una evidencia adicional en la demostración de la regulación de la expresión de los genes *cbb* por CbbR es la comprobación de la unión de esta proteína a las secuencias promotoras de dichos genes. Con el fin de conseguir este objetivo, se construyó la cepa de *E. coli* Top10 + pBAD-*cbbR* que permitió la expresión de la proteína CbbR^{AF} fusionada a una cola de histidina. La expresión de CbbR^{AF} fue eficiente y se produjo abundante cantidad de proteína. Sin embargo, el análisis de detección de CbbR^{AF} por western blot mostró que CbbR^{AF} estuvo presente únicamente en la fracción insoluble de los

extractos celulares de *E. coli* Top10 + pBAD-*cbbR* previamente inducidos con arabinosa (Fig. 12).

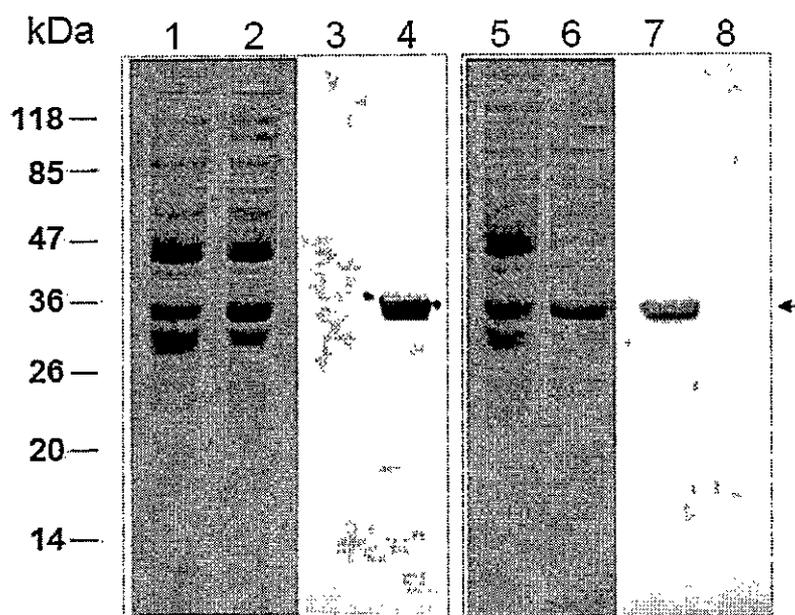


Figura 12. Expresión heteróloga e inmunoblot de CbbR de *A. ferrooxidans*. Las alícuotas de los extractos de proteínas de *E. coli* Top10 + pBAD-*cbbR* después de la inducción con arabinosa y las fracciones soluble e insoluble del lisado celular se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE al 12%. El marcador de masa molecular se muestra en kDa. La flecha indica la proteína recombinante CbbR^{AF}-Histag (~35 kDa). Carril 1, proteína total de células no inducidas y carril 2, proteína total de células inducidas con arabinosa, carriles 3 y 4 análisis de inmunoblot de las muestras mostradas en las carriles 1 y 2 respectivamente usando anticuerpos anti-6xHistag. Carril 5, fracción insoluble y carril 6, fracción soluble de células previamente inducidas con arabinosa, carriles 7 y 8 análisis de inmunoblot de las mismas muestras mostradas en las carriles 5 y 6 respectivamente usando anticuerpos anti-6xHistag.

3.4.2. CbbR^{AF} forma oligómeros en solución

La sobreexpresión de CbbR^{AF} desde *E. coli* Top10 + pBAD-*cbbR* produjo la formación de agregados de proteína resultando en formación de proteína CbbR^{AF} insoluble (cuerpos de inclusión), la cual fue luego purificada en condiciones desnaturalantes. En la Fig. 13 se muestran los perfiles de elución de las fracciones enriquecidas con CbbR^{AF} en presencia de urea 8 M obtenidas

mediante cromatografía de afinidad usando columna de níquel-agarosa (Ni-NTA) (ver métodos) (Fig. 13A). Luego algunas de las fracciones se separaron por SDS-PAGE y se observó que contenían proteínas con pesos moleculares aproximados de 70 kDa y 140 kDa, lo cual sugirió que CbbR^{AF} estaría formando dímeros y tetrameros en presencia de urea 8 M. (Fig. 13B).

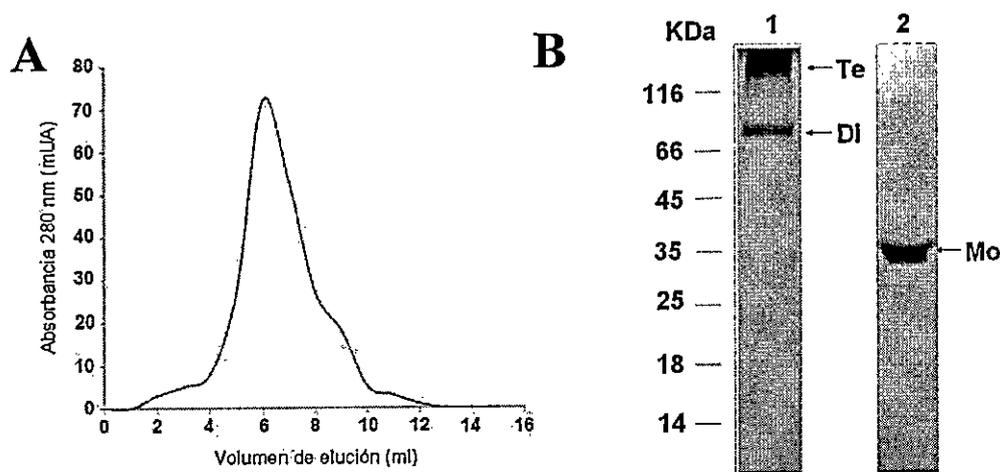


Figura 13. Purificación de CbbR de *A. ferrooxidans*. (A) Perfiles de elución de la columna de afinidad Ni-NTA conteniendo CbbR^{AF}. (B) Tinción con azul de Coomassie de los geles de SDS-PAGE conteniendo fracciones de CbbR^{AF} purificado. Las alícuotas de las fracciones purificadas con CbbR^{AF} se analizaron por electroforesis. Carril 1 y 2 muestran eluciones desnaturantes en presencia de urea 8 M. Cada alícuota (10 μ l) se resolvió en ausencia (carril 1) o presencia de agente reductor (100 mM de β -mercaptoetanol; carril 2). Las flechas indican la masa molecular esperada de 35, 70 y 140 kDa respectivamente de la proteína CbbR-Histag como monómero (Mo), dímero (Di) y tetramero (Te).

En resumen, los resultados mostrados en esta sección sugieren que CbbR^{AF} forma oligómeros estables en presencia de urea 8 M y SDS, lo que constituye una característica propia de esta proteína. La propiedad de dimerizar u oligomerizar de CbbR de *A. ferrooxidans* podría tener implicancias en su papel de regulador puesto que se sabe que CbbR de *R. eutropha* H16, CbbR de *X. flavus* y CbnR de *R. eutropha* NH9 forman dímeros y tetrameros en

solución y bajo esta conformación se unen a sus secuencia blanco (Bowien y Kusian, 2002; van Keulen y cols., 2003; Muraoka y cols., 2003).

3.4.3. CbbR^{AF} se une específicamente a los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2* y *pcbb3* de *A. ferrooxidans* y al promotor *pcbbL* de *R. eutropha* H16

La especificidad de la unión de CbbR^{AF} a DNA se demostró por ensayos de retardo en gel. Estos ensayos revelaron que CbbR^{AF} (presente en la fracción nativa purificada) fue capaz de unirse específicamente a los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2* y *pcbb3* de *A. ferrooxidans*. Al mismo tiempo las reacciones de competencia con sonda fría (50 veces en exceso) reafirmaron la especificidad de la unión (Fig. 14). Además, frente a la adición del anticuerpo anti-CbbR^{AF}, se produjo un super retardo en la migración del complejo CbbR^{AF}-DNA, demostrando que el efecto es mediado específicamente por la proteína CbbR^{AF}.

Los resultados de la Fig. 14 confirman que CbbR^{AF} se unió *in vitro* a los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2* y *pcbb3* lo que explica su papel de regulador transcripcional, sin embargo en este mismo experimento CbbR^{AF} no fue capaz de unirse al promotor *pcbb4*.

En virtud de que CbbR de *A. ferrooxidans* fue capaz de activar *in vivo* la expresión de los genes *cbb* de *R. eutropha* H16, entonces se examinó si CbbR se unió de modo específico a los sitios TNA-N₇-TNA presentes en el promotor *pcbbL* de *R. eutropha*. Los experimentos de retardo (Fig. 14) determinaron que CbbR^{AF} se unió al promotor *pcbbL* de *R. eutropha* H16. En consecuencia, estos resultados constituyen el primer antecedente que

demuestra que los reguladores tipo CbbR^{AF} también pueden reconocer secuencias específicas TNA-N₇-TNA conservadas en otras especies bacterianas. Además sugiere que los reguladores CbbR pueden ser intercambiables en autótrofos conservando sus propiedades funcionales como activadores de la expresión de los genes del ciclo de Calvin.

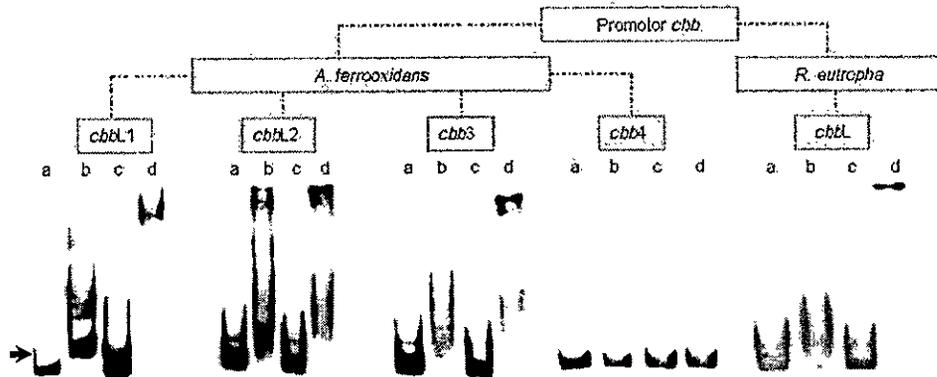


Figura 14. Unión específica de CbbR^{AF} a las secuencias TNA-N₇-TNA presentes en las regiones de control de los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3* y *pcbb4* de *A. ferrooxidans* y el promotor *pcbbL* de *R. eutropha* H16. Las sondas de DNA se obtuvieron por amplificación por PCR a partir de DNA genómico usando partidores marcados con biotina en el extremo 5'. La cantidad final de cada sonda fue de ~20 pmol por reacción. Los carriles del gel revelan la sonda marcada: (a) sin CbbR^{AF}, (b) con CbbR^{AF}, (c) con CbbR^{AF} en presencia de 50 veces en exceso de sonda no marcada y (d) con CbbR^{AF} en presencia de anticuerpos específicos contra CbbR^{AF}. La flecha indica las posiciones de migración de la sonda del DNA libre.

IV. DISCUSIÓN

El enfoque de esta tesis estuvo fundado esencialmente en la caracterización del mecanismo de regulación de la fijación de CO₂ en la bacteria autótrofa obligada *A. ferrooxidans*. Las primeras aproximaciones abordaron la reconstrucción metabólica de la fijación de CO₂ así como también la identificación de los genes asociados a este proceso y la caracterización de su organización génica, estableciéndose que los genes *cbb* forman operones. Con estos antecedentes y a raíz de que esta bacteria crece con CO₂ atmosférico como fuente de carbono, se procedió a analizar si las variaciones de las concentraciones de CO₂ presentes en el medio de cultivo influyen sobre la expresión de mRNA y de proteína de los genes *cbb*. En efecto, la concentración de CO₂ afectó la expresión génica siendo los genes más afectados aquellos que codifican para RubisCO, fosforribuloquinasa y el regulador transcripcional CbbR. El siguiente paso fue caracterizar el mecanismo de regulación de los genes *cbb* de *A. ferrooxidans*, ya que se determinó la existencia del gen *cbbR* y la presencia de secuencias de unión para CbbR en los promotores de los genes *cbb*. Estos estudios se llevaron a cabo tanto *in vivo* (en huésped heterólogo) como *in vitro* (experimentos de retardo). Se estableció que CbbR regula los genes *cbb* (*in vivo*) y se une específicamente a sus secuencias blanco (*in vitro*) presente en los promotores *cbb*.

Los resultados mostrados en la sección anterior apoyan la hipótesis establecida respecto a la función de CbbR en la regulación de la fijación de CO₂ en *A. ferrooxidans*. En las páginas siguientes se discutirá en detalle los aspectos más relevantes que derivan de los resultados obtenidos en esta tesis.

4.1. Los genes *cbb* en *A. ferrooxidans* se organizan formando cuatro operones

La organización de los genes que codifican para las enzimas del ciclo de Calvin fue establecida en la bacteria modelo de autotrofia obligada *A. ferrooxidans* y resultó particularmente interesante que los genes *cbb* integren cuatro operones (*cbbL1*, *cbbL2*, *cbb3* y *cbb4*) (Fig.7), ya que en la mayoría de las bacterias, se ha publicado que los genes *cbb* solamente se organizan en uno o dos operones (Kusian y Bowien, 1997; Shively y cols., 1998; Bowien y Kusian, 2002).

En *A. ferrooxidans* la organización génica del operón *cbbL1* (Fig. 7A) fue diferente a lo descrito en bacterias autótrofas facultativas, puesto que carece del gen *cbbP*. Sin embargo este operón es similar a lo descrito en bacterias autótrofas obligadas tales como *H. marinus*, *Ts. crunogena* y *H. neapolitanus* (Toyoda y cols., 2005, Cai y cols., 2008; Scott y cols., 2006) (Anexo 2) puesto que estas bacterias, además de los genes para RubisCO y el carboxisoma, presentan genes que codifican para bacterioferritina A (*bfrA*), proteína hipotética (*hyp1* e *hyp2*), proteína de partición A (*parA*), DNA helicasa (*recQ*). Sin embargo en el operón de *A. ferrooxidans* existen además los genes que codifican para proteínas activadoras de la RubisCO (*cbbQ1-cbbO1*) y la fructosa-bisfosfato aldolasa (*cbbA*). Por tanto, *A. ferrooxidans* presenta el operón *cbbL1* funcional más extenso (16 genes) descrito a la fecha en bacterias.

Información recientemente publicada de la presencia de los genes para la RubisCO forma I asociada a genes del carboxisoma en bacterias autótrofas ha sugerido que se subclasifique a esta RubisCO como forma IAc (c: indica carboxisoma) puesto que evolutivamente esta RubisCO pertenece al grupo de las

RubisCOs presentes en cianobacterias (Badger y Bek, 2008). Un aporte génico adicional del operón *cbbL1* es la presencia de genes que codifican para proteínas activadoras de la RubisCO, CbbQ-CbbO. Esto es importante ya que en cianobacterias no se presenta los genes *cbbQ-cbbO* y quizás en el medioambiente extremófilo donde habita *A. ferrooxidans* se los requiera para activar a la RubisCO en comparación con las cianobacterias y bacterias autótrofas facultativas que no requieren de estas proteínas activadoras. Lo peculiar de la organización del operón *cbbL1* es la presencia de un gen predicho que codificaría para una proteína involucrada en la partición del DNA cromosomal, gen *parA*. Este gen no ha sido antes descrito asociado a genes *cbb*, sin embargo la inspección de su presencia en otros genomas muestra que sólo se localiza en las bacterias autótrofas obligadas *T. denitrificans*, *Ts. crunogena*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Nitrobacter hamburgensis*, *Nitrosomonas eutropha* y *Nitrobacter winogradskyi* (Anexo 3). Los análisis filogenéticos muestran que ParA de las bacterias antes mencionadas esta presente en un clade independiente de los demás ParA no asociados a genes *cbb* (Anexo 4). Puesto que ParA participa en la partición de DNA y que en *A. ferrooxidans* el gen *parA* esta asociado a genes del carboxisoma (actualmente definido como prototipo bacteriano de organelo) (Menon y cols., 2008), es posible especular que cuando la célula se divida sea importante repartir igual número de los carboxisomas a las células hijas, quizás ParA tenga una función en este proceso, mas interesante aún es que la proteínas carboxisomales CsoS2 y CsoS4A de *A. ferrooxidans* presentan en su secuencia aminoacídica un péptido señal tipo "TAT", lo que sugiere que estas proteínas podrían estar transportándose a la

membrana externa o al periplasma. Datos experimentales publicados en *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato han mostrado que dichas proteínas del carboxisoma están presentes en el periplasma (Chi y cols., 2007). Mas aún recientemente se ha dilucidado la estructura tridimensional de la proteína CsoS4A de *H. neapolitanus* (Tanaka y cols., 2008) en donde la conformación pentamérica de esta proteína forma parte la estructura externa del carboxisoma. Asociando los antecedentes previos, en donde la proteína CsoS4A ha sido encontrada en el periplasma y además forma parte de la capa externa del carboxisoma entonces sería más ventajoso para la bacteria tener los carboxisomas mas cerca de la membrana celular o anclados a ella (mediante CsoS4A) para que el CO₂ difunda directamente al carboxisoma. Futuros trabajos podrían dirigirse a establecer la función de ParA y su asociación con el carboxisoma así como identificar si el carboxisoma esta anclado a membrana mediante CsoS4A.

Acerca del contexto génico del operón *cbbL2* de *A. ferrooxidans* (Fig. 7D) se observó que es altamente conservado al compararlo con lo descrito en *Ts. crunogena*, *T. denitrificans*, *H. marinus*, *R. capsulatus*, *N. europaea*, *Solemya velum* y *Pseudomonas hydrogenothermophila* (Scott y cols., 2006; Beller y cols., 2006; Toyoda y cols., 2005; Wei y cols., 2004; Paoli y cols., 1998; Yokoyama y cols., 1995). En virtud de que los genes de la segunda copia de RubisCO en *A. ferrooxidans* están asociados directamente a los genes *cbbQ-cbbO*, se ha sugerido que su denominación sea RubisCO forma IAq (q: indica *cbbQ*) (Badger, y Bek, 2008). Al destacar la presencia en *A. ferrooxidans* de dos copias de RubisCO con sus respectivas proteínas activadoras, se hace interesante plantear el porque esta bacteria

necesita tener dos copias para RubisCOs forma I, la explicación derivada de esto podría dirigirse al hábitat natural de *A. ferrooxidans*. Esta bacteria vive en presencia de CO₂ atmosférico el cual tiene una concentración muy baja (0,036%), entonces se hace necesario que esta bacteria pueda tener dos copias de RubisCO IAc y IAq para poder aumentar el rendimiento de la fijación del escaso CO₂ externo y con estos sostener su crecimiento en tal condición. Acerca de la relación filogenética entre las copias de RubisCO IAc y IAq de *A. ferrooxidans* ambas están juntas en un mismo clade junto con otras RubisCO forma I presente en cianobacterias y proteobacterias autótrofas (Valdés y cols, 2008) (Anexo 4).

Con respecto a los demás genes que codifican para las otras enzimas involucradas en el metabolismo central de carbono, todos están presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* y la mayoría están formando el operón *cbb3* integrado por 12 genes (Fig. 7G), de los cuales, ocho sólo participan en el ciclo de Calvin (*cbbF*, *cbbT*, *cbbG*, *cbbK*, *pykA*, *cbbA*, *cbbE* y *cbbZ*) y directamente conectan la ruta de síntesis de hexosas con el metabolismo del glicolato.

La organización génica del operón *cbb3* es propia de *A. ferrooxidans* puesto que en bacterias autótrofas facultativas los genes del metabolismo central de carbono están juntos con los genes que codifican para RubisCO y CbbP, formando un solo operón. Por tanto, la presencia del operón *cbb3*, independiente de genes RubisCO o CbbP en *A. ferrooxidans*, constituye un nuevo antecedente en la organización de los genes *cbb* en bacterias autótrofas (Anexo 5). Además este operón presenta asociación con genes del metabolismo de triptófano (*trp*) y resultó interesante conocer dos situaciones, la primera es que las proteínas codificadas de los genes

trpD-trpE presentes en el operón *cbb3*, son responsables de producir piruvato (Browne y cols., 2006). Adicionalmente el piruvato es sustrato de PykA (el gen *pykA* esta presente en el operón *cbb3*), cuyo producto resultante es el fosfoenolpiruvato (PEP) (Grzeszik y cols., 2000), A su vez se ha descrito que el PEP es cofactor de la proteína CbbR en *Ralstonia eutropha* H16, en donde se sabe que la proteína CbbR se une a PEP y forma el complejo CbbR-PEP, el cual produce represión de los genes *cbb* (Grzeszik y cols., 2000). Esta conexión resultó importante puesto que, *in vivo* CbbR de *A. ferrooxidans* reprime la expresión del operón *cbb3* (Fig. 10) lo cual es consistente con lo discutido previamente. La segunda implicancia es que la reacción catalizada por la enzima sintetizada a partir del gen *trpC* (gen asociado al operón *cbb3*) produce CO₂. Esto es muy importante ya que supone una fuente de CO₂ intracelular no descrita previamente, en la cual las bacterias autótrofas podrían valerse para reciclar el CO₂ y poder usarlo nuevamente para fijación y derivarlo a biosíntesis (Anexo 6).

Por otro lado, la presencia del gen que codifica para la fosforribuloquinasa (*cbbP*) de *A. ferrooxidans*, aislado de los genes para RubisCO, se contradice a lo publicado en bacterias autótrofas facultativos (Kusian y Bowien, 1997; Shively y cols., 1998; Bowien y Kusian, 2002) ya que en estas bacterias el gen *cbbP* siempre está asociado a genes para RubisCO.

El operón *cbb4* de *A. ferrooxidans* se caracteriza de otros potenciales operones *cbb4* de autótrofos obligados (Anexo 7) en que es el único operón descrito que incluye a genes que están directamente involucrados en la biosíntesis de metionina (*metK*, *sahA* y *metF*). Para sintetizar metionina la célula requiere metabolizar el

azufre del medio externo y reducirlo a homocisteína, en consecuencia la importancia de la conexión del ciclo de Calvin (CbbP) con el metabolismo de azufre no ha sido antes relacionada. Al parecer la organización génica en *A. ferrooxidans* conectando a los genes del ciclo de Calvin con el metabolismo de azufre podría tener alguna significancia fisiológica. Una hipótesis preliminar que potencialmente puede explicar estas conexiones en *A. ferrooxidans* es que los productos de los genes del operón *cbb4* que conectan con el metabolismo de azufre serían requeridos en la reducción de azufre elemental y producir energía para fijar CO₂ mediante el ciclo de Calvin (Anexo 8).

En resumen, los resultados de esta tesis constituyen el primer estudio dirigido a la caracterización génica global del ciclo de Calvin en una bacteria quimiolitotrófica y estableció que todos los genes *cbb* se agrupan en cuatro operones.

4.2. El CO₂ afecta la expresión de los genes de *cbb* en *A. ferrooxidans*

En esta tesis se observó que *A. ferrooxidans* fue capaz de crecer a nivel de laboratorio en presencia tanto de concentración atmosférica como en exceso de CO₂. El modelo experimental de usar elevadas cantidades de CO₂ se fundamenta en que previamente se han crecido otras bacterias autótrofas, incluyendo *A. ferrooxidans*, en concentraciones de CO₂ del 1 al 15% (Lacombe y Lueking, 1990; Takahashi y cols., 2004; Makita y cols., 2004; Toyoda y cols., 2005; Cadwell y cols., 2007) pero se sabe muy poco del efecto del CO₂ en la expresión de los genes involucrados en la fijación de carbono. En virtud de ello, en esta investigación se estableció que CO₂

afecta la expresión de los genes *cbb* de *A. ferrooxidans* a nivel de mRNA y de proteína (Fig. 8).

Los análisis de expresión de mRNA y proteína para RubisCO forma I de *A. ferrooxidans*, mostraron que los dichos genes se expresaron más en cultivos crecidos en presencia de CO₂ atmosférico que en aquellos crecidos en presencia de exceso de CO₂ (Fig. 8A). Este resultado, fue similar a los publicados para la RubisCO forma I de *H. marinus* y *H. neapolitanus* (Yoshizawa y cols., 2004; Menon y cols., 2008). Adicionalmente, otros estudios en *A. ferrooxidans* han mostrado que existe mayor expresión de la RubisCO forma I en cultivos crecidos con CO₂ atmosférico que con respecto a cultivos suplementados con CO₂ al 1% (Cadwell y cols., 2007). Así también se ha descrito que en la bacteria *H. neapolitanus* la expresión de RubisCO forma I disminuyó en cultivos crecidos con exceso de CO₂ (Baker y cols., 1998; Menon y cols., 2008).

La abundancia del mRNA y proteína para el gen *cbbR* en cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en exceso de CO₂ (5% al 20%) fue mayor con respecto a la de cultivos crecidos con CO₂ atmosférico (Fig. 8). Este resultado fue consistente con lo descrito en la bacteria *H. marinus* en la cual se indicó que la expresión del mRNA para *cbbR* fue mayor cuando se aumentó la concentración de CO₂ de 2 al 15% en el medio de cultivo (Toyoda y cols., 2005). Al parecer, en estos autótrofos obligados existe un patrón común de expresión del regulador CbbR que es dependiente de la concentración externa de CO₂, lo cual puede sugerir que estas bacterias al enfrentarse a ambientes con exceso de CO₂ responden sintetizando mayor cantidad de regulador CbbR. Según la literatura, en la bacteria autótrofa *Rhodopseudomonas*

palustris existe conexión entre el CO₂ externo y su efecto sobre la proteína CbbR. Esta bacteria presenta un sistema de dos componentes CbbRRS cuya proteína sensora CbbSR detecta el CO₂ y responde fosforilando dos reguladores de respuesta CbbRR1 y CbbRR2, los cuales posteriormente regularían post-transcripcionalmente al gen del regulador CbbR (Romagnoli y Tabita, 2007).

Otros sistemas de dos componentes han sido descritos en bacterias. En las bacterias fotoautótrofas *R. capsulatus* y *R. sphaeroides* fue comprobada la existencia del sistema de dos componentes RegB/RegA y se identificó que este sistema estuvo involucrado con el sensado y control de la fijación de CO₂ en *R. sphaeroides* (Spanga y Bauer, 1992; Mosley y cols., 1994; Qian y Tabita, 1996; Dubbs y cols., 2000; Dubbs y Tabita, 2003), pero a la fecha no se ha descrito la presencia de *regB/regA* en bacterias autótrofas obligadas, es por ello que la existencia de genes candidatos para *regB/regA* fue investigada en este trabajo.

En *A. ferrooxidans* se encontró que los genes *regB/regA* (AFE3195-AFE3196) forman un potencial operón. Además, la inspección en otros autótrofos obligados determinó la presencia de los genes *regB/regA* en *T. denitrificans* (Tbd2690-Tbd2689) con alta similitud con los ortólogos respectivos en *A. ferrooxidans*. El producto inferido del gen *regA* de *A. ferrooxidans* constituye una proteína de 191 aminoácidos (21,2 kDa) que contiene varios residuos conservados que son típicamente encontrados en los reguladores de respuesta de dos componentes. Los residuos conservados incluyen un aspartato aceptor de fosfato y un bolsillo ácido que contiene dos residuos conservados de aspártico en el dominio N-terminal, en cambio el dominio C-terminal presenta un motivo de unión a DNA (HTH) (Sganga y

Bauer, 1992). El alineamiento de RegA de *A. ferrooxidans* con otros homólogos de varias especies de proteobacterias determinó una alta conservación de sus dominios de unión a DNA (Anexo 9). Al parecer este sistema parece estar conservado en *A. ferrooxidans* y *T. denitrificans* y podría extenderse a otros autótrofos a medida que se liberen otras secuencias genómicas que están en proceso de anotación.

Probablemente, un sistema de dos componente sensor de CO₂ similar a CbbRRS podría funcionar en *A. ferrooxidans* y de esta forma se explicaría como las concentraciones crecientes de CO₂ producen un aumento intracelular de la proteína CbbR.

Por otro lado, acerca del gen de la fosforribuloquinasa, se observó que su expresión (mRNA o de proteína) se incrementó en concentraciones altas CO₂ (Fig. 8). Este fenómeno podría explicarse porque al existir mayor CO₂ intracelular, se requerirá mayor cantidad de ribulosa-1,5-bisfosfato (R-1,5-BP, producto de la fosforribuloquinasa) para ser carboxilada por la RubisCO lo que permitiría una mayor producción de R-1,5-BP. Estos datos también se correlacionan con lo observado en la actividad CbbP en extractos de *A. ferrooxidans* obtenidos de cultivos en presencia CO₂ atmosférico y con 1% de CO₂ (Cadwell y cols., 2007) en los cuales se mostró que la actividad CbbP aumentó en presencia de exceso de CO₂, lo cual directamente sugiere la presencia de mayor cantidad de CbbP (Fig. 8B) y en consecuencia mayor producción de R-1,5-BP.

Acerca de la abundancia del mRNA para los genes del operón *cbb3*: *hyp3* (proteína hipotética) y *cbbG* (gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa), se observó que ésta fue mayor en altas concentraciones de CO₂. Este resultado sugiere que los

genes del metabolismo central de carbono (presentes en el operón *cbb3*) de *A. ferrooxidans* incrementarían su abundancia en ambientes con exceso de CO₂, lo cual sería consistente con la demanda externa de carbono porque al existir exceso de CO₂, se requerirá mayor síntesis de las enzimas involucradas en metabolizar el CO₂. Este hecho conectado con el aumento de expresión de la fosforribuloquinasa permiten que *A. ferrooxidans* se adapte ante la demanda de CO₂, metabolice el carbono y crezca en el medio ambiente donde habita.

4.3. CbbR de *A. ferrooxidans* funciona como regulador transcripcional de los genes del ciclo de Calvin

Cuando la proteína CbbR^{AF} fue expresada en *R. eutropha* HB14 (*cbbR*) a partir de su propio promotor (*pcbbR*), ésta reguló eficientemente la expresión de los genes para RubisCO y *cbbR*, tal como ocurre en bacterias autótrofas (Kusian y Bowien, 1997). Los datos presentados en esta tesis muestran que CbbR^{AF} activa la expresión del promotor del operón *cbbL1* y del operón *cbbL2* en cultivos de *R. eutropha* HB14 crecidos en piruvato (Fig. 10).

Otro aspecto del mecanismo de regulación ejercido por CbbR^{AF} es la capacidad de ejercer autorregulación de su propia expresión. Esto fue evidente en cultivos de *R. eutropha* HB14 en donde se encontró que CbbR^{AF} reprime su propia expresión. Adicionalmente cabe destacar que CbbR también regula la expresión de los genes del metabolismo central de carbono, agrupados en el operón *cbb3* ya que CbbR reprime drásticamente la expresión del promotor *cbb3* cuando este se expresó en *R. eutropha* HB14 (Fig.10). Además CbbR^{AF} se unió específicamente al fragmento de

DNA del promotor *pcbb3* mediante ensayos de retardo (Fig.14). Esta información es relevante, puesto que a la fecha no se había descrito la capacidad de CbbR de regular genes del metabolismo central en autótrofos obligados. Además, adiciona nueva información al conocimiento en la regulación del ciclo de Calvin de bacterias autótrofas, puesto que CbbR se unió a sus sitios presentes en el promotor del gen *hyp3* (primer gen del operón *cbb3*) (Fig.9), que codifica para una proteína hipotética. En consecuencia, esta evidencia constituye la primera información en la cual un regulador tipo LysR es capaz de ejercer regulación sobre un gen hipotético. Este nuevo panorama de control génico amplía los blancos de regulación para CbbR ya que esta proteína no sólo regularía a los genes *cbb* sino que a otros genes con sitios de unión para CbbR. Probablemente este sistema es propio de *A. ferrooxidans* ya que en los autótrofos obligados cuyo genomas están disponibles (*T. denitrificas*, *Ts. crunogena*, *H. marinus*) los genes del probable operón para *cbb3* no inician con un gen hipotético.

Reuniendo la información de los estudios fisiológicos en cultivos de *R. eutropha*, se infiere que CbbR^{AF} *in vivo* es un regulador transcripcional de la RubisCO forma I, del operón *cbb3* y de sí mismo. Adicionalmente, experimentos de unión de CbbR a los promotores *pcbbL1*, *pcbbL2*, *pcbb3* y *pcbbR* *in vitro* confirmaron la autenticidad y especificidad de esta interacción. En consecuencia, la conservación del motivo HTH, la propiedad de formar dímeros y tetrámeros en solución (Fig.13), la capacidad de unión a dos cajas conservadas de CbbR^{AF} *in vitro* y la capacidad de activar los promotores de los operones *cbbL1*, *cbbL2* y reprimir al

gen *cbbR* y al promotor del operón *cbb3* de *A. ferrooxidans* *in vivo*, permiten caracterizar el rol de la proteína CbbR de *A. ferrooxidans* (Fig. 15).

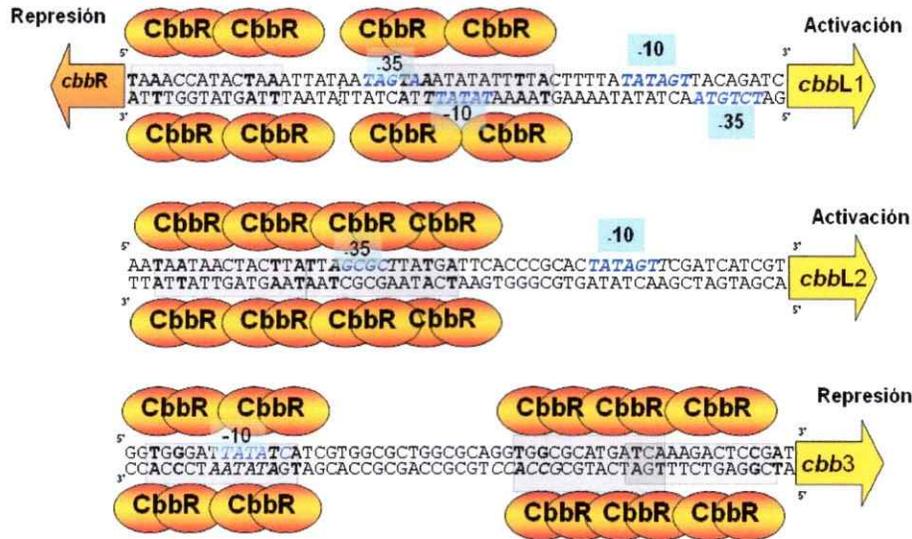


Figura 15. Mecanismo de regulación de los genes del ciclo de Calvin de *A. ferrooxidans* por la proteína CbbR^{AF}. El mecanismo supone que la proteína CbbR se une a las secuencias TNA-N₇-TNA (cajas grises) presentes en los promotores *pcbbL1*-*pcbbR*, *pcbbL2* y *pcbb3* en forma de dímeros o tetrámeros. Cuando la unión de CbbR es cercana a la caja -35 se inicia la activación de *cbbL1* o *cbbL2*, en cambio si CbbR se une a la caja -10 se reprime la expresión del gen *cbbR* y del operón *cbb3*. Las secuencias sombreadas en azul y cursiva corresponden a las cajas -10 y -35 para los promotores sigma 70.

Otra función adicional para CbbR^{AF} fue su capacidad de regular la expresión de los genes *cbb* en otra bacteria. Puesto que, CbbR^{AF} fue capaz de activar eficazmente la expresión del genes *cbb* de *R. eutropha* y permitió que esta bacteria proliferara en presencia de 10% de CO₂ y 80% de H₂ (Fig. 11). La capacidad de CbbR^{AF} para complementar la deficiencia del regulador CbbR^{RE} en *R. eutropha* demuestran que la proteína CbbR^{AF} fue funcional en condiciones quimiolitotróficas. Además CbbR^{AF} se unió específicamente a las cajas TNA-

N₇-TNA presentes en el promotor *pcbbL* de *R. eutropha* H16 (Fig.14). Experimentos de unión *in vitro* permitieron confirmar la especificidad de esta interacción (Fig. 14). Por tanto, cabe destacar que lo discutido anteriormente constituye un importante aporte al conocimiento de las funciones adicionales de los reguladores transcripcionales tipo LysR ya que sólo se conocía que los reguladores LysR regulan únicamente sus secuencias blanco dentro de la misma bacteria (Shell, 1993; Kusian y Bowien, 1997). En esta investigación quedó establecido que un regulador CbbR de una γ -proteobacteria (*A. ferrooxidans*) fue capaz de activar la expresión de otros genes *cbb* de otra especie bacteriana diferente como *R. eutropha* H16 (β -proteobacteria).

4.4 Modelo de la regulación de la fijación de CO₂ por CbbR^{AF} en la bacteria biolixivante *A. ferrooxidans*

En esta tesis se estableció que *A. ferrooxidans* creció tanto en concentración atmosférica como en exceso de CO₂ y en estas condiciones se encontraron diferentes cantidades de las proteínas RubisCO, fosforribuloquinasa y del regulador CbbR, las cuales fueron dependientes de la concentración externa de CO₂. Esta observación y la información tanto *in vivo* como *in vitro* permitieron desarrollar un modelo de regulación en *A. ferrooxidans* por CbbR, el cual se describe a continuación (Fig. 16).

Cuando *A. ferrooxidans* creció en concentración atmosférica de CO₂ (Fig. 8) la cantidad intracelular de RubisCO aumentó, probablemente para optimizar la fijación del escaso CO₂. El regulador CbbR, se encuentra en escasa cantidad y quizás en baja

concentración éste activaría la expresión de los genes de los operones *cbbL1* y *cbbL2* y reprimiría tanto su propia expresión como la expresión de los genes del operón *cbb3*. Por otro lado, la cantidad de fosforribuloquinasa (CbbP) disminuyó posiblemente a razón de que existe escaso CO₂. Por tanto se requerirá menor suministro de R-1,5-BP para su carboxilación por la RubisCO y por tanto sería necesario que la síntesis de CbbP sea menor que cuando existe exceso de CO₂.

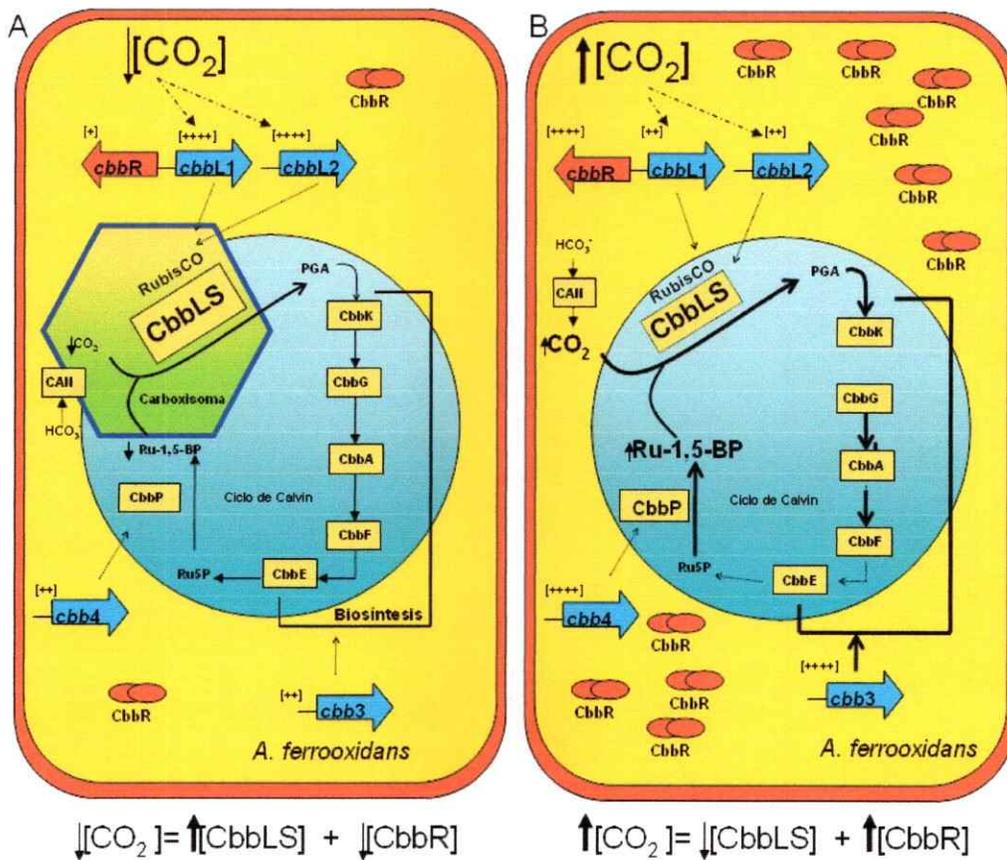


Figura 16. Modelo de la regulación de la fijación de CO₂ por CbbR^{AF} en *A. ferrooxidans*. En su habitat natural *A. ferrooxidans* es capaz de crecer en bajas (A) o altas (B) concentraciones de CO₂. Las flechas al costado del CO₂ y Ru-1,5-BP indican mayor (↑) y menor (↓) cantidad de la molécula respectiva. Los signos positivos indican mayor [+++] y menor [++] expresión de los operones *cbb* o del gen *cbbR*.

Por otra parte, cuando *A. ferrooxidans* creció en concentraciones elevadas de CO₂ (Fig. 8) la cantidad intracelular de RubisCO disminuyó y la cantidad de regulador CbbR aumentó. Probablemente cuando CbbR está en mayor cantidad y en exceso de CO₂, éste regulador podría reprimir la expresión de la RubisCO y activar su propia expresión y la expresión de los genes del operón *cbb3* (Fig. 8). El hecho de reprimir los genes RubisCO cuando CbbR está en mayor cantidad ha sido observado previamente en algunos autótrofos y se ha establecido que CbbR polimeriza sobre sus cajas ampliando su región de unión (Viale y cols., 1991; Bowien y Kusian, 2002).

Por otro lado, en elevadas concentraciones de CO₂ la cantidad de fosforribuloquinasa aumentó, probablemente porque existe demanda de sintetizar más proteína fosforribuloquinasa para producir mayor cantidad de Ru-1,5-BP, de esta manera al existir exceso de CO₂ también habría mayor cantidad de Ru-1,5-BP necesaria para la carboxilación por la RubisCO. En resumen *A. ferrooxidans* controla la fijación de CO₂ por CbbR acorde a las necesidades metabólicas del medio ambiente en donde habita.

Finalmente, se debe destacar que la información obtenida en esta tesis constituye un aporte real al conocimiento y adiciona más antecedentes de la regulación de la fijación de CO₂ en bacterias autótrofas. Investigaciones futuras podrían estudiar la regulación de los genes de transporte y sensado de CO₂ (sistema de dos componentes RegB/RegA) así como de los genes no asociados con el metabolismo de CO₂ que presenten potenciales secuencias de unión para CbbR en sus promotores

Además futuros trabajos podrían dirigirse a establecer la función de ParA y su asociación con el carboxisoma así como identificar si el carboxisoma esta anclado a membrana mediante CsoS4A, lo cual resultaría interesante dilucidar puesto que no se ha descrito su implicancia en la división celular y quizás los carboxisomas migran en igual cantidad a las células hijas siguiendo una línea de migración como lo hacen algunas estructuras multiproteicas de células eucariotas (cromosomas, mitocondrias), esto podría sentar las bases de un sistema primitivo de segregación de microcompartimientos tipo organelos en bacterias. Otro alcance es establecer la potencial producción de CO₂ intracelular no descrita previamente, en la cual las bacterias autótrofas podrían valerse para reciclar el CO₂ y poder usarlo nuevamente para fijación y derivarlo a biosíntesis.

También queda pendiente evaluar el rol del segundo ortólogo para CbbR^{AF} (Fig. 2, Anexo 4) y determinar su funcionalidad en la regulación de los genes *cbb*, en especial su relación con el gen de la RubisCO forma II. En resumen, estas preguntas podrían abordarse bajo aproximaciones genómicas, proteómicas y estudios fisiológicos que incluyan la cepa *A. ferrooxidans* y el modelo heterólogo de *R. eutropha* HB14 en donde se compare la expresión diferencial entre condiciones de crecimiento, o alternativamente estudios de protección de DNA en donde se identifique los sitios de unión para los reguladores CbbRs de *A. ferrooxidans*.

V. CONCLUSIONES

1. La bacteria autótrofa *A. ferrooxidans* presenta en su genoma todos los genes que codifican para las proteínas involucradas en la asimilación y fijación de CO₂ por el ciclo de Calvin que se agrupan formando cuatro operones. En consecuencia, la presencia y conservación en el genoma de *A. ferrooxidans* de todos estos genes, por analogía con sistemas conocidos, indica que esta bacteria es capaz de montar una respuesta integral para fijar y metabolizar el CO₂.
2. Las concentraciones crecientes de CO₂ del 2,5 al 20% en el medio de crecimiento de la bacteria *A. ferrooxidans* afectan la expresión de los genes del ciclo de Calvin. Específicamente a los genes que codifican para proteínas y enzimas involucradas en las etapas fijación (*cbbS1*, *cbbS2*), metabolismo (*cbbG*, *cbbP*) y regulación (*cbbR*) de CO₂. En presencia de concentraciones crecientes de CO₂ disminuye la expresión del mRNA de los genes *cbbS1* y *cbbS2* y aumenta la expresión de los genes *cbbG*, *cbbP* y *cbbR*. En esta misma condición, disminuye la cantidad de proteína RubisCO forma I y aumenta la presencia de proteínas CbbP y CbbR.
3. El gen *cbbR* (AFE_1393) presente en el genoma de *A. ferrooxidans* codifica para el regulador transcripcional CbbR, el cual es asignado a la familia de reguladores tipo LysR sobre la base de su alta similitud de secuencia y la conservación de los motivos implicados en la función de este grupo de proteínas. Durante el crecimiento quimiolitotrófico de *A. ferrooxidans*, el gen *cbbR* incrementa su expresión (mRNA o proteína) de dos a cinco veces en concentraciones de CO₂ del 2.5 al 20% con respecto a la expresión en presencia de CO₂ atmosférico. En

consecuencia, la expresión variable del regulador CbbR en esta bacteria responde a algún tipo de mecanismo de control génico dependiente de CO₂.

4. El regulador CbbR de *A. ferrooxidans* (γ -proteobacteria) complementa la deficiencia del gen *cbbR* en *R. eutropha* HB14 (β -proteobacteria), puesto que al expresar CbbR^{AF} desde su propio promotor (*pcbbR*^{AF}), éste activa eficazmente la expresión de los genes *cbb* en *R. eutropha* permitiendo la funcionalidad del ciclo de Calvin y el crecimiento de esta bacteria en presencia de H₂:CO₂:O₂ (8:1:1). Por otra parte, CbbR^{AF} *in vitro* se une específicamente al promotor *pcbbL* de *R. eutropha* H16.
5. CbbR^{AF} regula su propia expresión y la expresión de los promotores de los operones *cbb* de *A. ferrooxidans* presentes en la bacteria *R. eutropha* HB14. De hecho, el regulador CbbR^{AF} activa la expresión de los promotores *pcbbL1*^{AF} y *pcbbL2*^{AF} y reprime la expresión del promotor *pcbb3*^{AF} y su propia expresión (autoregulador negativo). Así mismo, CbbR^{AF} se une específicamente *in vitro* a los promotores de los operones *pcbbL1*^{AF}, *pcbbL2*^{AF} y *pcbb3*^{AF}. En consecuencia, se sugiere que el efecto neto de regulación ejercido por CbbR^{AF} como activador o represor es dependiente de la localización relativa de las secuencias TNA-N₇-TNA, respecto de los motivos -10 y -35 para el factor σ^{70} de la RNA polimerasa. De esta forma la activación transcripcional se explica por la unión de CbbR^{AF} a sus cajas localizadas en la proximidad del motivo -35, en cambio la represión sería por la unión de CbbR^{AF} a sus cajas ubicadas en la cercanía del motivo -10.

En conclusión, el regulador CbbR de *A. ferrooxidans* es una proteína funcional capaz de regular sus genes blanco presentes tanto en *A. ferrooxidans* como en *R.*

eutropha. De esta forma CbbR^{AF} se describe como el primer regulador LysR que conserva su función en otra bacteria de diferente especie; además se informa de un nuevo rol de CbbR^{AF} ya que, no sólo regula los operones que codifican para RubisCO, sino que también a los genes involucrados en la síntesis de hexosas (operón *cbb3*^{AF}).

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and D. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389–3402.
- Appia-Ayme, C., Quatrini, R., Denis, Y., Denizot, F., Silver, S., Roberto, F., Veloso, F., Valdés, J., Cárdenas, J., Esparza, M., Orellana, O., Jedlicki, E., Bonnefoy, V. and D. Holmes. 2006. Insights into the central carbon metabolism *Acidithiobacillus ferrooxidans* revealed by bioinformatics and microarray analysis. *Hydrometallurgy.* **83**:273-280.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J. and K. Struhl. 1999. Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, New York, N.Y.
- Badger, M. and G. Price. 2003. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J. Exp. Bot.* **383**: 609-622.
- Baker S., Jin, S., Aldrich, H., Howard, G. and J. Shively. 1998. Insertion mutation of the form I *cbbL* gene encoding ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) in *Thiobacillus neapolitanus* results in expression of form II RuBisCO, loss of carboxysomes, and an increased CO₂ requirement for growth. *J. Bacteriol.* **180**:4133-4139.
- Bassham, J. and M. Calvin. 1957. The Path of Carbon in Photosynthesis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- Bauer, C. 1995. Regulation of photosynthesis gene expression. In: Anoxygenic Photosynthetic Bacteria (Blankenship, R.E., Madigan, M.T. and C.E. Bauer. Eds.). pp. 1221-1234. Kluwer Dordrecht.
- Beller, H., Letain, T., Chakicherla, A., Kane, S., Legler, T. and M. Coleman. 2006. Whole-genome transcriptional analysis of chemolithoautotrophic thiosulfate oxidation by *Thiobacillus denitrificans* under aerobic versus denitrifying conditions. *J. Bacteriol.* **188**:7005-7015.
- Bowien, B. and B. Kusian. 2002. Genetics and control of CO₂ assimilation in the chemoautotroph *Ralstonia eutropha*. *Arch. Microbiol.* **178**:85-93.
- Bowien, B. 1989. Molecular biology of carbon dioxide assimilation in aerobic chemoautotrophs. In: Autotrophic Bacteria (Schlegel, H.G. and B. Bowien. Eds.). pp. 437-460. Science Tech. Madison, W.I.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem* **72**: 248-254.
- Browne, B., Ramos, A and D. M. Downs. 2006. PurF-independent phosphoribosyl amine formation in *yjgF* mutants of *Salmonella enterica* utilizes the tryptophan biosynthetic enzyme complex anthranilate synthase-phosphoribosyltransferase. *J Bacteriol.* **188**: 6786–6792.
- Cadwell, P., MacLean, M. and P. Norris. 2007. Ribulose bisphosphate carboxylase activity and a Calvin cycle gene cluster in *Sulfobacillus* species. *Microbiol.* **153**:2231-2240.

- Cai, F., Heinhorst, S., Shively, J. and G. Cannon.** 2008. Transcript analysis of the *Halothiobacillus neapolitanus* *cso* operon. *Arch. Microbiol.* 189:141-150.
- Cannon, G., Baker, S., Soyer, F., Johnson, D., Bradburne, C., Mehlman, J., Davis, P., Jiang, Q., Heinhorst, S. and J. Shively.** 2003. Organization of carboxysome genes in the *Thiobacilli*. *Curr. Microbiol.* 46:115-119.
- Cavanaugh, C. and J. Robinson.** 1995. CO₂ fixation in chemoautotroph-invertebrate symbiosis: expression of form I and form II RuBisCO. In *Microbial Growth on C₁ Compounds*. (Lidstrom M.E. and F.R. Tabita. Eds.). pp. 285-292. Dordrecht: Kluwer.
- Cheng, S., Yaguchi, T., Nishihara, H., Igarashi, Y. and T. Kodama.** 1993. Purification of form L2 RuBisCO from a marine obligately autotrophic hydrogen-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* 109:49-54.
- Chi, A., Valenzuela, L., Beard, S., Mackey, A. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and C. A. Jerez.** 2007. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis. *Mol. Cell. Proteomics.* 6:2239-2251.
- Colmer, A. and M. Hinkel.** 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science.* 106:253-256.
- Dangel, A., Gibson, J., Janssen, A. and F. Tabita.** 2005. Residues that influence *in vivo* and *in vitro* CbbR function in *Rhodobacter sphaeroides* and identification of a specific region critical for co-inducer recognition. *Mol. Microbiol.* 57:1397-1414.
- Dawson, R., Elliot, D., Elliot, W. and K. Jones.** 1986. Data for biochemical research. Third Edition, Oxford University Press, Oxford, pp 366-367.
- Dubbs, P., Dubbs, J. and F. Tabita.** 2004. Effector-mediated interaction of CbbR_I and CbbR_{II} regulators with target sequences in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 186:8026-8035.
- Dubbs, J. and F. Tabita.** 2003. Interactions of the *cbb_{II}* promoter-operator region with CbbR and RegA (PrrA) regulators indicate distinct mechanisms to control expression of the two *cbb* operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* 278:16443-16450.
- Dubbs, J., Bird, T., Bauer, C. and F. Tabita.** 2000. Interaction of CbbR and RegA* transcription regulators with the *Rhodobacter sphaeroides cbb_I* promoter-operator region. *J. Biol. Chem.* 275:19224-19230.
- Eccleston, M. and D. Kelly.** 1978. Oxidation kinetics and chemostat growth kinetics of *Thiobacillus ferrooxidans* on tetrathionate and thiosulfate. *J. Bacteriol.* 134:718-727.
- Elsen, S., Swem, L., Swem, D. and C. Bauer.** 2004. RegB/RegA, a Highly Conserved Redox-Responding Global Two-Component Regulatory System. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:263-279.
- English, R., Williams, C., Lorbach, S. and J. Shively.** 1992. Two forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Thiobacillus denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 94:111-119.
- Eraso, J. and S. Kaplan.** 1995. Oxygen-sensitive synthesis of the photosynthetic membranes of *Rhodobacter sphaeroides*: a mutant histidine kinase. *J. Bacteriol.* 177:2695-2706.

- Evans, M., Buchanan, B. and D. Arnon.** 1966. A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**:928-934.
- Falcone, D., Quivey, R. and F. Tabita.** 1988. Transposon mutagenesis and physiological analysis of strains containing inactivated form I and Form II ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **170**:5-11.
- Forrest, W. and D. Walker.** 1971. The generation and utilization of energy during growth. *Adv. Microb. Physiol.* **5**:213-274.
- Fuchs, G., Stupperich, E. and G. Eden.** 1980. Autotrophic CO₂ fixation in *Chlorobium limicola*. Evidence for the operation of a reductive tricarboxylic acid cycle in growing cells. *Arch. Microbiol.* **128**:64-71.
- Gale, N. and J. Beck.** 1967. Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **94**:1052-1059.
- Gibson, J. and F. Tabita.** 1993. Nucleotide sequence and functional analysis of CbbR, a positive regulator of the Calvin cycle operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **175**:5778-5784.
- Grzeszik, C., Jeffke, T., Schäferjohann, J., Kusian, B. and B. Bowien.** 2000. Phosphoenolpyruvate is a signal metabolite in transcriptional control of the *cbb* CO₂ fixation operons in *Ralstonia eutropha*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:311-320
- Goethals, K., van Montagu, M. and M. Holsters.** 1992. Conserved motifs in a divergent nod box of *Azorhizobium caulinodans* ORS571 reveal a common structure in promoters regulated by LysR-type proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:1646-1665.
- Hanson, T. and F. Tabita.** 2001. A rubisco-like protein from *Chlorobium tepidum* that is involved with sulfur metabolism and the response to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**:4397-4402.
- Hazeu, W., Bijleveld, W., Grotenhuis, J., Kakes, E. and J. Kuenen.** 1986. Kinetics and energetics of reduced sulfur oxidation by chemostat cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **52**:507-518.
- Heinhorst, S., Williams, E., Cai, F., Murin, C., Shively, J. and G. Cannon.** 2006. Characterization of the carboxysomal carbonic anhydrase CsoSCA from *Halothiobacillus neapolitanus*. *J. Bacteriol.* **188**:8087-8094.
- Heinhorst, S., Baker, S., Johnson, D., Davies, P., Cannon, G. and J. Shively.** 2002. Two Copies of form I RuBisCO genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Curr. Microbiol.* **45**:115-117.
- Holmes, D.** 1998. Biorecovery of Metals from Mining Wastes, in: AM Martin (Eds.), *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. Chapman Hall, London. pp. 517-545.
- Holo, H.** 1989. *Chlorofexus aurantiacus* secretes 3-hydroxypropionate, a possible intermediate in the assimilation of CO₂ and acetate. *Arch. Microbiol.* **151**:252-256.
- Holuigue, L., Herrera, L., Phillips, O., Young, M. and J. Allende.** 1987. CO₂ fixation by mineral-leaching bacteria: characteristics of the ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**:497-505.

- Hügler, M. and G. Fuchs.** 2003. Assaying for the 3-hydroxypropionate cycle of carbon fixation. *Methods Enzymol.* **397**:212-21.
- Igarashi, Y. and T. Kodama.** 1995. Genes related to carbon dioxide fixation in *Hydrogenovibrio marinus* and *Pseudomonas hydrogenothermophila*. In *Microbial Growth on C₁ Compounds*. (Lidstrom, M. and F. Tabita. Eds.). pp. 88-93. Dordrecht: Kluwer.
- Ishihama, A.** 1993. Protein-protein communication within the transcription apparatus. *J Bacteriol.* **175**: 2483-2489.
- Joshi, H. and F. Tabita.** 1996. A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation and nitrogen fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:1415-1420.
- Jeffke, T., Gropp, N., Kaiser, C., Grzeszik, C., Kusian, B. and B. Bowien.** 1999. Mutational analysis of the *cbb* operon (CO₂ assimilation) promoter of *Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol* **181**:4374- 4380
- Jouanneau, Y. and F. Tabita.** 1986. Independent regulation of form I and form II ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **165**:620-624.
- Kelly, D.** 1982. Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of sulfur. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **298**:499-528.
- Kelly, D., Eccleston, M. and C. Jones.** 1977. Evaluation of continuous chemostat cultivation of *Thiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron or tetrathionate, p. 1-7. In W. Schwartz (ed.), *Gesellschaft für Biotechnologische Forschung conference-bacterial leaching*. Verlag Chemie. Weinheim. Germany.
- Klotz, et al.** 2006. Complete genome sequence of the marine, chemolithoautotrophic, ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:6299-6315.
- Kolmar, H., Friedrich, K., Pschorr, J. and J. Fritz.** 1990. Hybrids of circular DNA single strands as intermediates in DNA cloning, sequence analysis and directed mutagenesis. *Technique.* **2**:237-245.
- Kusano, T. and K. Sugawara.** 1993. Specific binding of *Thiobacillus ferrooxidans* RbcR to the intergenic sequence between the *rbc* operon and the *rbcR* gene. *J. Bacteriol.* **175**:1019-1025.
- Kusano, T., Takeshima, T., Inoue, C. and K. Sugawara.** 1991. Evidence for two sets of structural genes coding for ribulose biphosphate carboxylase in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**:7313-7323.
- Kusian, B. and B. Bowien.** 1997. Organization and regulation of *cbb* (CO₂ assimilation) genes in autotrophic bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* **21**:135-55.
- Kusian, B. and B. Bowien.** 1995. Operator binding of the CbbR protein, which activates the duplicate *cbb* CO₂ assimilation operons of *Alcaligenes eutropus*. *J. Bacteriol.* **177**:6568-6574.
- LaCombe, J., and D. Lueking.** 1990. Growth and maintenance of *Thiobacillus ferrooxidans* Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2801-2806.
- Levicán, G., Katz, A., de Armas, M., Núñez, H. and O. Orellana.** 2007. Regulation of a glutamyl-tRNA synthetase by the heme status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**:3135-40.

- Liu, Z., Guilliani, N., Apia-Ayme, C., Borne, F., Ratouchniak, J. and V. Bonnefoy.** 2000. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J. Bacteriol.* **182**:2269-2276.
- Madigan, M., Martinko, J. and J. Parker.** 2006. Brock biology of microorganisms, 11th ed. Prentice Hall. Pearson Education. Upper Saddle River. N.Y.
- Makita, M., Esperón, M., Pereyra, B., López, A. and E. Orrantía.** 2004. Reduction of arsenic content in a complex galena concentrate by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Biotechnol.* **4**:22.
- Meijer, W., van den Bergh, E. and L. Smith.** 1996. Induction of the *gap-pgk* operon encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase of *Xanthobacter flavus* requires the LysR-type transcriptional activator CbbR. *J. Bacteriol.* **178**:881-887.
- Menon, B.B., Dou, Z., Heinhorst, S., Shively, J. M. and C. G. Cannon.** 2008. *Halothiobacillus neapolitanus* Carboxysomes Sequester Heterologous and Chimeric RubisCO Species. *Plos One* **3**: 3570.
- Mosley, C., Suzuki, J. and C. Bauer.** 1994. Identification and molecular genetic characterization of a sensor kinase responsible for coordinately regulating light harvesting and reaction center gene expression in response to anaerobiosis. *J. Bacteriol.* **176**:7566-7573.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. and T. Senda.** 2003. Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J. Mol. Biol.* **328**:555-566.
- Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N. and H. Saiki.** 2002. Anaerobic respiration using Fe³⁺, S⁰ and H₂ in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **184**:2081-2087.
- Omata, T., Price, G., Badger, M., Okamura, M., Gohta, S. and T. Ogawa.** 1999. Identification of an ATP-binding cassette transporter involved in bicarbonate uptake in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:13571-13576.
- Paoli, G., Vichivanives, P. and F. Tabita.** 1998. Physiological control and regulation of the *Rhodobacter capsulatus cbb* operon. *J. Bacteriol.* **180**:4258-4269.
- Paoli, G., Morgan, N., Tabita, F. and J. Shively.** 1995. Expression of the *cbbL*, *cbbS* and *cbbM* genes and distinct organization of the *cbb* Calvin cycle structural genes of *Rhodobacter capsulatus*. *Arch Microbiol.* **164**:396-405.
- Phillips-Jones, M. and C. Hunter.** 1994. Cloning and nucleotide sequence of *regA*, a putative response regulator gene of *Rhodobacter sphaeroides*. *FEMS Microbiol. Lett.* **116**:269-276.
- Pohlmann, A. et al,** 2006. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* **24**:1257-1262.
- Pulgar, V., Gaete, L., Allende, J., Orellana, O., Jordana, X. and E. Jedlicki.** 1991. Isolation and nucleotide sequence of the *Thiobacillus ferrooxidans* genes for the small and large subunits of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *FEBS. Lett.* **292**:85-89.

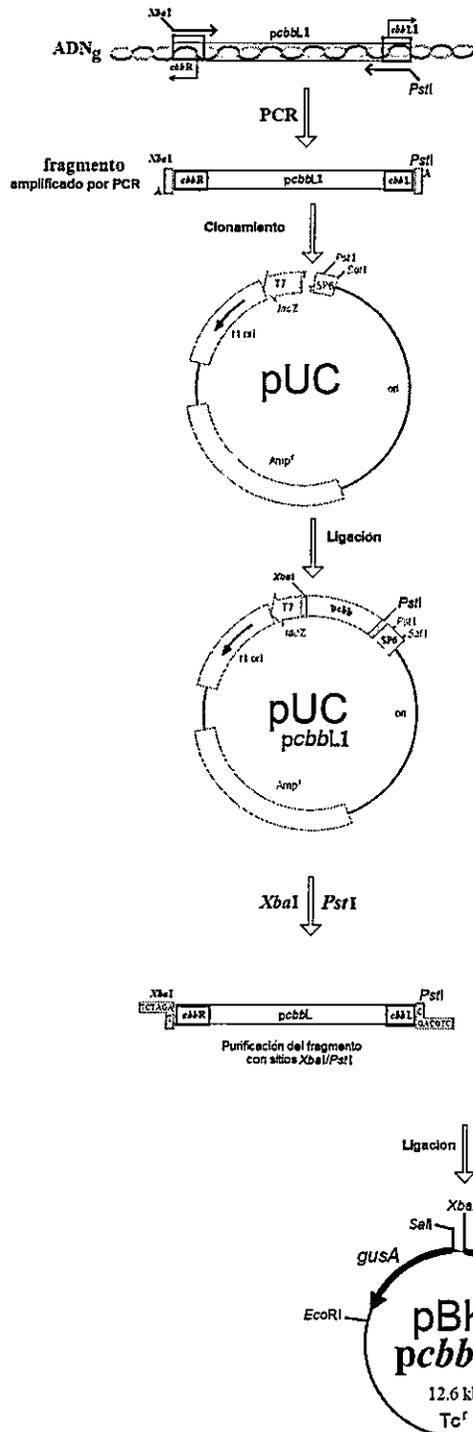
- Qian, Y. and F. Tabita.** 1996. A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO₂ fixation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **178**:12-18.
- Ramírez, P., Guilian, N., Valenzuela, L., Beard, S. and C. A. Jerez.** 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4491-4498.
- Raven, J.** 1996. Inorganic carbon assimilation by marine biota. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **203**:39-47.
- Raven, J.** 2006. Sensing inorganic carbon: CO₂ and HCO₃⁻. *Biochem. J.* **396**: 5-7.
- Rawlings, D., Tributsch, H. and G. Hansford.** 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.
- Rawlings, D. and S. Silver.** 1995. Mining with microbes. *Nature Biotechnology.* **13**:773-778
- Reznikoff, W. Siegele, D., Cowing, D. and C. Gross.** 1985. The regulation of transcription initiation in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **19**:355-387.
- Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D.S. and E. Jedlicki.** 2005. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol Res.* **38**:283-297.
- Romagnoli, S. and T.F. Tabita.** 2007. Phosphotransfer reactions of the CbbRRS three-protein two- component system from *Rhodopseudomonas palustris* CGA010 appear to be controlled by an internal molecular switch on the sensor kinase. *J. Bacteriol.* **189**:325-335.
- Sambrook, J. and D. Russel.** 1989. *Molecular Cloning*, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Schell, M.** 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:597-626.
- Scott, K. et. al.** 2006. The genome of deep-sea vent chemolithoautotroph *Thiomicrospira crunogena* XCL-2. *PLoS Biol* **4**:2196-2212.
- Sganga, M. and C. Bauer.** 1992. Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *Cell.* **68**:945-954.
- Shively, J., English, R., Baker, S. and G. Cannon.** 2001. Carbon cycling: the prokaryote contribution. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:301-306.
- Shively, J., van Keulen, G. and W. Meijer.** 1998. Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:191-230.
- Simon, R., Priefer, U. and A. Pühler.** 1983. A broad-host-range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gramnegative bacteria. *Bio/Technology* **1**:784-791.
- Smith, S. and F. Tabita.** 2002. Up-regulated expression of the *cbb(I)* and *cbb(II)* operons during photoheterotrophic growth of a ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase deletion mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **184**:6721-6724.

- Stouthamer, A.** 1973. A theoretical study of the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* **39**:545-565.
- Strauss, G. and G. Fuchs.** 1993. Enzymes of a novel autotrophic CO₂ fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chlorofexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. *Eur. J. Biochem.* **215**:633-643.
- Tabita, F.** 2007. Homepage Tabita Lab. Department of Microbiology. The Ohio State University. Link: <http://www.osumicrobiology.org/faculty/ftabita.htm>.
- Tabita, F.** 2007a. RubisCO: The enzyme that keeps on giving. *Cell.* **129**:1039-1040.
- Tabita, F.** 1999. Microbial ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: a different perspectiva. *Photosynthesis Res.* **60**:1-28.
- Tabita, F.** 1995. The biochemistry and metabolic regulation of carbon metabolism and CO₂ fixation in purple bacteria. In: *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R.E., Madigan, M.T. and C.E. Bauer. Eds.). pp. 885-914. Kluwer. Dordrecht.
- Tabita, F., Gibson, J., Bowien, B., Dijkhuizen, L. and W. Meijer.** 1992. Uniform designation for the genes of the Calvin-Benson-Bassham reductive pentose phosphate pathway of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **99**: 107-110.
- Takahashi, Y., Yamaguchi, O. and T. Omata.** 2004. Roles of CmpR, a LysR family transcriptional regulator, in acclimation of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 to low-CO₂ and high-light conditions. *Mol. Microbiol.* **52**: 837-845.
- Tanaka, S., Kerfeld, C.A., Sawaya, M. R., Cai, F., Heinhorst, S., Cannon, G. C. and T. O. Yeates.** 2008. Atomic-level models of the bacterial carboxysome shell. *Science.* **319**:1083-1086.
- Terazono, K., Hayashi, N. and Y. Igarashi.** 2001. CbbR, a LysR-type transcriptional regulator from *Hydrogenophilus thermoluteolus*, binds two *cbb* promoter regions, *FEMS Microbiol. Lett.* **198**:151-157.
- Thompson, J., Higgins, D. and T. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- Torma, A., Walden, D., Duncan, W. and R. Branion.** 1972. The effect of carbon dioxide and particle surface area on the microbiological leaching of a zinc sulfide concentrate. *Biotechnol. Bioeng.* **14**: 777-786.
- Toyoda, K., Yoshizawa, Y., Arai, H., Ishii, M. and Y. Igarashi.** 2005. The role of two CbbRs in the transcriptional regulation of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. *Microbiol.* **151**: 3615-3625.
- Umeda, F., Tanaka, N., Kimura, N., Nishie, H., Yagi, K. and Y. Miura.** 1991. *In vivo* cloning of genes determining lithoautotrophy (Aut) on a plasmid from *Alcaligenes hydrogenophilus*. *J. Ferment. Bioeng.* **71**:379-383.
- Valdés, J., Veloso, F., Jedlicki, E. and D. Holmes.** 2003. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics.* **15**:51.

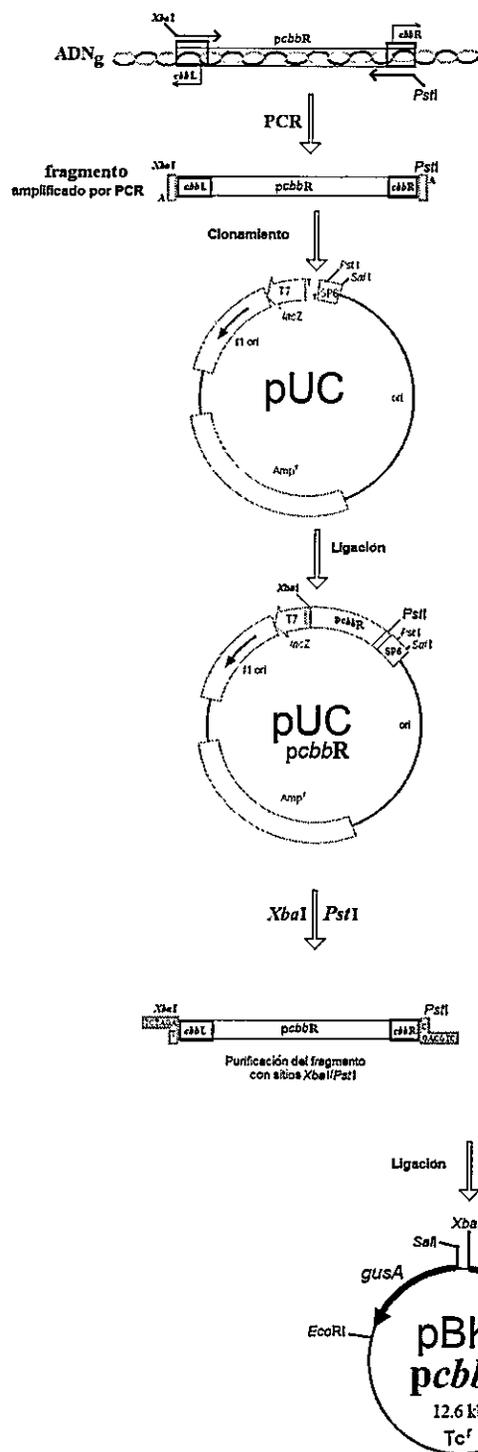
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R.J., Tettelin, H., Blak, R., Eisen, J.A. and D.S. Holmes. 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*. **11**:597-820.
- van den Bergh, E., Dijkhuizen, L. and W. Meijer. 1993. CbbR, a LysR-type transcriptional activator, is required for the expression of the autotrophic CO₂ fixation enzymes in *Xanthobacter flavus*. *J. Bacteriol.* **175**:6097-6104.
- van Keulen, G., Ridder, A., Dijkhuizen, L. And W. Meijer. 2003. Analysis of DNA binding and transcriptional activation by the LysR-type transcriptional regulator CbbR of *Xanthobacter flavus*. *J. Bacteriol.* **185**:1245-1252.
- van Keulen, G., Girbal, L., van den Bergh, E., Dijkhuizen, L. and W. Meijer. 1998. The LysR-type transcriptional regulator CbbR controlling autotrophic CO₂ fixation by *Xanthobacter flavus* is an NADPH sensor. *J. Bacteriol.* **180**:1411-1417.
- Viale, A., Kobayashi, H., Akazawa, T. and S. Heniko. 1991. *rbcR*, a gene coding for a member of the LysR family of transcriptional regulators, is located upstream of the expressed set of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* **173**:5224-5229.
- Vichivanives, P., Bird, T., Bauer, C. and F. Tabita. 2000. Multiple regulators and their interaction *in vivo* and *in vitro* with the *cbb* regulons of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* **300**:1079-1099.
- Watson, G.; Yu, J. and F. Tabita. 1999. Unusual ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of anoxic Archaea. *J. Bacteriol.* **181**:1569-1575.
- Wei, X., Sayavedra-Soto, L. and D. Arp. 2004. The transcription of the *cbb* operon in *Nitrosomonas europaea*. *Microbiol.* **150**, 1869-1879.
- Windhövel, U. and B. Bowien. 1991. Identification of *cfxR*, an activator gene of autotrophic CO₂ fixation in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol. Microbiol.* **5**:2695-2705.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.
- Yates, J. and D. Holmes. 1987. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **169**:1861-1870.
- Yokoyama, K., Hayashi, N., Arai, H., Chung, S., Igarashi, Y. and T. Kodama. 1995. Genes encoding RubisCO in *Pseudomonas hydrogenothermophila* are followed by a novel *cbbQ* gene similar to *nirQ* of the denitrification gene cluster from *Pseudomonas* species. *Gene*. **153**:75-79.
- Yoshizawa, Y., Toyoda, K., Arai, H., Ishii, M. and Y. Igarashi. 2004. CO₂-responsive expression and gene organization of three ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase enzymes and carboxysomes in *Hydrogenovibrio marinus* strain MH-110. *J. Bacteriol.* **178**: 347-356.

ANEXOS

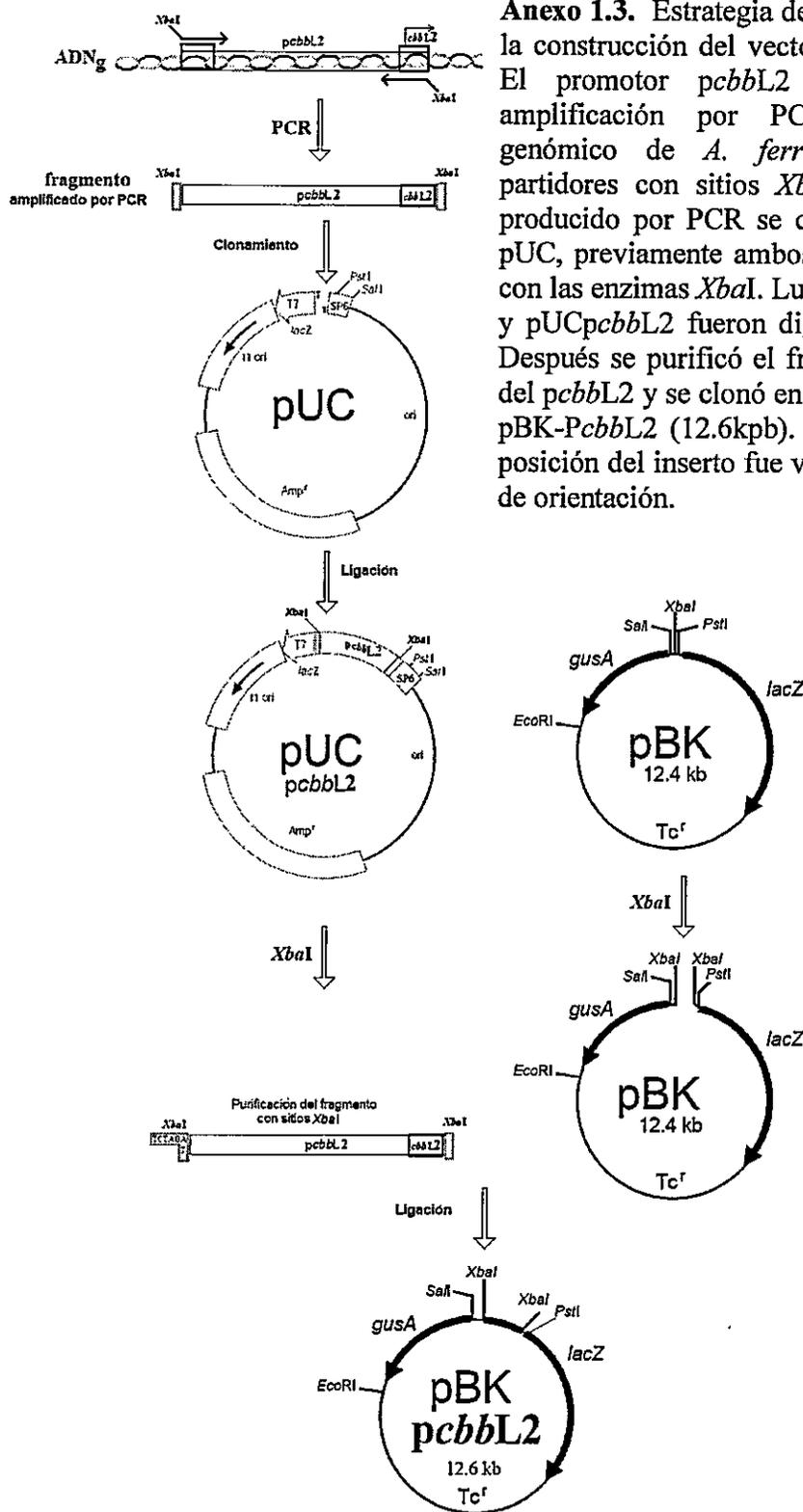
Anexo 1. Construcciones plasmidiales del promotor *cbb* de *A. ferrooxidans* fusionado con el gen *lacZ*



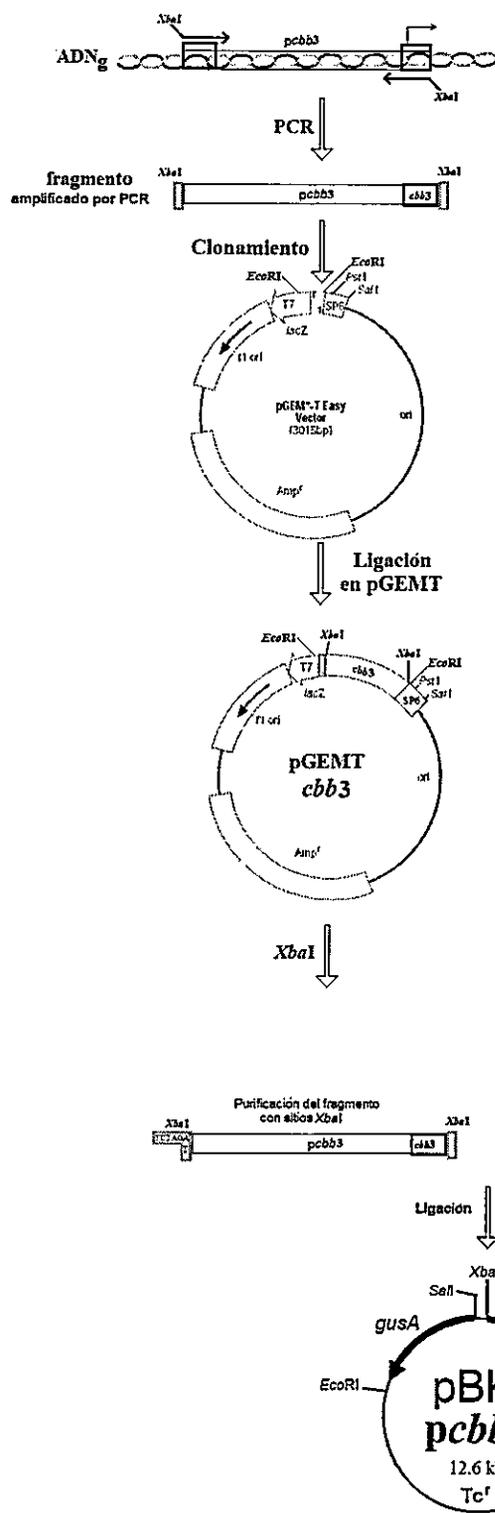
Anexo 1.1. Estrategia de clonamiento para la construcción del vector pBK-PcbbL1. El promotor *pcbbL1* se generó por amplificación por PCR desde ADN genómico de *A. ferrooxidans* usando partidores con sitios *Xba*I o *Pst*I. El fragmento producido por PCR se clonó en el vector pUC, previamente ambos fueron digeridos con las enzimas *Xba*I y *Pst*I. Luego el vector pBK y pUC-PcbbL1 fueron digeridos con *Xba*I y *Pst*I. Después se purificó el fragmento de ADN del *pcbbL1* y se clonó en pBK para generar pBK-PcbbL1 (12.6kpb).



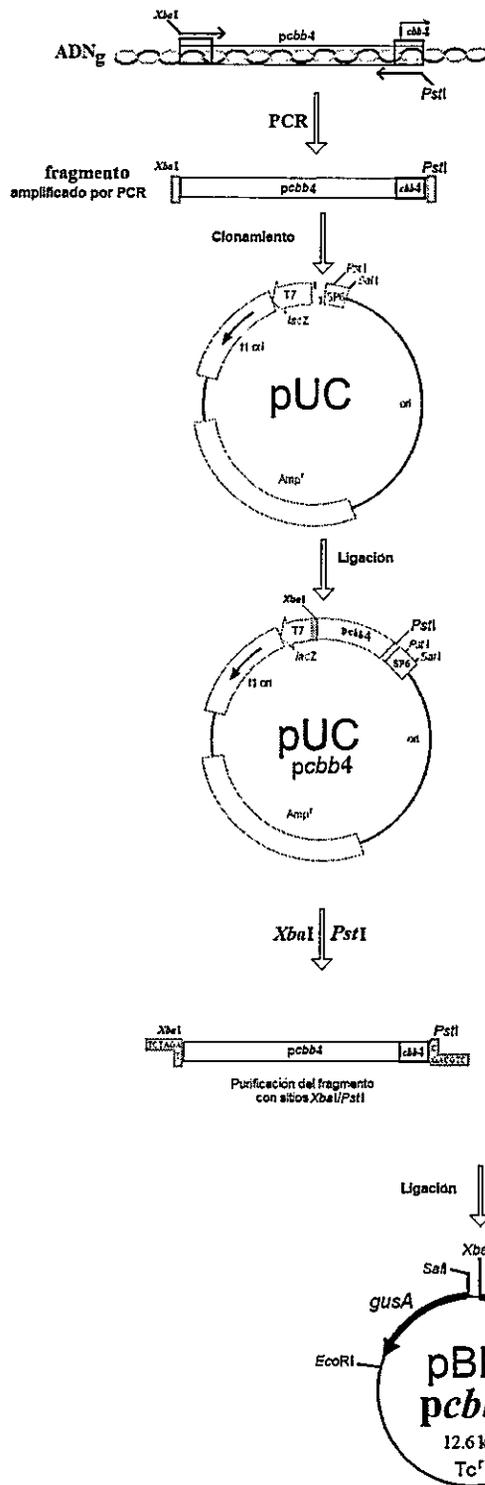
Anexo 1.2. Estrategia de clonamiento para la construcción del vector pBK-PcbbR. El promotor *pcbbR* se generó por amplificación por PCR desde ADN genómico de *A. ferrooxidans* usando partidores con sitios *XbaI* o *PstI*. El fragmento producido por PCR se clonó en el vector pUC, previamente ambos fueron digeridos con las enzimas *XbaI* y *PstI*. Luego el vector pBK y pUC-PcbbR fueron digeridos con *XbaI* y *PstI*. Después se purificó el fragmento de ADN del *pcbbR* y se clonó en pBK para generar pBK-PcbbR (12.6kpb).



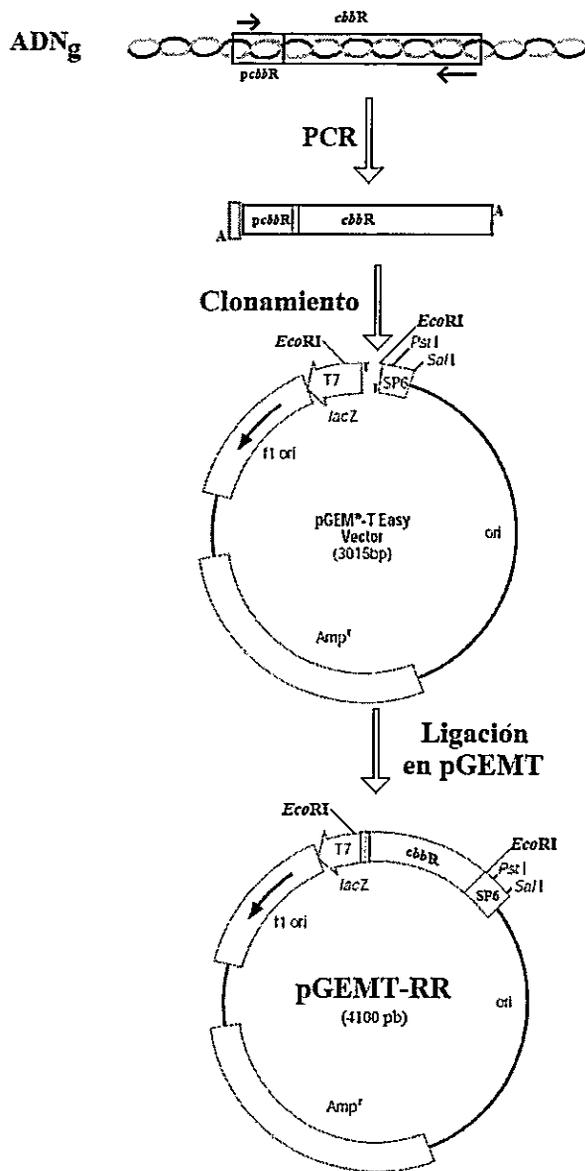
Anexo 1.3. Estrategia de clonamiento para la construcción del vector pBK-PcbbL2. El promotor *pcbbL2* se generó por amplificación por PCR desde ADN genómico de *A. ferrooxidans* usando partidores con sitios *XbaI*. El fragmento producido por PCR se clonó en el vector pUC, previamente ambos fueron digeridos con las enzimas *XbaI*. Luego el vector pBK y pUCpcbbL2 fueron digeridos con *XbaI*. Después se purificó el fragmento de ADN del *pcbbL2* y se clonó en pBK para generar pBK-PcbbL2 (12.6kpb). Luego la correcta posición del inserto fue verificada por PCR de orientación.



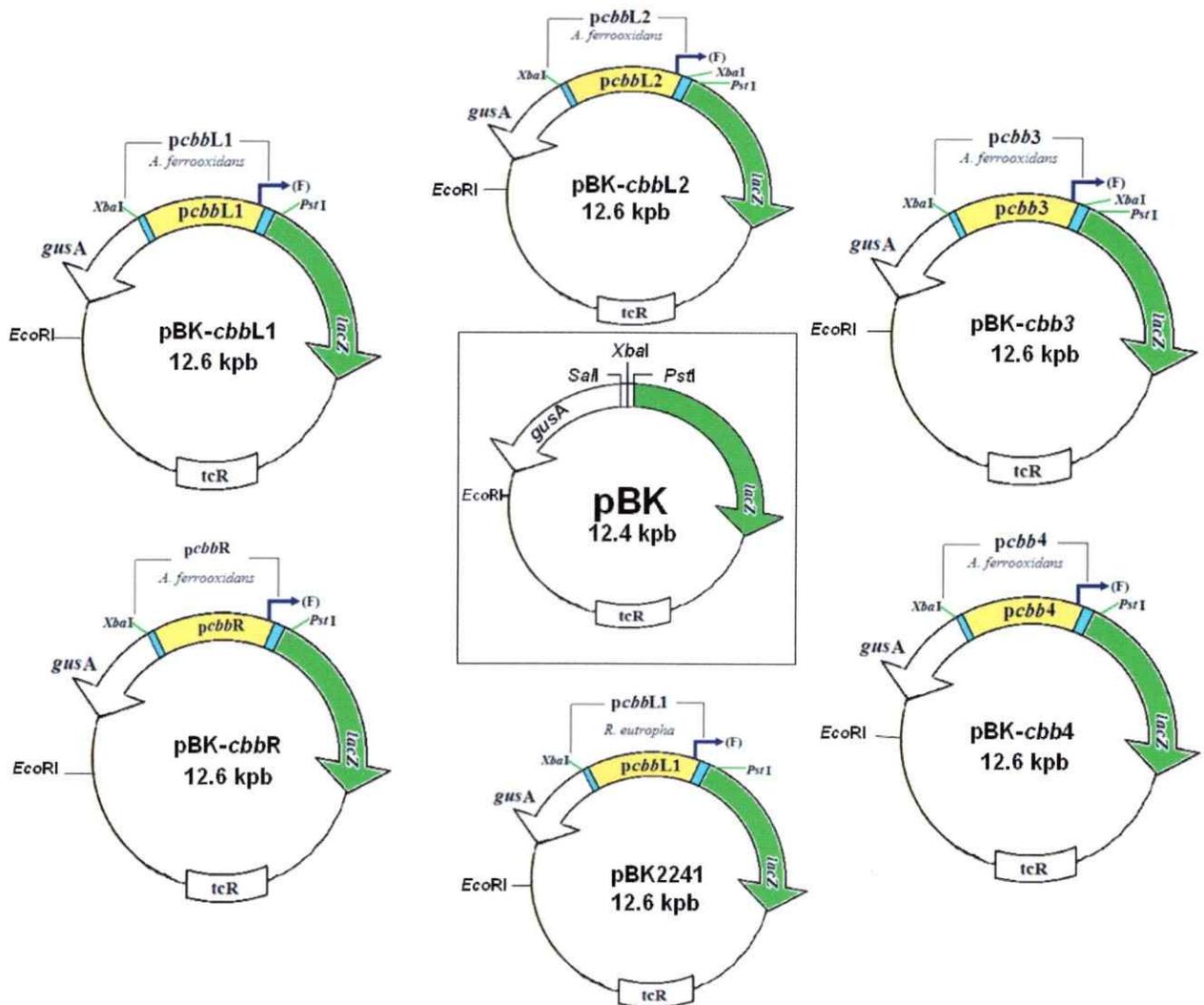
Anexo 1.4. Estrategia de clonamiento para la construcción del vector pBK-Pcbb3. El promotor *pcbb3* se generó por amplificación por PCR desde ADN genómico de *A. ferrooxidans* usando partidores con sitios *Xba*I. El fragmento producido por PCR se clonó en el vector pGEMT previamente digerido con la enzima *Xba*I. Luego el vector pBK y pGEMT-Pcbb3 fueron digeridos con *Xba*I. Después se purificó el fragmento de ADN del *pcbb3* y se clonó en pBK para generar pBK-Pcbb3 (12.6kpb). Luego la correcta posición del inserto fue verificada por PCR de orientación.



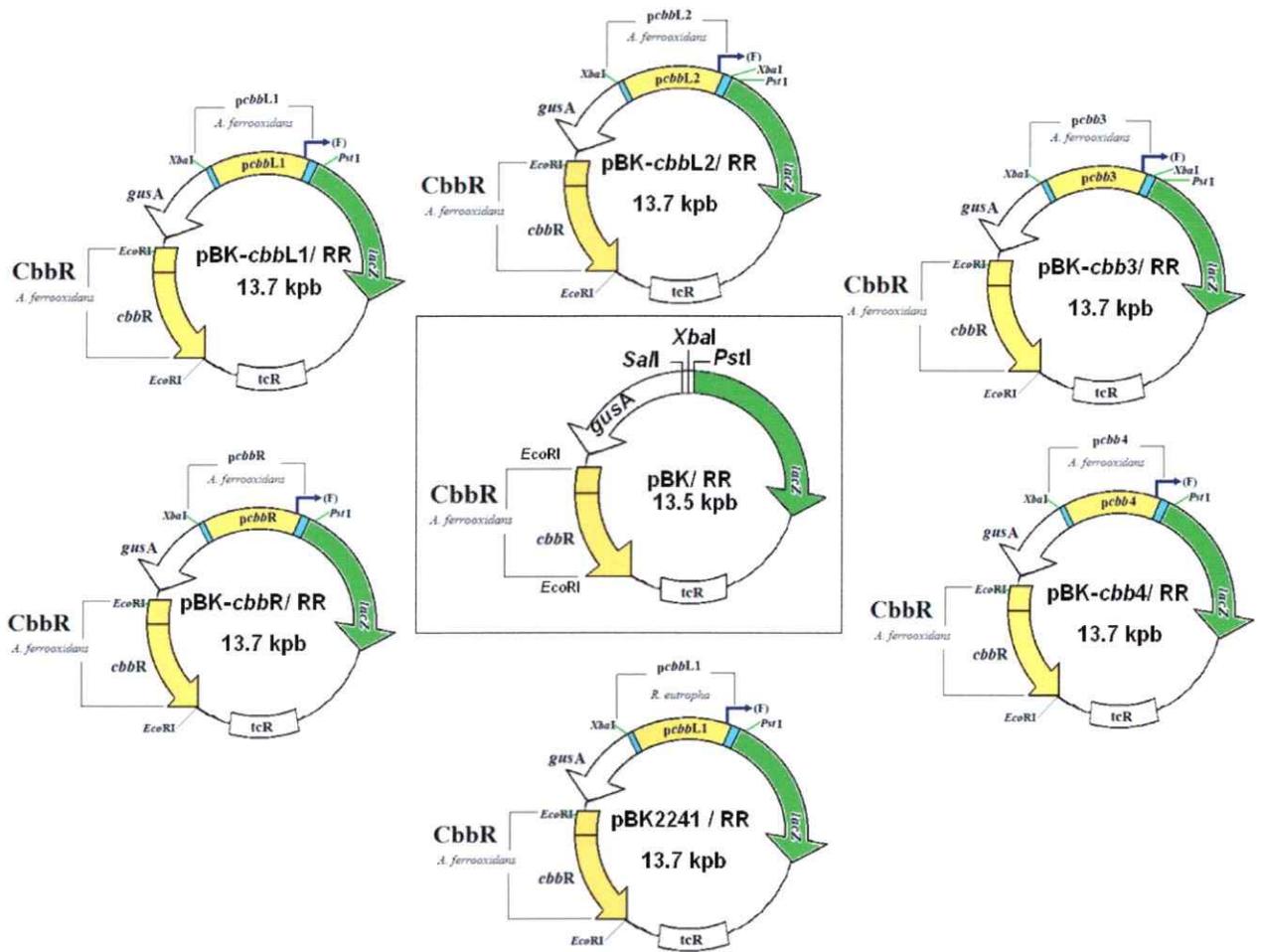
Anexo 1.5. Estrategia de clonamiento para la construcción del vector pBK-Pcbb4. El promotor *pcbb4* se generó por amplificación por PCR desde ADN genómico de *A. ferrooxidans* usando partidores con sitios *XbaI* o *PstI*. El fragmento producido por PCR se clonó en el vector pUC previamente ambos fueron digeridos con las enzimas *XbaI* y *PstI*. Luego el vector pBK y pUC-Pcbb4 fueron digeridos con *XbaI* y *PstI*. Después se purificó el fragmento de ADN del *pcbb4* y se clonó en pBK para generar pBK-Pcbb4 (12.6kpb).



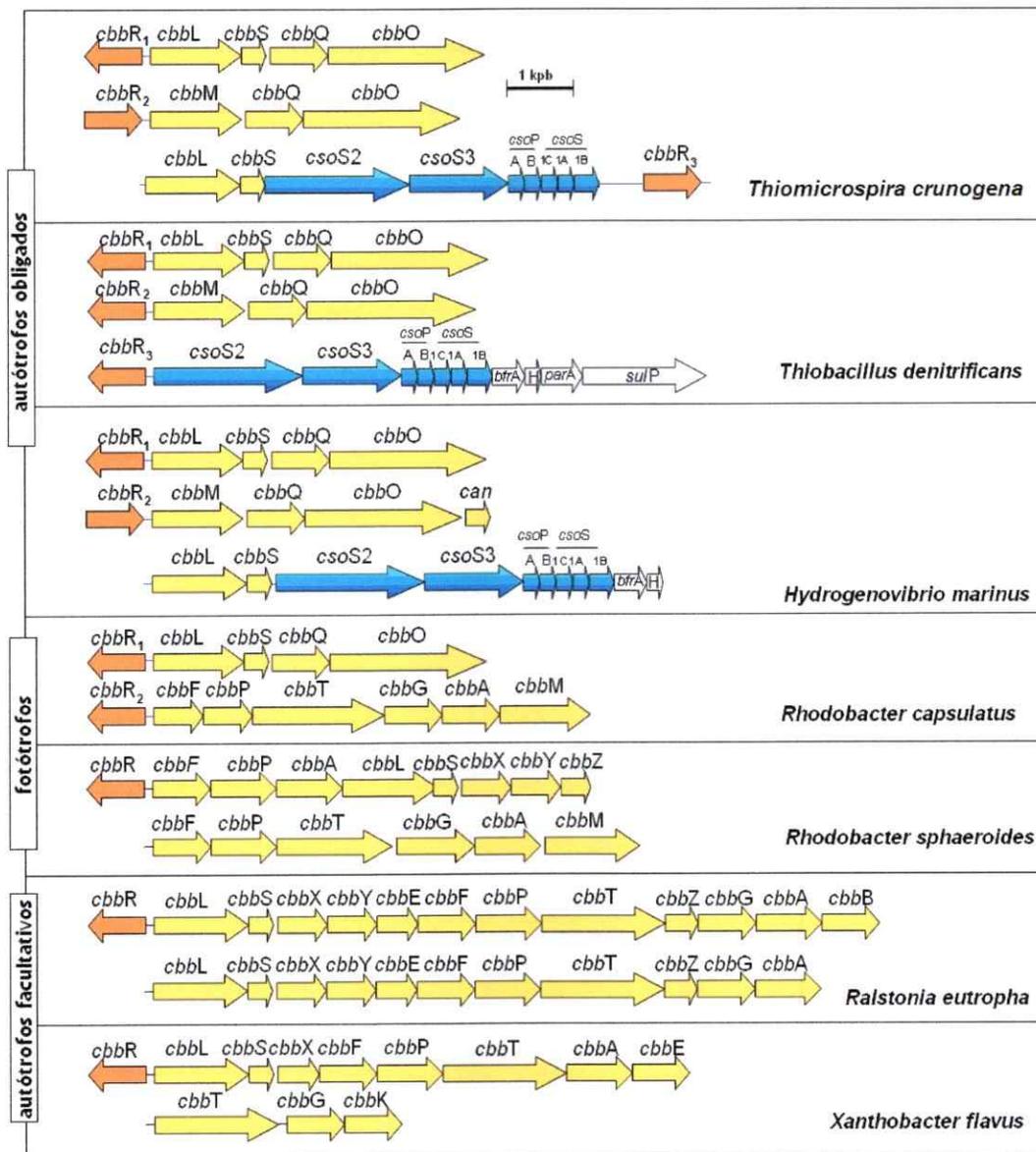
Anexo 1.6. Estrategia de clonamiento para la construcción del vector pGEMT conteniendo la región de ADN que codifica para el gen *cbbR* de *A. ferrooxidans* con su propio promotor (RR). El fragmento de ADN se generó por amplificación por PCR desde ADN genómico de *A. ferrooxidans* usando oligonucleótidos específicos. El fragmento producido se clonó en el vector pGEMT para generar pGEMT-RR (4.1 kpb).



Anexo 1.7. Lista de plásmidos pBK conteniendo la fusión del promotor *cbb* a *lacZ* usados en esta tesis. El vector pBK (en cuadro) presenta los genes reporteros *gusA* (β -glucoronidasa) y *lacZ* (β -galactosidasa). Los sitios de clonamiento *XbaI* y *PstI* fueron usados para insertar la región del promotor *cbb* de *A. ferrooxidans* o *R. eutropha* en pBK generando las construcciones pBK-PcbbL1, pBK-PcbbL2, pBK-Pcbb3, pBK-Pcbb4, pBK-PcbbR y pBK2241. La flecha azul (F) indica la dirección de la transcripción. tcR indica gen de resistencia a tetraciclina.



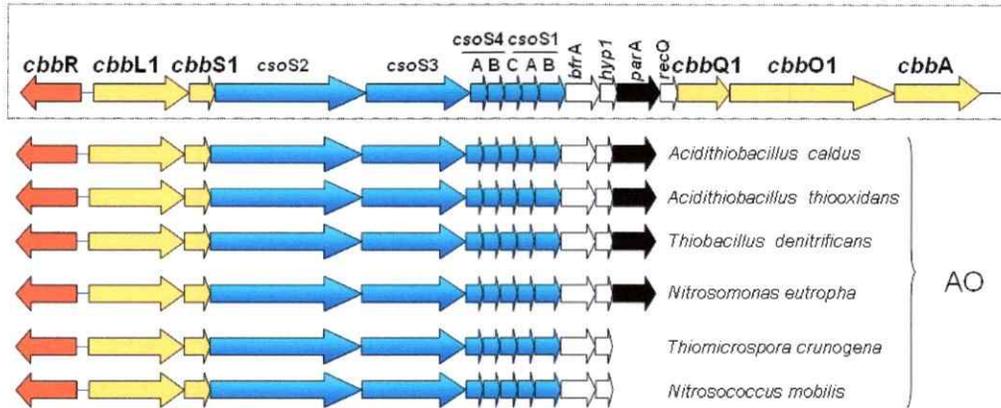
Anexo 1.8. Lista de plásmidos pBK conteniendo la fusión del promotor *cbb* a *lacZ* y la región que codifica para el gen *cbbR* de *A. ferrooxidans* con su propio promotor. El vector pBK/RR (en cuadro) presenta los genes reporteros *gusA* (β -glucoronidasa) y *lacZ* (β -galactosidasa) y la secuencia que codifica para el gen *cbbR* con su propio promotor (secuencia RR en sitios *EcoRI*). Los sitios de clonamiento *XbaI* y *PstI* fueron usados para insertar la región del promotor *cbb* de *A. ferrooxidans* o *R. eutropha* en pBK generando las construcciones pBK-*PcbbL1*/RR, pBK-*PcbbL2*/RR, pBK-*Pcbb3*/RR, pBK-*Pcbb4*/RR, pBK-*PcbbR*/RR y pBK2241/RR. La flecha azul (F) indica la dirección de la transcripción. tcR indica gen de resistencia a tetraciclina.



Anexo 2. Organización de los genes del ciclo de Calvin en bacterias autótrofas obligadas, facultativas y fotótrofas. La ribulosa bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (RubisCO) se presenta como forma I (*cbbL*) y forma II (*cbbM*). Las flechas amarillas representan a los genes que codifican para las enzimas del ciclo de Calvin, las flechas celestes representan a los genes que codifican para las proteínas estructurales del carboxisoma y las flechas naranjas indica al gen que codifica para el regulador transcripcional CbbR.

Operón *cbbL1* (16 genes)

Acidithiobacillus ferrooxidans

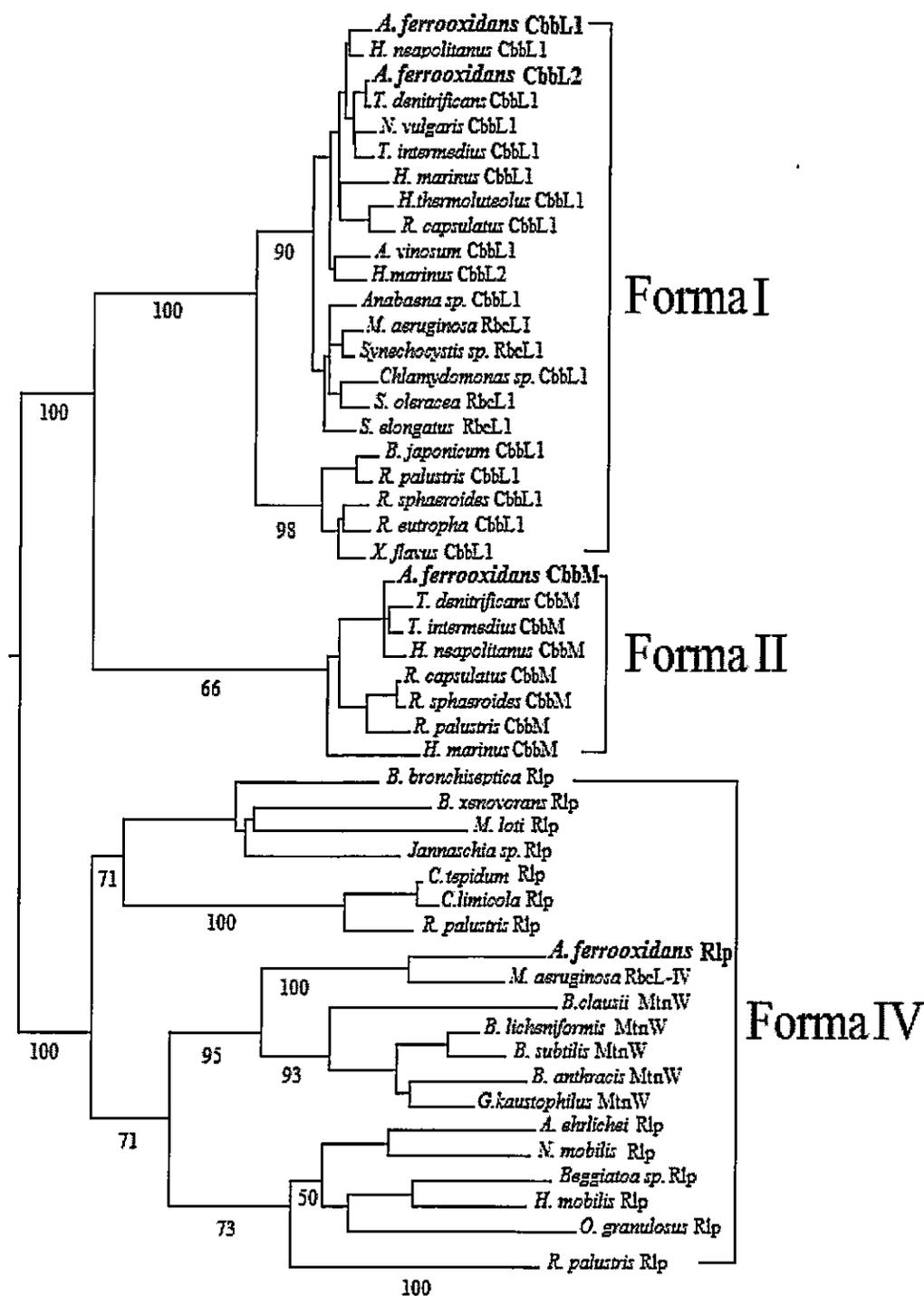


AO: Autótrofos obligados

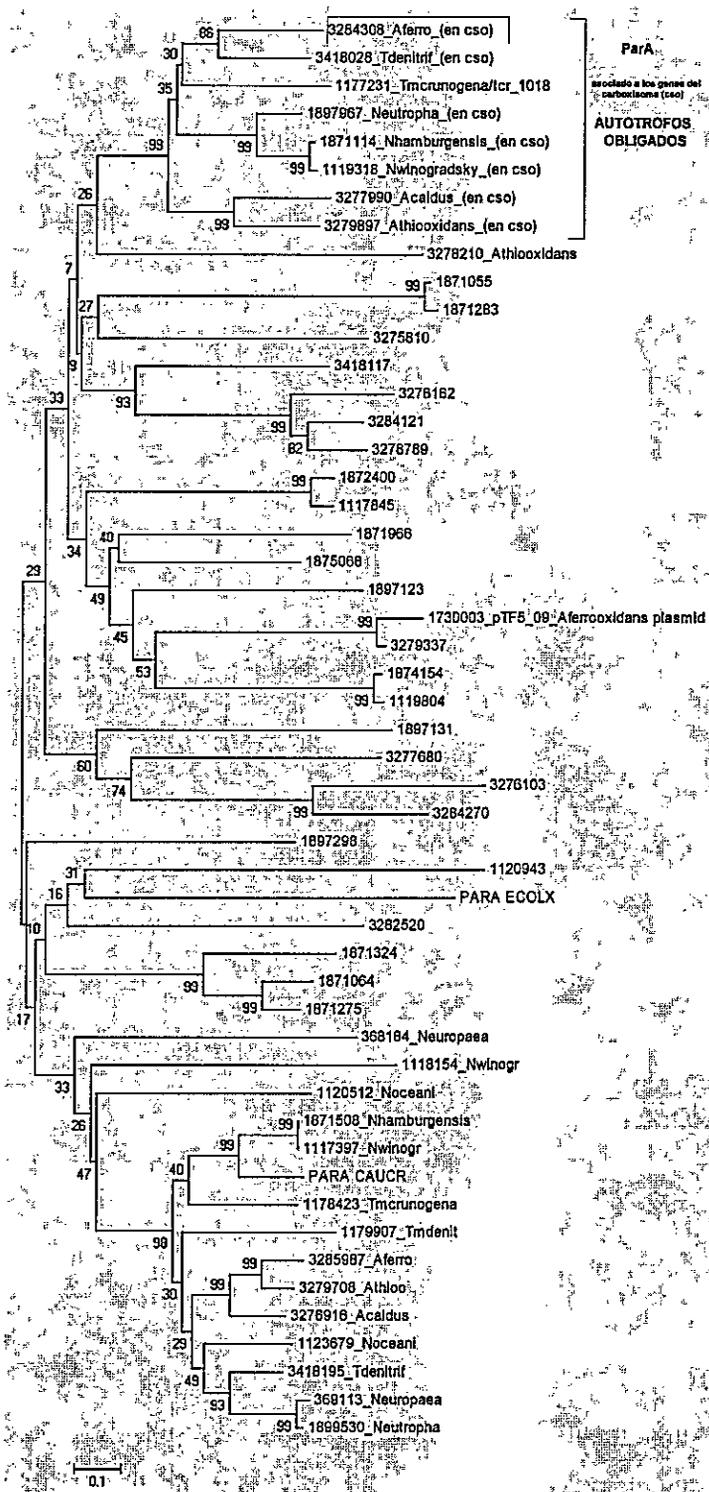
Anexo 3. Contexto génico del gen de partición *parA* presente en el operón *cbbL1* de *A. ferrooxidans* y su conservación génica en bacterias autótrofas obligadas. Los contextos génicos fueron obtenidos mediante análisis de FastBlastP en la base de datos www.microbesonline.org. La columna con línea celeste indica la localización del gen *parA*.

RubisCOs	Bacteria	50	C	R	117	C	167	C	C	189	C	CC	C	CC																																	
Forma I	Syn-RbcL1	VAAAVAA	ES	STG	TWS	..LVGN	VFG	FKAL	..LGCTI	REPKL	GLSG	..CLRGE	DE	TKODENIN																																	
	Thne-CbbL1	AAAAVAA	ES	STG	TWT	..LVGN	VFG	FKAV	..LGCTI	REPKL	GLSA	..CLRGE	DE	TKODENIN																																	
	Af-CbbL1	AAAAVAA	ES	STG	TWT	..LVGN	VFG	FKAV	..LGCTI	REPKL	GLSA	..CLRGE	DE	TKODENVN																																	
Forma II	Thde-CbbM	AAAHFAA	ES	STG	TN	..AIGN	NQG	MGDI	..AGTII	REPKL	GLRP	..QFWL	GE	DEIKNDEPQG																																	
	Rr-CbbM	TAAHFAA	ES	STG	TN	..TMGN	NQG	MGDV	..VGTII	REPKL	GLRP	..AFWL	GE	DEIKNDEPQG																																	
Forma IV	Af-CbbM	AAAHFAA	ES	STG	TN	..VIGN	NQG	MGDI	..AGTII	REPKL	GLRP	..QFWL	GE	DEIKNDEPQG																																	
	Ct-RLP	ALAHFCSE	Q	STA	QWK	..VCGE	G	TYFTP	..FFGV	V	REN	IGL	SP	..SWLGE	LDIAR	ODEMLA																															
	Bs-MtnW	KAEQIAT	G	LT	V	GS	W	..VFG	K	L	S	---LD	..LMSI	R	GV	I	GRDL	..QALG	E	V	DLI	K	DE	IFF																							
Af-RLP	QAQATAI	G	Q	T	A	G	S	W	..IFG	K	Y	S	---LA	..VMAI	R	P	A	L	G	L	T	A	..VAV	A	E	D	I	K	D	E	I	L	P														
RubisCO motif=ExDFXKxDE																																															
		285	CR	320	R	C	372	R	R	399	RR																																				
Forma I	Syn-RbcL1	GMLLH	H	R	A	M	H	A	V	..GGD	Q	L	H	T	G	T	V	-V	G	K	L	E	G	..G	V	F	A	V	A	S	G	G	I	H	V	W	..V	L	Q	F	G	G	T	H			
	Thne-CbbL1	GVLLH	H	R	A	M	H	A	V	..GGD	H	L	H	T	G	T	V	-V	G	K	L	E	G	..G	V	F	A	V	A	S	G	G	I	H	V	W	..V	L	Q	F	G	G	T	L			
	Af-CbbL1	GTLLH	H	R	A	M	H	A	V	..GGD	H	L	H	T	G	T	V	-V	G	K	L	E	G	..G	V	F	A	V	A	S	G	G	I	H	V	W	..V	F	Q	F	G	G	T	L			
Forma II	Af-CbbL2	GMLLH	H	R	A	M	H	A	V	..GGD	H	L	H	T	G	T	V	-V	G	K	L	E	G	..G	V	M	P	V	A	S	G	G	I	H	V	W	..V	L	Q	F	G	G	T	L			
	Thde-CbbM	GOYLH	H	R	A	G	H	G	A	..G	A	S	G	I	H	V	G	T	M	G	Y	K	M	E	G	..P	T	P	I	S	G	G	M	N	A	L	R	..I	N	T	A	G	G	S	Y		
Forma IV	Rr-CbbM	DNFLH	H	R	A	G	H	G	A	..G	A	S	G	I	H	T	G	T	M	G	F	K	M	E	G	..A	C	T	P	I	S	G	G	M	N	A	L	R	..I	L	T	A	G	G	A	F	
	Af-CbbM	GOYLH	H	R	A	G	H	G	M	..G	A	S	G	I	H	V	G	T	M	G	Y	K	M	E	G	..P	T	P	I	S	G	G	M	N	A	L	R	..I	N	T	A	G	G	S	Y		
Forma IV	Ct-RLP	---LIG	H	E	P	F	L	A	S	..G	L	D	V	V	I	M	P	G	F	G	D	R	M	T	P	..P	C	L	P	V	E	G	S	D	S	A	L	T	..G	F	V	P	C	R	G	V	F
	Bs-MtnW	-VPI	M	A	H	P	V	S	G	..C	G	A	D	F	S	L	F	P	S	P	Y	G	S	V	A	---Q	T	F	A	V	S	A	G	I	H	P	G	M	..I	I	N	A	G	G	V	H	
Af-RLP	-VPI	F	A	H	E	S	L	A	G	..G	G	A	D	A	V	L	P	A	Q	Y	G	S	L	P	---G	V	A	P	V	S	S	G	V	H	P	G	M	..I	L	N	A	G	T	G	I	M	

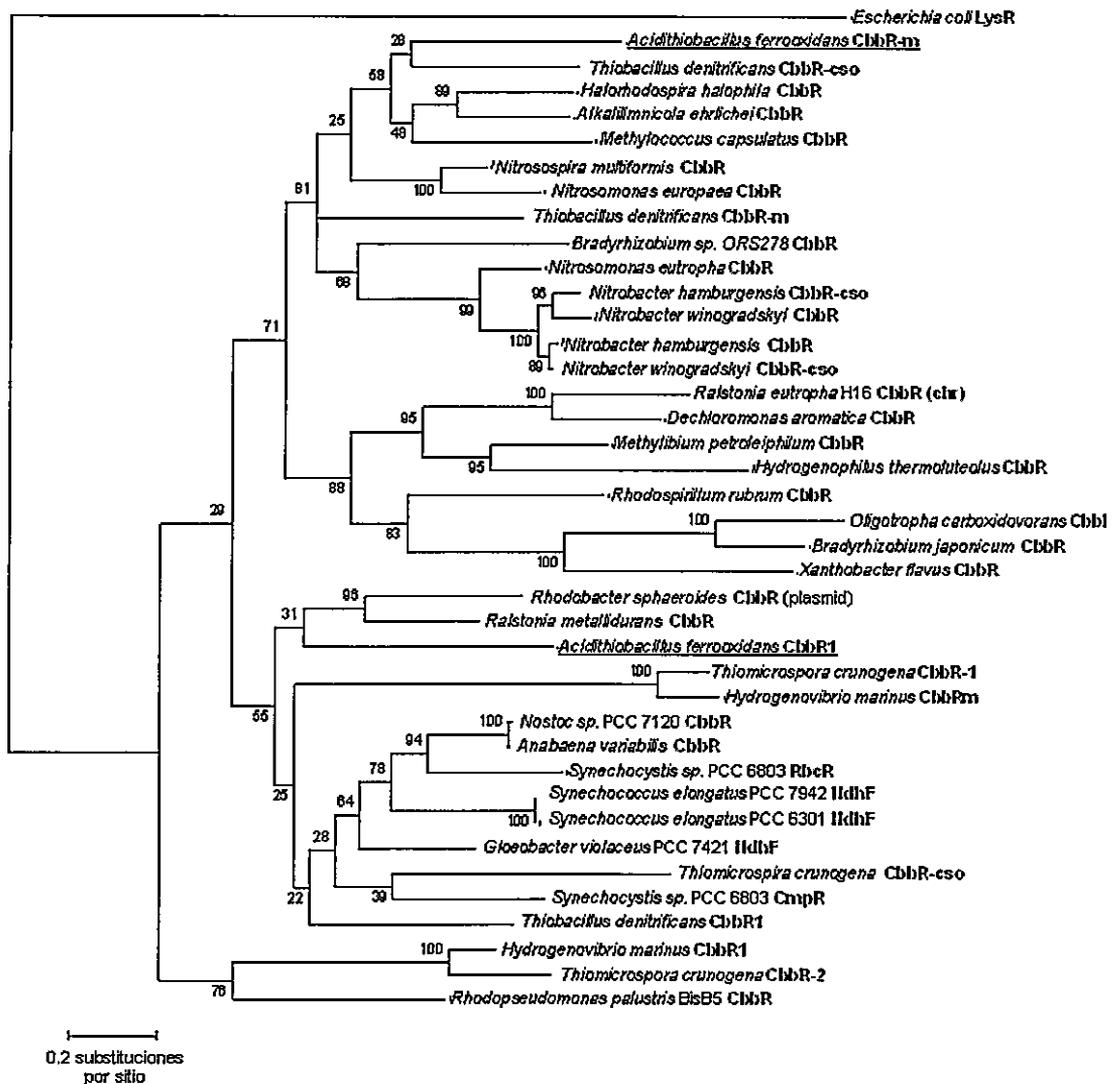
Anexo 4.1 Alineamientos de las secuencias parciales de aminoácidos de la subunidades largas de las RubisCOs forma I, II y IV del quimiolitotrofo *A. ferrooxidans* comparado con otras bacterias autótrofas. Únicamente se alineó las secuencias que poseen a los residuos de aminoácidos que están involucrados en la reacción de la RubisCO. Los residuos del sitio activo están resaltados con fondo negro. Las letras C y R en la parte superior del alineamiento indican a los residuos involucrados en la catálisis y unión de Ru-1,5-BP respectivamente. El alineamiento principal esta numerado en concordancia con la secuencia de la RubisCO de *Synechococcus* sp. PCC 7920. Las abreviaturas se describen a continuación: *Thiobacillus neapolitanus* (Thne), *Thiobacillus denitrificans* (Thde), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Af), *Rhodospirillum rubrum* (Rr), *Chlorobium tepidum* (Ct) and *Bacillus subtilis* (Bs).



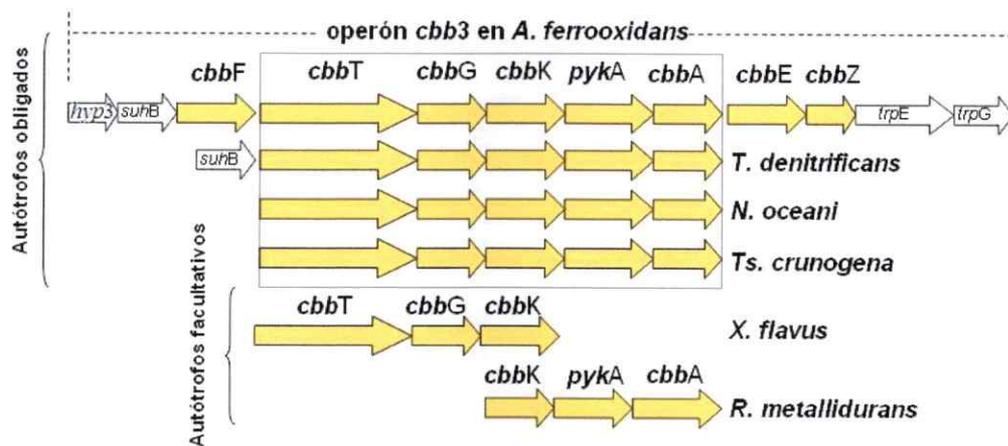
Anexo 4.2. Árbol filogenético de las formas I, II y IV de la RubisCO en organismos autótrofos. Los alineamientos múltiples de las secuencia de aminoácidos de la subunidad larga de la RubisCO fueron producidos por Clustal W y el árbol fue generado por PHYLIP. Los valores de bootstrapping indicados en los nodos corresponden al porcentaje de veces en que un nodo particular aparece en 1 000 ensayos. Las RubisCOs de *A. ferrooxidans* están resaltada en negrita. Las secuencias de proteína de todos los organismos usados en este análisis fueron obtenidas desde la base de datos del NCBI.



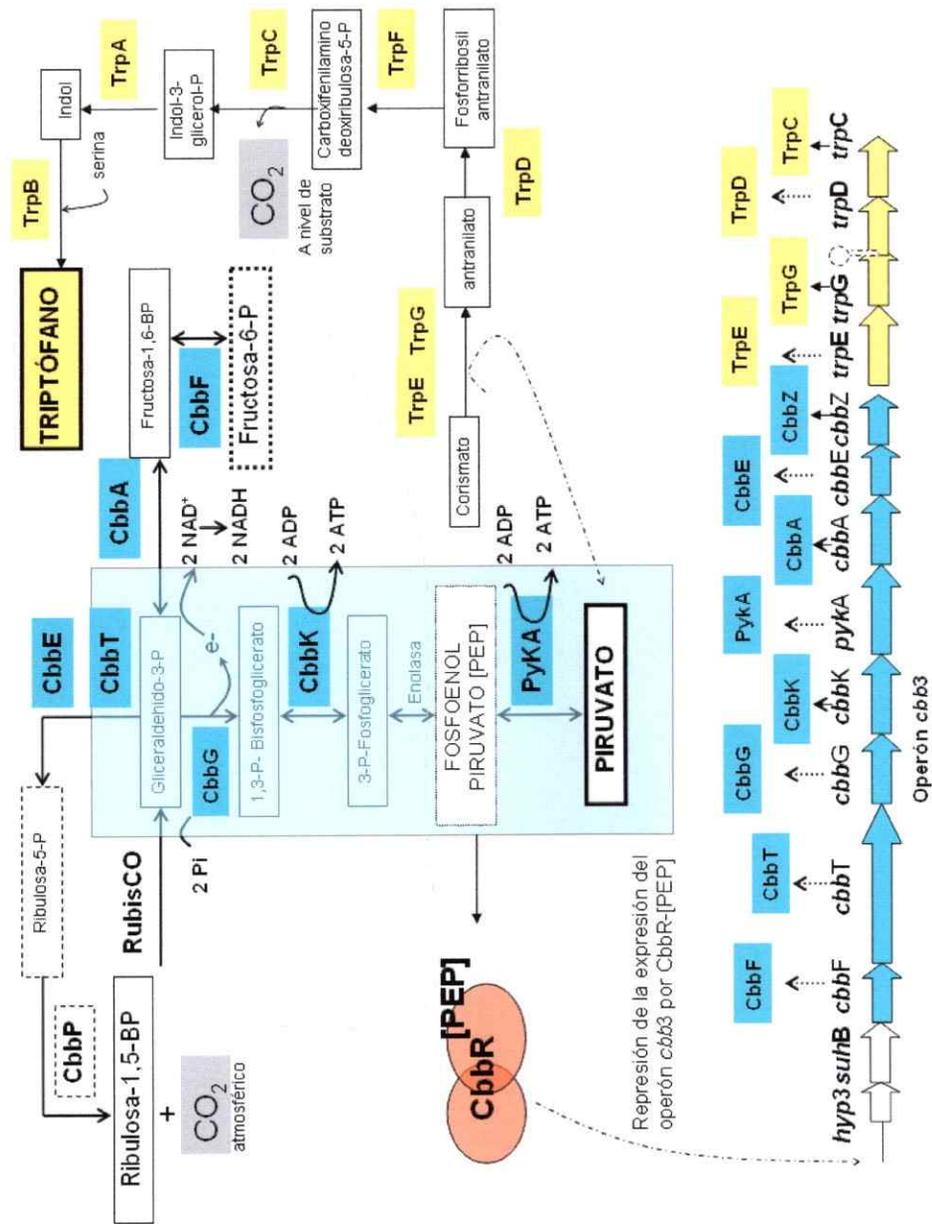
Anexo 4.2. Árbol filogenético de las proteínas de partición ParA presentes en organismos autótrofos. Los alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de ParA fueron producidos por Clustal W y el árbol fue generado por MEGA4. La localización de la proteína ParA de *A. ferrooxidans* se indica en un recuadro. Los valores de bootstrapping indicados en los nodos corresponden al porcentaje de veces en que un nodo particular aparece en 1000 ensayos. Las secuencias de proteína de todos los organismos usados en este análisis fueron obtenidas desde la base de datos del NCBI. Los números al final de cada rama indican el acceso de la secuencias para la proteína ParA depositadas en genbank en www.microbesonline.org.



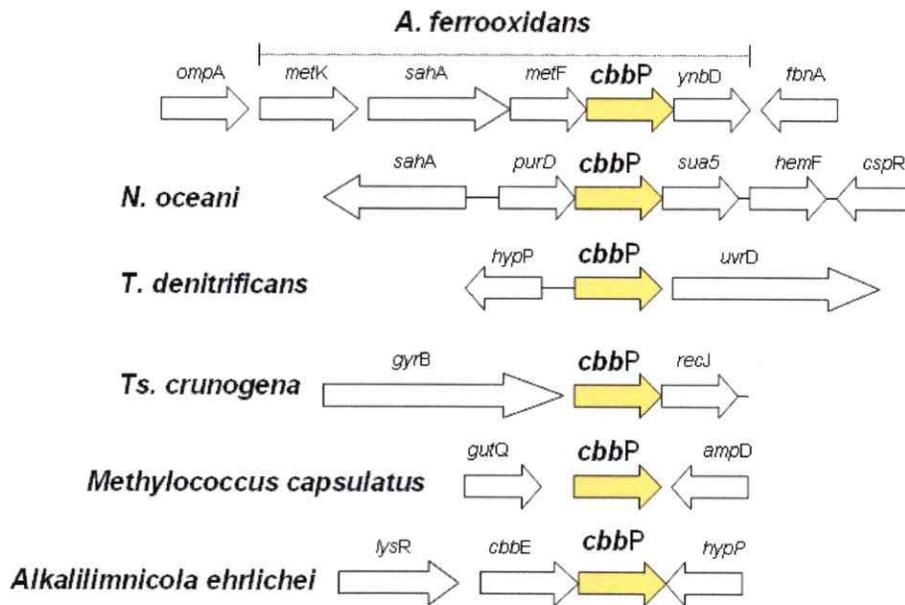
Anexo 4.3. Árbol filogenético de las proteínas regulatorias CbbR en organismos autótrofos. Los alineamientos múltiples de la secuencia de aminoácidos de las proteínas CbbR fueron producidos por Clustal W y el árbol fue generado por MEGA4. Los valores de bootstrapping indicados en los nodos corresponden al porcentaje de veces en que un nodo particular aparece en 1000 ensayos. La dos proteínas predichas para CbbR de *A. ferrooxidans* están subrayadas. Las secuencias de proteína de todos los organismos usados en este análisis fueron obtenidas desde la base de datos del NCBI.



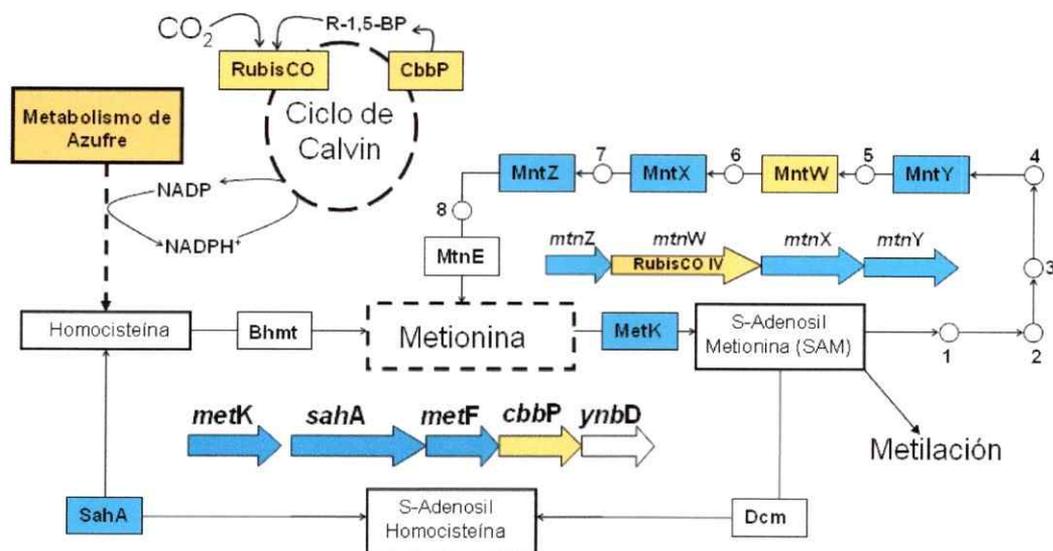
Anexo 5. Contexto génico del operón *cbb3* de *A. ferrooxidans* y su conservación génica en bacterias autótrofas obligadas y autótrofas facultativas. Los contextos génicos fueron obtenidos mediante análisis de FastBlastP en la base de datos www.microbesonline.org.



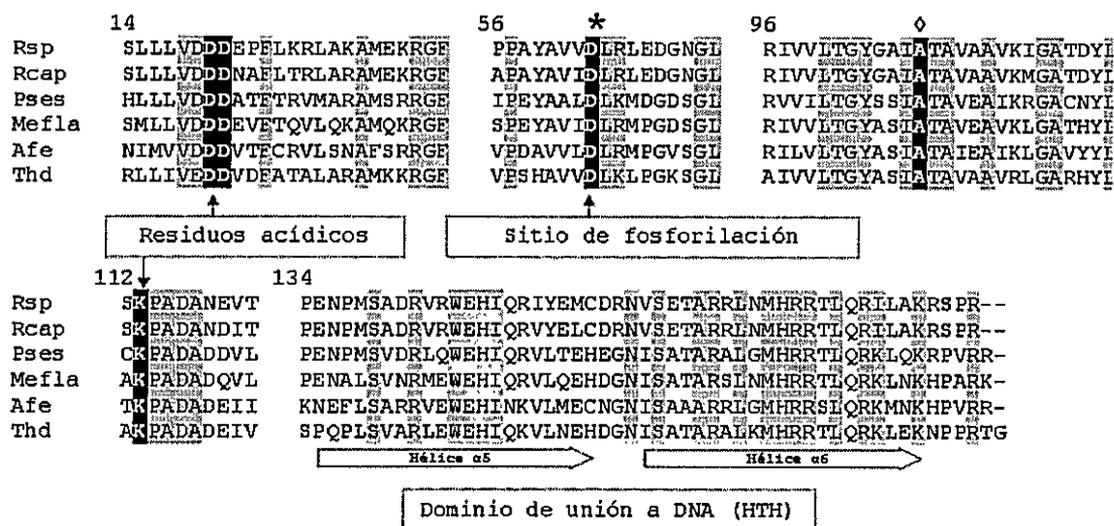
Anexo 6. Control metabólico y genético del operón *cbb3* por CbbR en *A. ferrooxidans*. Los productos génicos del operón *cbb3* están involucrados tanto en la producción del cofactor de PEP para CbbR como en la producción de CO₂ intracelular a partir del metabolismo del triptófano.



Anexo 7. Contexto génico del operón *cbb4* de *A. ferrooxidans* y su conservación génica en bacterias autótrofas obligadas. Los contextos génicos fueron obtenidos mediante análisis de FastBlastP en la base de datos www.microbesonline.org.



Anexo 8. Los genes del ciclo de Calvin de *A. ferrooxidans* que codifican para la fosforribuloquinasa (*cbbP*) y la RubisCO forma IV (RLP) se encuentran en un contexto génico relacionado con la biosíntesis de metionina y metabolismo de azufre. Esta red metabólica obtiene la energía derivada del metabolismo de azufre para fijar CO_2 . Los productos génicos del operón *cbb4* y del operón RLP de *A. ferrooxidans* que participan en el metabolismo de metionina se mencionan a continuación: MetK, S-adenosil metionina sintetasa; SahA, S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa; MetF, 5,10-metilenotetrahidrofolato reductasa; MtnZ, acireductona dioxigenasa; MtnW, 2,3-diketo-5-metil-1-fosfopentil-1-fosfato enolasa; MtnX, 2,3-diketo-5-metil-1-fosfopentano fosfatasa; MtnY, metiltioribulosa-1-fosfato deshidratasa. Los productos de las reacciones numeradas se indican a continuación: 1. Adenosil metioninamina; 2. Metiltioribosa; 3. Metiltioribosa fosfato; 4. Metiltioribulosa fosfato; 5. Diketometil tiopentilfosfato; 6. Hidroxiketometil tiopentil fosfato; 7. Dihidroxiketometil tiopentano y 8. Metiltio oxobutanoato. Las siguientes enzimas corresponden a Bhmt, Betaína-homocisteína metiltransferasa; Dcm, DNA citosina metilasa y MtnE, Transaminasa. R-1,5-BP indica Ribulosa-1,5-bisfosfato.



Anexo 9. Alineamiento parcial de aminoácidos de los homólogos de RegA presentes en las bases de datos genbank. Cada secuencia de aminoácidos tiene un residuo de ácido aspártico (*) conservado para aceptar el fosfato. Los residuos con fondo gris y negro indican 100% de conservación. La alanina (0) es responsable de conferir el fenotipo RegA* que es capaz de fosforilar preferentemente *in vitro* que *in vivo* (Bird y cols., 1999). El dominio de unión a DNA se denota por las flechas que indican hélice ($\alpha 5$) vuelta hélice ($\alpha 6$). Las siglas para bacterias corresponden a *Rhodobacter sphaeroides* (Rsp), *Rhodobacter capsulatus* (Rcap), *Pseudomonas syringae* (Pses), *Methylobacillus flagellatus* (Mefla), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Afe) y *Thiobacillus denitrificans* (Thd). Las posiciones de los aminoácidos alineados están en concordancia con la secuencia de RegA para *R. sphaeroides*.