

UCH-FC  
DOC - Microbiología  
R 173  
C.1

**ESTUDIOS PROTEÓMICOS Y GENÓMICOS DEL  
METABOLISMO DE COMPUESTOS AZUFRADOS EN EL  
MICROORGANISMO ACIDÓFILO QUIMIOLITOTRÓFICO**

***Acidithiobacillus ferrooxidans***

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar el grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

por

Pablo Sergio Ramírez Roca



Mayo del 2002

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez

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:

Pablo Sergio Ramírez Roca

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 13 de Mayo del año 2002.

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

A handwritten signature in black ink, appearing to be "C. Jerez", written over a dotted line.

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Margarita Carú

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "M. Carú", written over a dotted line.

Dr. David Holmes

David S. Holmes

Dr. Romilio Espejo

A handwritten signature in black ink, appearing to be "R. Espejo", written over a dotted line.

Dr. Victor Cifuentes



a mi padre

a Naty

## AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento al Dr. Carlos Jerez, Director del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias por su acertada dirección y las facilidades brindadas en la ejecución de la presente investigación.

Además deseo expresar mi agradecimiento a las personas e instituciones que colaboraron en la ejecución de esta tesis:

Al Dr. Nicolas Guiliani por su permanente acuciosidad en el quehacer científico.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología: Silvia Cardona, Francisco Chávez, Sergio Alvarez, Mario Vera, Francisco Remonsellez, Mauricio Acosta y Lissette Valenzuela por el ambiente acogedor y las valiosas discusiones en ciencia.

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

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

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de San Marcos de Lima-Perú, por las facilidades brindadas.

Al Sr. Juan Araos por su invalorable apoyo y colaboración.

A mi esposa Natividad por su amor y apoyo constante.

A mis padres Bertha y Rogelio

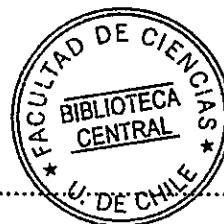
A mis hermanos por su apoyo y estímulo constante.



# ÍNDICE DE MATERIAS



Agradecimientos.....	iv
Índice de Materias.....	v
Lista de Figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Resumen.....	xiv
Abstract.....	xviii
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. LA QUÍMICA DEL ÁTOMO DE AZUFRE.....	1
1.2. BIOLIXIVIACIÓN MICROBIANA.....	4
1.2.1. <i>Microorganismos presentes en los ambientes lixiviantes</i> .....	5
1.2.2. <i>El género Acidithiobacillus</i> .....	6
1.3. PRINCIPIOS DE LA BIOLIXIVIACIÓN DE METALES.....	7
1.3.1. <i>Mecanismo de lixiviación directa</i> .....	8
1.3.2. <i>Mecanismo de lixiviación indirecta</i> .....	8
1.4. LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS INORGÁNICOS DE AZUFRE REDUCIDO POR <i>BACTERIA</i> .....	11
1.4.1. <i>Oxidación del ion sulfuro</i> .....	11
1.4.2. <i>Oxidación del tiosulfato</i> .....	12
1.4.2.1. <i>Las azufre transferasas en los seres vivos</i> .....	16
1.4.2.2. <i>Las TST en A. ferrooxidans</i> .....	18
1.4.3. <i>Oxidación del tetratioato</i> .....	19
1.4.4. <i>Oxidación del azufre elemental</i> .....	19
1.4.5. <i>Oxidación del sulfito</i> .....	20
1.5. ASIMILACIÓN DEL AZUFRE Y DEL TIOSULFATO EN <i>BACTERIA</i> .....	21
1.6. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>A. FERROXIDANS</i>	



EN AZUFRE ELEMENTAL.....	24
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
2.1. CEPAS, PLASMIDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	26
2.1.1. <i>Acidithiobacillus. ferrooxidans</i> ATCC 19859.....	26
2.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.1.3. Cepas y plasmidios de <i>E. coli</i> usadas y generadas durante la ejecución de esta Tesis.....	27
2.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	30
2.2.1. Extracción de DNA cromosómico.....	30
2.2.2. Extracción de DNA plasmidial.....	30
2.2.3. Cuantificación de DNA.....	31
2.2.4. Digestiones de DNA con enzimas de restricción.....	31
2.2.5. Ligaciones de DNA.....	31
2.2.6. Transformaciones.....	32
2.2.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	33
2.2.8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.....	33
2.2.9. Clonamiento de productos de PCR.....	34
2.2.10. Reacción de PCR sobre las colonias recombinantes.....	34
2.2.11. Secuenciación de DNA.....	35
2.3. BÚSQUEDA DE GENES DE TSTS Y DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A TIOSULFATO EN <i>A. FERROOXIDANS</i> ATCC 19859.....	35
2.3.1. Búsqueda de los genes <i>p21</i> , <i>p14</i> , <i>p16</i> y <i>p33</i> .....	35
2.3.1.1. Partidores y condiciones de PCR para amplificar el gen <i>p21</i> ...36	
2.3.1.2. Partidores y condiciones de PCR para amplificar el gen <i>p14</i> ...37	
2.3.1.3. Clonamiento y expresión del gen <i>p21</i> .....	38
2.3.1.4. Clonamiento y expresión del gen <i>p14</i> .....	39
2.4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA P21 RECOMBINANTE (P21R).....	40
2.5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	41



2.5.1. Marcación de proteínas in vivo con [ <sup>35</sup> S]metionina.....	41
2.5.2. Preparación de muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida.....	41
2.5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	42
2.5.4. Electroforesis bidimensional de proteínas.....	42
2.5.5. Preparación de las proteínas para microsecuenciamiento del extremo amino terminal.....	43
2.5.6. Microsecuenciación del extremo amino terminal.....	44
2.5.7. Determinación cuantitativa de proteínas.....	44
2.6. ANÁLISIS INMUNOLÓGICO DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P21R.....	44
2.6.1. Preparación de anticuerpos anti P21r.....	45
2.6.2. Inmunoelectrotransferencia.....	46
2.6.3. Detección inmunológica de proteínas.....	46
2.6.4. Inmunomicroscopía electrónica con cortes finos de células de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 19859.....	47
2.7. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE <i>A. FERROOXIDANS</i> Y <i>E. COLI</i> .....	48
2.7.1. Separación de fracción soluble, membrana interna y externa.....	48
2.7.2. Extracción de proteínas del periplasma de <i>A. ferrooxidans</i> .....	50
2.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TIOSULFATO:CIANURO AZUFRE TRANSFERASA.....	50
2.9. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE SECUENCIAS Y COMPARACIÓN CON BASES DE DATOS.....	51
2.10. NÚMERO DE ACCESO A BASE DE DATOS DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA.....	52
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
3.1. LA OXIDACIÓN DEL TIOSULFATO EN <i>A. FERROOXIDANS</i> .....	53
3.1.1. Identificación de una proteína de 21 kDa que se induce cuando <i>At. ferrooxidans</i> crece en pirita.....	53
3.1.2. Identificación del gen <i>p21</i> mediante genética reversa.....	56
3.1.3. Clonamiento y secuenciación del gen <i>p21</i> .....	58

3.1.4.	<i>La proteína P21 presenta similitud con tiosulfato azufre transferasa</i>	59
3.1.5.	<i>Clonamiento del gen p21 de A. ferrooxidans ATCC 19859 en el sistema de expresión pET</i>	61
3.1.6.	<i>Análisis de la expresión de la proteína P21 en A. ferrooxidans crecido en distintos sustratos oxidables</i>	63
3.1.7.	<i>Localización celular de la proteína P21 en A. ferrooxidans</i>	66
3.1.7.1.	Procesamiento de la proteína P21 en <i>E. coli</i>	66
3.1.7.2.	Localización de la proteína P21 en <i>A. ferrooxidans</i> mediante inmunocitoquímica y fraccionamiento subcelular	69
3.1.8.	<i>Análisis funcional de la proteína P21r</i>	73
3.1.9.	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans presenta actividad tiosulfato cianuro:azufre transferasa</i>	74
3.2.	IDENTIFICACIÓN DE OTRAS TSTs EN <i>A. FERROOXIDANS</i> MEDIANTE MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	76
3.2.1.	<i>Clonamiento y expresión del gen p14</i>	81
3.2.2.	<i>Análisis de la actividad tiosulfato cianuro:azufre transferasa de la proteína P14r</i>	83
3.3.	UNA PROTEÍNA DE 33 KDA (P33) SE INDUCE CUANDO <i>A. FERROOXIDANS</i> ATCC 19859 CRECE EN TIOSULFATO	84
3.3.1.	<i>Búsqueda del gen p33 en el genoma de A. ferrooxidans ATCC 23270</i>	86
3.4.	ANÁLISIS DEL CONTEXTO GENÓMICO DE LA PROTEÍNA P21 EN EL CONTIG 7916	89
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>93</b>
4.1.	LA OXIDACIÓN DEL TIOSULFATO EN <i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i>	93
4.2.	PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA P21 EN EL METABOLISMO DEL TIOSULFATO	94
4.3.	¿LA PROTEÍNA P21 FORMA PARTE DE UN CENTRO	



REDOX?.....	98
4.4. LA PROTEÍNA P21 CONSERVA LA ESTRUCTURA TIPO RODANASA DEL SITIO CATALÍTICO.....	100
4.5. ASIMILACIÓN DE SULFATO Y/O TIOSULFATO POR <i>A. FERROOXIDANS</i> .....	103
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>107</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>108</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>121</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del azufre y del tiosulfato.....	3
Figura 2. Mecanismos indirectos de la biolixiviación.....	10
Figura 3. Oxidación del tiosulfato a través del complejo multienzimático Sox.....	13
Figura 4. Posible modelo de la oxidación del tiosulfato en tiobacilos aerobios estrictos.....	15
Figura 5. Vías de la asimilación del sulfato/tiosulfato y biosíntesis de la cisteína en <i>E. coli</i> .....	23
Figura 6. Inducción de la expresión de la proteína P21 en <i>A. ferrooxidans</i> crecido en pirita.....	55
Figura 7. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la proteína P21.....	57
Figura 8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína P21 de <i>A. ferrooxidans</i> con otras azufre transferasas representativas.....	60
Figura 9. Amplificación por PCR del gen <i>p21</i> con y sin péptido señal.....	62
Figura 10. Sobreexpresión <i>in vivo</i> del gen <i>p21</i> en <i>E. coli</i> .....	63
Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína P21 mediante Western blot en <i>A. ferrooxidans</i> crecido en distintas condiciones.....	65
Figura 12. Procesamiento del péptido señal del gen <i>p21</i> en <i>E. coli</i> .....	68
Figura 13. Inmunomicroscopía electrónica para localizar la proteína P21 de <i>A. ferrooxidans</i> crecidas en diferentes sustratos oxidables.....	70
Figura 14. La proteína P21 de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 19859 no se libera del periplasma mediante shock osmótico en frío.....	71
Figura 15. Localización subcelular de la proteína P21 de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en azufre elemental y en <i>E.</i> <i>coli</i> sobreexpresando P21r con péptido señal.....	73
Figura 16. Actividad rodanasa en <i>A. ferrooxidans</i> crecido en ion ferroso, azufre elemental y pirita.....	75

Figura 17. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen <i>p14</i> .....	77
Figura 18. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del gen <i>p16</i> .....	78
Figura 19. Alineamiento múltiple entre las proteínas P21, P14 y P16 de <i>A. ferrooxidans</i> .....	80
Figura 20. Amplificación por PCR del gen <i>p14</i> de <i>A. ferrooxidans</i> y sobreexpresión <i>in vivo</i> del gen <i>p14</i> en <i>E. coli</i> .....	82
Figura 21. Análisis funcional del gen <i>p14</i> de <i>A. ferrooxidans</i> .....	83
Figura 22. Inducción de la expresión de la proteína P33 en <i>A. ferrooxidans</i> crecido en tiosulfato.....	85
Figura 23. Secuencia génica de la proteína P33 de <i>A. ferrooxidans</i> .....	87
Figura 24. Representación esquemática y algunas propiedades de la región del contig 7916 que contiene al gen <i>p21</i> de <i>A. ferrooxidans</i> .....	90
Figura 25. Representación esquemática comparativa de los contextos genómicos que rodean a los genes <i>p21</i> , <i>p14</i> y <i>p16</i> similares a rodanasas de <i>A. ferrooxidans</i> .....	92
Figura 26. Posible motivo de cisteínas que uniría un centro hierro-azufre en la proteína P21.....	99
Figura 27. Análisis estructural comparativo entre la rodanasa GlpE y la proteína P21.....	102
Figura 28. Modelo de trabajo del metabolismo del tiosulfato en <i>A. ferrooxidans</i> .....	106

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estados de oxidación del átomo de azufre.....	2
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> empleadas y generadas en esta tesis.....	28
Tabla 3. Plasmidios de <i>E. coli</i> empleados y construidos en esta tesis.....	29
Tabla 4. Efecto de la concentración del ion ferroso sobre la expresión de la proteína P21.....	64
Tabla 5. Pesos moleculares y puntos isoelectricos de varias proteínas bacterianas que presentan dominio rodanasa.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

**2D.** Electroforesis bidimensional

**Amp.** Ampicilina

**BSA.** Seroalbumina bovina

**CCCP.** carbonil cianuro m-clorofenil-hidrazona

**CIAR.** Compuestos inorgánicos de azufre reducido

**Cm.** Cloramfenicol

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

**DTT.** Ditionitrotiol

**Fe(II).** Ion ferroso

**Fe(III).** Ion férrico

**IPTG.** Iso propil tio-β-galactósido

**NEPHGE.** Electroforesis bidimensional en condiciones de no equilibrio

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

**P21r.** Proteína P21 recombinante

**PAGE.** Electroforesis en geles de poliacrilamida

**pI.** Punto isoelectrico

**PMSF.** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

**PVDF.** Difluoruro de polivinilideno

**SDS.** Dodecil sulfato de sodio

**TAE.** Tris-acetato EDTA

**TBS.** Amortiguador Tris salino

**TD.** Tiosulfato deshidrogenasa

**TM.** Dominio transmembrana

**TST.** Tiosulfato azufre transferasa

**ufc.** Unidad formadora de colonia

**X-Gal.** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

## RESUMEN

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (ex *Thiobacillus ferrooxidans*) es una bacteria acidófila y quimiolitotrófica que oxida el ion ferroso, azufre elemental y compuestos de azufre reducidos como fuentes de energía. Éste y otros microorganismos tienen la habilidad de solubilizar el metal de los sulfuros metálicos por lo que son exitosamente utilizados en operaciones de biominería.

Se han propuesto dos mecanismos para la disolución de los sulfuros metálicos: el directo e indirecto. En el primero, la bacteria oxida directamente el mineral, sin la participación de los iones férrico. Evidencias recientes apoyan al mecanismo indirecto. Se postula que los sulfuros metálicos serían degradados por el ataque químico de iones Fe(III) y/o protones. El mecanismo de degradación está determinado por la estructura cristalina del mineral. De acuerdo al modelo propuesto, el tiosulfato sería el intermediario principal de la oxidación de la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y otros sulfuros similares. En este proceso de disolución, los iones Fe(III) son los únicos agentes oxidantes. Esto explicaría porqué sólo las bacterias que oxidan iones Fe(II) son capaces de oxidar este tipo de sulfuros metálicos. En cambio, los sulfuros metálicos como la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ) y otros relacionados, son degradados mediante el ataque de los iones Fe(III) y los protones. En consecuencia, los intermediarios principales son los polisulfuros y el azufre elemental.

Ya que el tiosulfato es el producto intermediario principal en la oxidación del residuo azufrado de la pirita, el mecanismo ha sido recientemente denominado como el

mecanismo del tiosulfato. Se ha demostrado que todas las reacciones que ocurrirían en este mecanismo pueden deberse sólo a bases eminentemente químicas. Sin embargo, las enzimas que oxidan compuestos azufrados como la tiosulfato deshidrogenasa de *A. ferrooxidans* podrían también estar involucradas. Además, las enzimas que oxidan el tiosulfato o el sulfito de *A. ferrooxidans* podrían competir exitosamente con la reacciones químicas de los iones Fe(III). La actividad rodanasa ha sido anteriormente descrita en *A. ferrooxidans*. Esta enzima es una tiosulfato azufre transferasa que rompe el enlace S-S del tiosulfato, produciendo azufre y sulfito. Las rodanasas catalizan *in vitro* la transferencia del átomo de azufre sulfano del tiosulfato al cianuro.

Previamente nosotros hemos estudiado los cambios globales en la expresión de proteínas cuando *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crece en ion ferroso o azufre elemental y hemos identificado algunas de estas proteínas. Durante esta tesis, con el objetivo de caracterizar los componentes involucrados en la oxidación del tiosulfato y otros sulfuros metálicos, hemos analizado mediante electroforesis bidimensional en condiciones de no equilibrio (2D NEPHGE) y Western blot las proteínas que sintetiza *A. ferrooxidans* cuando crece en iones Fe(II), azufre elemental, pirita, tiosulfato, ZnS y CuS.

Analizamos la expresión de una proteína de 21 kDa (P21) cuya síntesis se incrementa enormemente cuando el microorganismo crece en FeS<sub>2</sub>, tiosulfato, azufre elemental, CuS y ZnS y se encuentra completamente reprimida cuando crece en ion ferroso. Posteriormente determinamos la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína P21 y usamos la secuencia genómica preliminar de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 disponible vía internet para identificar y aislar la región del DNA que contiene el gen *p21*. La secuencia nucleotídica de este fragmento de DNA

contiene un posible marco abierto de lectura (ORF) que codifica para una proteína de 23 kDa. La diferencia en el tamaño se debe a la presencia de un posible péptido señal en el ORF que codifica para la P21. Cuando el gen *p21* se clonó y sobreexpresó en *Escherichia coli*, el péptido señal fue removido, dando como resultado la proteína madura de 21 kDa. La proteína P21 exhibe una elevada similitud con otras tiosulfato azufre transferasas cuyas actividades han sido demostradas in vitro. Además, ésta contiene altamente conservados los dominios estructurales CH2A, CH2B y el sitio activo, típico de las tiosulfato azufre transferasas. Sin embargo, la proteína P21 recombinante no mostró actividad. A diferencia de las rodanasas citoplasmáticas, la proteína P21 fue localizada mediante análisis inmunocitoquímico en la periferia de las células de *A. ferrooxidans* y su síntesis se regula en forma dependiente del sustrato oxidable.

En el contexto genómico del gen *p21* se encuentran otros ORFs que codificarían para proteínas de unión a sulfato-tiosulfato y una tioredoxina. Estos resultados sugieren que la proteína P21 se encontraría involucrada en el metabolismo de compuestos azufrados en *A. ferrooxidans*. Aunque todavía no se ha demostrado, esta proteína puede ser parte importante del mecanismo indirecto del tiosulfato para la disolución de los minerales y/o del metabolismo de azufre en *A. ferrooxidans*. Usando la misma estrategia de genética reversa identificamos el gen que codifica para una proteína de 33 kDa que se induce cuando la bacteria crece en tiosulfato en relación a ion ferroso. El gen *p33* se encuentra río arriba del gen *p21*.

Encontramos la actividad rodanasa en los extractos totales de células de *A. ferrooxidans*, lo que sugiere la existencia de una proteína TST. Por esta razón, mediante



el uso de herramientas bioinformáticas, investigamos en el genoma incompleto de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 la existencia de otras proteínas similares a rodanasas. Como resultado de esta búsqueda se caracterizó preliminarmente una proteína de 14 kDa que tiene actividad rodanasa. *A. ferrooxidans* posee al menos otros dos genes que codifican para una proteína que contienen dominios presentes en la superfamilia de rodanasas, pero que posiblemente desempeñan otras funciones celulares.

En conclusión, debido a la ausencia de un sistema genético apropiado para realizar genómica funcional en *A. ferrooxidans*, hasta este momento no ha sido posible asignar una función definitiva a la proteína P21 en el metabolismo del azufre o del tiosulfato. Sin embargo, considerando la proximidad al gen *p21* a genes que codificarían para un sistema de transporte de sulfato o tiosulfato, los elevados niveles de síntesis de P21 en azufre, tiosulfato, pirita y otros sulfuros, su posible localización asociada a la membrana interna pero hacia el lado periplásmico, y su similitud a rodanasas, la proteína P21 está probablemente involucrada en la oxidación o en la adquisición de compuestos azufrados.

## ABSTRACT

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (ex *Thiobacillus ferrooxidans*) is an acidophilic chemolithoautotrophic bacterium that obtains its energy from the oxidation of ferrous iron, elemental sulfur, or partially oxidized sulfur compounds. The ability of these and other microorganisms present in the same habitat to solubilize metal sulfides has been successfully applied in biomining operations.

Two mechanisms have been proposed for the dissolution of metal sulfides, the direct one and the indirect one. In the direct mechanism, the bacteria directly oxidize the mineral by biological means, without any requirement for ferric or ferrous ions. Recent evidence favors the indirect mechanism of sulfide dissolution by which metal sulfides are degraded by a chemical attack of Fe(III) ions and/or protons on the crystal lattice. The mechanism of degradation is determined by the mineral structure. According to the proposed model, the disulfide pyrite ( $\text{FeS}_2$ ) and other similar sulfides are degraded by generating thiosulfate as the main intermediate. Iron(III) ions are the exclusive oxidizing agents for the dissolution. This explains why only Fe(II) ion-oxidizing bacteria are capable of oxidizing these metal sulfides. Metal sulfides such as sphalerite ( $\text{ZnS}$ ), among others, are degradable by iron(III) ion and proton attack. As a consequence, polysulfides and elemental sulfur are the main intermediates.

Because thiosulfate is the key compound in the oxidation of the sulfur moiety of pyrite, the mechanism has recently been defined as the thiosulfate mechanism. All reactions comprising this mechanism have been shown to occur on a purely chemical

basis. However, sulfur compounds oxidizing enzymes such as the thiosulfate dehydrogenase of *A. ferrooxidans* may be involved. In addition, enzymes for thiosulfate or sulfite oxidation from *A. ferrooxidans* may successfully compete with the chemical reactions with iron(III) ions as an oxidizing agent. A rhodanese activity has been previously described in *A. ferrooxidans*. This enzyme is a thiosulfate sulfur-transferase or rhodanese which breaks the S-S bond present in thiosulfate, generating sulfur and sulfite. The rhodanases catalyze the transfer of a sulfane sulfur atom from thiosulfate to cyanide.

We have previously studied the global changes in gene expression of *A. ferrooxidans* ATCC 19859 when the microorganism is grown on ferrous iron or sulfur and have identified some of these proteins. To further define some of the components involved in the oxidation of thiosulfate and metal sulfides, during this thesis we analyzed by means of 2D NEPHGE and Western blot the proteins synthesized by the bacterium when grown on Fe(II) ions, elemental sulfur, pyrite, thiosulfate, ZnS and CuS.

We analyzed the synthesis of a P21 protein of 21 kDa whose synthesis was greatly induced when the microorganisms were grown in FeS<sub>2</sub>, thiosulfate, elemental sulfur, CuS, and ZnS and was almost completely repressed by growth in ferrous iron. After we determined the N-terminal amino acid sequence of P21, we used the available preliminary genomic sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to isolate the DNA region containing the *p21* gene. The nucleotide sequence of this DNA fragment contained a open reading frame (ORF) coding for a putative 23-kDa protein. This difference in size was due to the presence of a possible signal peptide. When *p21* was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*, the signal peptide was removed, resulting

in a mature protein with a molecular mass of 21 kDa. P21 exhibited significant similarity to thiosulfate-sulfur transferases whose activity has been demonstrated *in vitro*. P21 also contained the highly conserved structural domains CH2A, CH2B and the catalytic site, typical of thiosulfate sulfur-transferases. However, the purified recombinant P21 protein did not show rhodanese activity. Unlike cytoplasmic rhodanases, P21 was located in the periphery of *A. ferrooxidans* cells, as determined by immunocytochemical analysis, and was regulated depending on the oxidizable substrate.

The genomic context around gene *p21* contained other ORFs corresponding to proteins such as thioredoxins and sulfate-thiosulfate binding proteins. These results suggest the involvement of P21 in inorganic sulfur metabolism in *A. ferrooxidans*. Although yet to be demonstrated, this protein may be an important part of the indirect thiosulfate mechanism of dissolution of minerals and/or sulfur metabolism in *A. ferrooxidans*. By using the same reverse genetic strategy, we identified the gene coding for a putative sulfate-thiosulfate binding protein of 33 kDa (P33) whose synthesis increased during growth of the bacteria in thiosulfate in comparison with ferrous iron. The *p33* gene was located upstream of the *p21* gene.

The presence of rhodanese activity detected in cell-free extract from *A. ferrooxidans* suggested the existence of a rhodanese-like gene in the genome. Using bioinformatic tools, we encountered a such a gene potentially coding for a 14 kDa protein (*p14*). We have cloned and partially characterized this protein. The recombinant P14 from *A. ferrooxidans* was functional when expressed in *E. coli*. In addition, *A. ferrooxidans* appears to have at least two more genes coding for rhodanese-like proteins. These proteins most likely perform other functions in the cell.

At this point it is not possible to assign a definitive role to P21 in sulfur or thiosulfate metabolism in *A. ferrooxidans*, due to the lack of an appropriate workable genetic system to perform functional genomics with *A. ferrooxidans*. However, given its proximity to genes encoding the sulfate-thiosulfate transport system, its specific and high level of accumulation in pyrite, sulfur, thiosulfate, and other sulfides, its possible localization bound to the inner membrane but facing the periplasmic space, and its similarity to rhodanases, the protein is probably involved in the oxidation or in the acquisition of sulfur compounds.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La química del átomo de azufre

La oxidación microbiana de los compuestos inorgánicos de azufre reducido (CIAR) se halla gobernada tanto por reacciones químicas como enzimáticas. Resulta importante mencionar que los CIAR, sus intermediarios y sus productos metabólicos son altamente reactivos y esto dificulta en gran medida la dilucidación y comprensión de las vías metabólicas de la oxidación de estos compuestos.

Esta elevada reactividad se explica porque el átomo de azufre presenta varios de estados de oxidación (Tabla 1) (Suzuki 1999, Steudel R., 2000). En los sulfuros ( $\text{H}_2\text{S}$ ), el átomo de azufre se encuentra en el estado más reducido (-2), en tanto que en el sulfato se halla en el estado más oxidado (+6). La pirita ( $\text{FeS}_2$ ) es uno de los sulfuros metálicos más abundantes en la naturaleza y su oxidación química genera azufre molecular. El azufre molecular puede adoptar muchas formas estructurales, entre las cuales se considera al anillo octamérico ( $\text{S}_8$ ) como la forma más estable (Figura 1A).

El monóxido de azufre ( $\text{SO}$ ) y el sulfoxilato ( $\text{SO}_2^{2-}$ ) se consideran como los posibles intermediarios de la oxidación química del azufre elemental hacia dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ). El dióxido de azufre es un gas no inflamable y muy soluble en solución acuosa. Al solubilizarse en el agua forma ácido sulfuroso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) que al disociarse genera el ion hidrosulfito o bisulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ) y posteriormente el ion sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ). Se ha propuesto que el sulfito es uno de los más importantes intermediarios de la oxidación biológica de

los CIAR (Kelly, 1985). Por otro lado el trióxido de azufre (SO<sub>3</sub>) presenta un átomo de azufre en estado de oxidación +6 y se forma por la oxidación del dióxido de azufre. La forma hidratada del trióxido de azufre es el ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) que al disociarse de sus protones produce el ion hidrosulfato (HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>) y finalmente el sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) (Tabla1). Este compuesto es el producto final de la oxidación completa de los CIAR por microorganismos.

Tabla 1. Estados de oxidación del átomo de azufre en diferentes compuestos que lo contienen

-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6
<b>H<sub>2</sub>S</b> Sulfuro de hidrógeno	<b>H<sub>2</sub>S<sub>2</sub></b> Disulfano	<b>S<sub>n</sub></b> Azufre elemental	<b>Cl-S-S-Cl</b> Dicloro disulfano	<b>(SO)</b> Monóxido de azufre	<b>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> Ditionita	<b>SO<sub>2</sub></b> Dióxido de azufre	<b>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup></b> Ditionato	<b>SO<sub>3</sub></b> Trióxido de azufre
<b>HS<sup>-</sup></b> Ion sulfuro de hidrógeno	<b>S<sub>2</sub><sup>2-</sup></b> Disulfuro como en la pirita	<b>R-S<sub>n</sub>-R</b> Polisulfano orgánico		<b>SO<sub>2</sub><sup>2-</sup></b> Sulfoxilato		<b>H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub></b> Acido sulfuroso	<b>RSO<sub>3</sub><sup>-</sup></b> Sulfonato	<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b> Sulfato
<b>S<sup>2-</sup></b> Ion sulfuro como en FeS						<b>SO<sub>3</sub><sup>2-</sup></b> Sulfito		
						S-----SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> Tiosulfato		
						S-----SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>   S-----SO <sub>3</sub> Tetrionato		
<b>H<sub>2</sub>S</b> ----- <b>S<sub>n</sub></b> Polisulfano								
<b><sup>2-</sup>S</b> ----- <b>S<sub>n</sub></b> Polisulfuro								

(Suzuki, 1999; con modificaciones)

Además existen en la naturaleza CIAR con átomos de azufre en distintos estados de oxidación conformando la misma molécula. Entre éstos, hay varios que son utilizados oxidativamente como fuente energética por los microorganismos. Entre los más importantes tenemos el tiosulfato ( $\text{S-SO}_3^{2-}$ , Figura 1B), tetrationato ( $\text{O}_3\text{S-S-S-SO}_3^-$ ) y los polisulfuros ( $\text{S-S}_n$ ). Se sugiere, de acuerdo a sus propiedades, que el tiosulfato se generaría mediante la combinación química entre el azufre y el sulfito. El estado de oxidación efectivo por átomo de azufre en el tiosulfato sería de +2. Por otro lado, el tetrationato tiene cuatro átomos de azufre de los cuales los dos átomos internos se hallan con valencia cero. Mientras que los átomos de azufre externos unidos a los átomos de oxígeno, uno tendrían valencia +4 (tipo sulfito) y el otro valencia +6 (tipo trióxido de azufre), respectivamente. En cambio, los átomos de azufre de los polisulfuros presentan un nivel de oxidación de azufre elemental o azufre sulfano (0) con la excepción del átomo de azufre del sulfuro terminal (-2) (Tabla 1; Suzuki, 1999; Steudel, 2000).

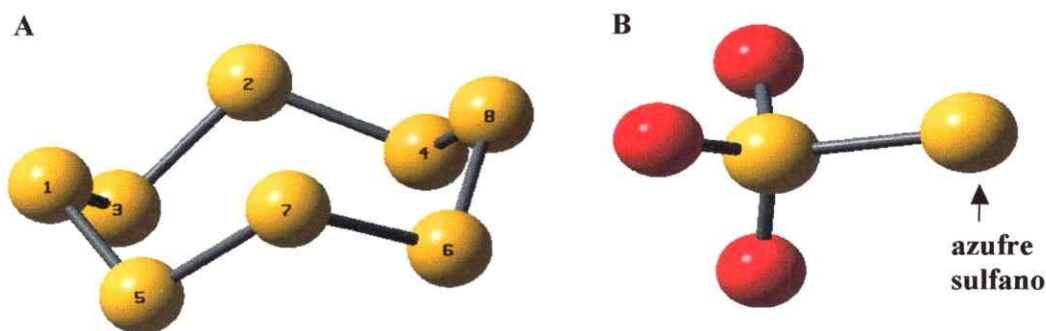


Figura 1. A, estructura molecular del azufre octamérico ( $\text{S}_8$ ). Se indica con números los 8 átomos de azufre. B, estructura molecular del tiosulfato. Las esferas amarillas representan a los átomos de azufre, mientras que las rojas a los átomos de oxígeno.



## 1.2. Biolixiviación microbiana

La biolixiviación se define como la utilización de microorganismos en la recuperación de metales a partir de los minerales que los contienen. Desde el punto de vista económico, constituye un método eficiente y de bajo costo para la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley. La biolixiviación de minerales se está usando ampliamente en faenas mineras. Por ejemplo, en Chile y Estados Unidos aproximadamente el 18% del cobre total se recupera mediante biolixiviación. Mientras que en Sudáfrica y Australia se está aplicando para incrementar la extracción de oro (Lindström y col., 1992). Este metal se halla mayormente asociado con tres tipos de minerales azufrados: la pirita ( $\text{FeS}_2$ ), la arsenopirita ( $\text{FeAsS}$ ) y pirita arsenical ( $\text{AsFeS}_2$ ) en forma de partículas muy finas que se encuentran atrapadas en la matriz del mineral. Los microorganismos acidófilos oxidan los minerales azufrados liberando las partículas de oro. La recuperación del oro puede incrementarse desde un 10% antes del tratamiento hasta el 90% después del tratamiento del mineral (Dopson, 2001).

En el hábitat en el que ocurre la biolixiviación coexisten metales y/o azufre en distintos estados de oxidación en contacto con el aire, el agua y los microorganismos. En general, los ambientes lixiviantes contienen grandes cantidades de sulfuros metálicos y están sometidos simultáneamente a reacciones de oxidación química y bacteriana. El producto final de la oxidación de los compuestos azufrados es el ácido sulfúrico, el cual disminuye el pH del agua. Cuando se vierten las aguas ácidas de las minas a los ríos y lagos se generan graves problemas de contaminación ambiental. Por esta razón es

importante entender el proceso de biolixiviación con el fin de controlar el daño ecológico originado en forma natural o por acción de la actividad humana.

### 1.2.1. Microorganismos presentes en los ambientes lixiviantes

Desde los inicios de la investigación en la biolixiviación por los años 50, se creía que los únicos microorganismos responsables de este proceso eran algunas especies de la bacteria *Acidithiobacillus* (ex-*Thiobacillus ferrooxidans*) y que las especies predominantes eran *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*. Sin embargo con el transcurso de los años se ha demostrado que en determinadas condiciones participan una variedad de otras bacterias quimiolitotróficas, heterotróficas, arqueas, hongos, algas y protozoarios (Johnson, 1998). Una de las características más sobresalientes de todos los microorganismos lixiviantes es su carácter acidófilo, ya que el rango de pH óptimo de crecimiento de éstos es menor a 4. Precisamente algunos metales de interés económico son más solubles a pHs ácidos y por tanto la presencia de microorganismos acidófilos favorece su solubilización. Por ejemplo, el ion ferroso es muy soluble a pHs menores de 1.5, y en tanto que precipita a pHs mayores de 2.

Rawlings y col., (1999) reportaron que en determinadas condiciones predomina la bacteria acidófila quimiolitotrófica estricta *Leptospirillum ferrooxidans*. Esta bacteria quimiolitotrófica estricta tiene la propiedad de oxidar solamente el ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) como única fuente de energía. Por esta razón en los cultivos puros de *L. ferrooxidans* crecidos en piritita se acumula azufre elemental. Cultivos mixtos de esta bacteria con *A. thiooxidans* oxidan completamente la piritita a sulfato (Schippers y col., 1999). Estas evidencias demuestran que existe cooperatividad en la disolución de los

sulfuros metálicos. Entre los microorganismos termófilos que están involucrados en la oxidación de la piritita destacan *Acidithiobacillus caldus* (Dopson y Lindström, 1999) y las arqueas *Metallosphaera sedula* (Han y Kelly, 1998) y *Sulfolobus metallicus* (Larsson y col., 1990; Nemati y col., 2000). Debemos destacar que en el dominio *Archaea* sólo los miembros del orden *Sulfolobales* oxidan compuestos azufrados, mientras que no se ha descrito hasta la actualidad ningún organismo del dominio *Eukarya* que oxide CIAR.

### 1.2.2. El género *Acidithiobacillus*

La existencia del género *Thiobacillus* desde hace ya muchos años estuvo en constante revisión porque lo constituían una gran diversidad de especies con características muy disímiles, cuyos miembros se distribuían en las subclases  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de las *Proteobacteria* (Kelly y Harrison., 1989). Sin embargo, la aplicación del análisis filogenético con la secuencia del rRNA 16S y de las técnicas de hibridación DNA-DNA han permitido clarificar en alguna medida la taxonomía de las especies que conformaban el género *Thiobacillus*. Como resultado de estos análisis Kelly y Wood (2000) reasignaron a *Thiobacillus ferrooxidans* como una especie del nuevo género: *Acidithiobacillus* (*A*).

El género *Acidithiobacillus* comprende a especies bacterianas Gram-negativas de morfología cocobacilar, acidófilas y quimiolitotróficas estrictas (aciditiobacilos) y que según el análisis filogenético con el rRNA 16S pertenece a la subclase  $\gamma$  de las *Proteobacteria* (Kelly y Wood, 2000). La más estudiada por su importancia biotecnológica es *A. ferrooxidans*, y en menor medida *A. thiooxidans* y *A. caldus*. Sin embargo este último está siendo estudiado para aplicarlo en procesos de biolixiviación a

temperaturas moderadas (Dopson y Lindström, 1999). Estas bacterias oxidan azufre, sulfuros metálicos y otros compuestos inorgánicos de azufre reducido como donadores de electrones para su crecimiento quimilitotrófico aeróbico o anaeróbico. Solamente la especie *A. ferrooxidans* además obtiene energía a partir de la oxidación aeróbica del ion ferroso (Kelly y Wood, 2000). El metabolismo del azufre en *A. ferrooxidans* constituye un área interesante de estudio. No solamente por la capacidad de este microorganismo de oxidar una variedad de compuestos azufrados sino también porque puede incorporar átomos de azufre del sulfato a los aminoácidos cisteína y metionina (Fry y García, 1989; Sekowska y col., 2000). En este sentido, *A. ferrooxidans* posee el potencial y la capacidad de regular simultáneamente la síntesis de enzimas que participan en reacciones químicas diametralmente opuestas. Por un lado, la producción oxidativa del sulfato y en el otro la asimilación reductiva de éste.

El genoma de esta bacteria ha sido secuenciado casi en su totalidad por The Institute for Genomic Research y se halla disponible vía internet en el sitio <http://tigr.org> y por Integrated Genomics (Selkov y col., 2000). Además se están desarrollando herramientas genéticas que permitan el análisis mutagénico de este microorganismo (Cabrejos y col., 1999; Liu y col., 2000).

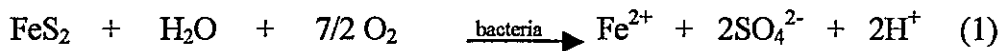
### **1.3. Principios de la biolixiviación de metales**

Desde los inicios de la investigación de la biolixiviación dos hipótesis acerca del mecanismo de ataque al mineral por los microorganismos se han puesto en discusión: el mecanismo de ataque directo y el indirecto (Sand y col., 1995). El mecanismo de

lixiviación indirecto ha sido mejor establecido, sin embargo en la actualidad el mecanismo directo aún no ha sido totalmente descartado (Fowler y Crundwell, 1998).

### 1.3.1. Mecanismo de lixiviación directa

En concordancia con la definición, el mecanismo directo supone la existencia de una enzima unida a la superficie de la célula o la secreción extracelular de una enzima que oxidaría directamente el mineral a iones metálicos y sulfato. Sin embargo, recientemente Tributsch (1999) ha intentado redefinirlo como el “mecanismo de lixiviación por contacto” en vista de la dificultad en distinguir la dimensión molecular de dicho contacto. En el caso de la pirita el mecanismo directo es representado por la ecuación 1 (Fowler y Crundwell, 1998):

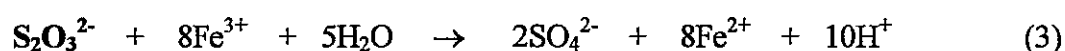


### 1.3.2. Mecanismo de lixiviación indirecta

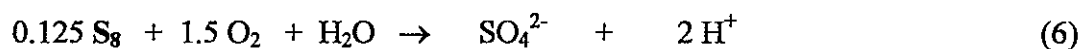
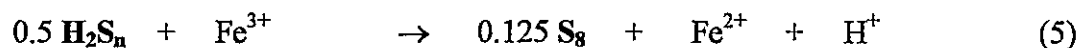
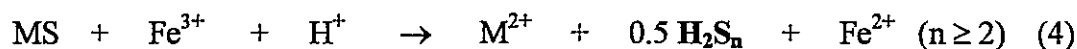
En cambio, el mecanismo de ataque indirecto se sustenta en que la disolución de los sulfuros metálicos se llevaría a cabo únicamente por la oxidación química mediada por iones férricos y/o protones. La forma reducida, el ion ferroso, serviría sólo como fuente de energía para *A. ferrooxidans*, el cual lo reoxidaría a ion férrico (Sand y col., 1995). De acuerdo a recientes evidencias experimentales, un modelo integral del mecanismo indirecto ha sido enunciado (Schippers y Sand, 1999). Este considera que los sulfuros metálicos son solubilizados mediante el ataque químico de los iones férricos y/o protones. El ion férrico sería proporcionado por los polisacáridos extracelulares de la bacteria, que lo llevan unido. Además, considerando la estructura electrónica y cristalina

del mineral, Schippers y Sand (1999) los clasifican en dos grupos: el primero incluye a la pirita ( $\text{FeS}_2$ ), molibdenita ( $\text{MoS}_2$ ), y tungstenita ( $\text{WS}_2$ ) los cuales serían solubilizados mediante el ataque del ion férrico como único agente oxidante, mientras que el otro grupo lo constituyen la esfalerita ( $\text{ZnS}$ ), covelita ( $\text{CuS}$ ) y galena ( $\text{PbS}$ ), que serían lixiviados por el ion férrico y/o los protones. Como consecuencia, se postula que el intermediario principal del primer grupo de sulfuros sería el tiosulfato (ecuaciones 2 y 3), mientras que del segundo grupo serían polisulfuros y azufre elemental (ecuaciones 4-6). Por lo tanto, se han puesto en consideración dos mecanismos de oxidación indirecta de los sulfuros metálicos (Figura 2, Schippers y Sand, 1999):

Mecanismo del tiosulfato:



Mecanismo del polisulfuro:



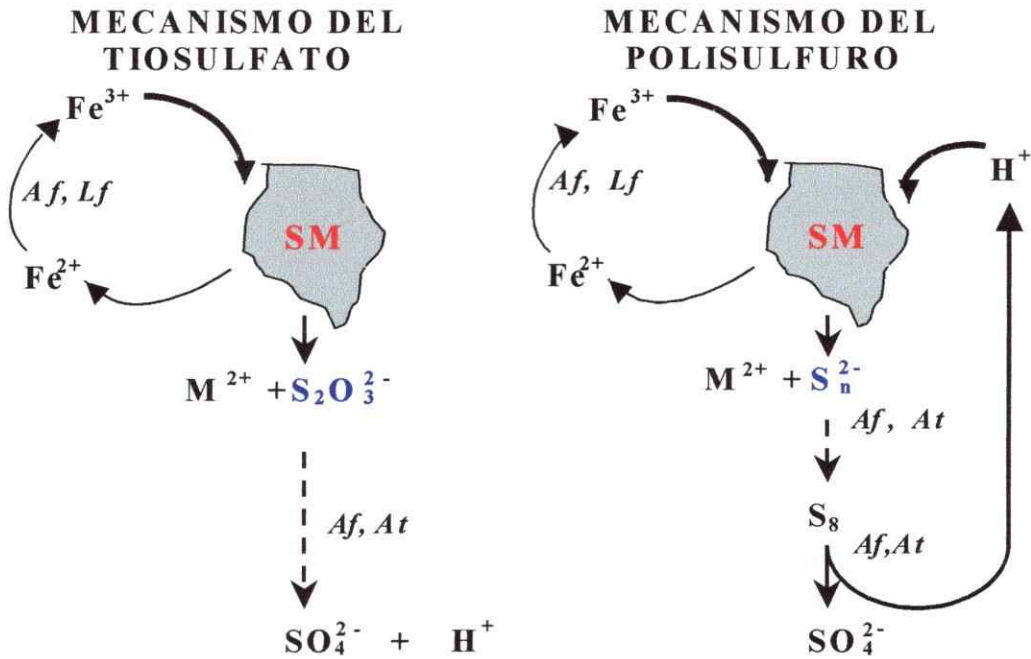


Figura 2. Proceso de biolixiviación por dos mecanismos indirectos distintos: la vía del tiosulfato y la vía del polisulfuro, considerando las propiedades de los sulfuros metálicos (SM) (Schippers y Sand, 1999). *Af*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*; *At*, *Acidithiobacillus thiooxidans*; *Lf*, *Leptospirillum ferrooxidans*.

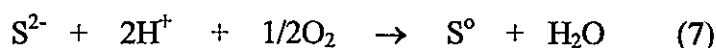
Cuando *A. ferrooxidans* oxida azufre elemental a sulfato genera sulfito como intermediario, el cual se acumula cuando se inhibe su posterior oxidación. De este modo, se ha detectado sulfito cuando se utiliza el inhibidor 2-*n*-heptil-4-hidroxiquinolina *N*-óxido (HQNO) (Suzuki 1999). Resulta de particular interés que durante la oxidación del azufre se haya observado la acumulación de sulfito en ausencia de inhibidores (Sugio y col., 1987; Pronk y col., 1990) ya que el sulfito se combinaría químicamente con el azufre para formar tiosulfato ( $\text{S}^0 + \text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) (Suzuki y Silver, 1966; Chan y Suzuki, 1994) y de hecho éste intermediario ha sido detectado en el medio de cultivo de *A. ferrooxidans* cuando crece en azufre elemental, lo que permite crecer a las células no adheridas al sustrato sólido (Shrihari y col., 1993).

## 1.4. La oxidación de compuestos inorgánicos de azufre reducido por *Bacteria*

Se ha calculado que los microorganismos pueden obtener hasta 14 moles de electrones de la oxidación del residuo azufrado por mol de sulfuro metálico en comparación al mol de electrones que se obtiene de la oxidación del ion ferroso (Rawlings, 1997). Por esta razón la oxidación biológica del azufre es muy importante desde el punto de vista energético para la lixiviación completa de los sulfuros metálicos por *A. ferrooxidans*. Existen en la literatura muchas propuestas sobre las vías involucradas en la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre (Kelly, 1988; Pronk y col., 1990; Kelly y col., 1997; Friedrich, 1998; Schippers y col., 1999; Friedrich y col., 2001; Kappler y col., 2001). Sin embargo aún sigue vigente la pregunta de si existen varias vías paralelas o sólo un mecanismo general para la oxidación de los compuestos inorgánicos de azufre reducido en bacterias. Varios modelos propuestos consideran al tiosulfato como uno de los intermediarios claves en la oxidación de los CIAR (Schippers y col., 1999; Kappler y col., 2001).

### 1.4.1. Oxidación del ion sulfuro

El ion sulfuro ( $S_2^-$ ) constituye uno de las especies de azufre que tiene el estado de oxidación más reducido y reacciona espontáneamente con el oxígeno para formar una serie de productos entre los que se incluyen, el tiosulfato y sulfito. A pH ácidos y a bajas concentraciones de ion sulfuro la oxidación biológica competiría con la siguiente reacción química (Dopson, 2001):





Debido a la elevada reactividad de los iones sulfuros libres, existe escasa información sobre la enzimología de su oxidación. Sin embargo se ha reportado que el primer paso de la oxidación del sulfuro por *A. thiooxidans* se iniciaría con la formación de azufre elemental o largas cadenas de polisulfuros (Moriarty y Nicholas, 1970). La oxidación de los sulfuros por *A. ferrooxidans* también seguiría esta vía y se efectuaría en el periplasma de la célula. Esta aseveración es consistente con los resultados de Hallberg y col., (1996) quienes encontraron que al añadirle el desacoplador carbonil cianuro *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP) durante la oxidación del tetratiónato por *A. ferrooxidans* se acumula azufre elemental y politiónatos.

#### 1.4.2. Oxidación del tiosulfato

De acuerdo a la información bioquímica, fisiológica y los recientes datos genómicos disponibles se han postulado al menos tres vías para la oxidación del tiosulfato. En una de las vías, el tiosulfato se oxidaría completamente hasta sulfato (Friedrich y col., 2001). En la segunda, el tiosulfato sería oxidado a través del tetratiónato como intermediario principal (De Jong y col., 1997) y en la tercera, el tiosulfato sería hidrolizado a azufre y sulfito. La primera vía se hallaría en los tiobacilos que crecen a pHs neutros como *Paracoccus pantotrophus*, en algunas bacterias fotosintéticas y otras especies relacionadas (Kelly y col., 1997). Recientemente Friedrich y col., (2001) en base al análisis genético molecular y bioquímico de los genes *sox* de *Paracoccus pantotrophus* y a partir de los datos genómicos disponibles (Wodara y col., 1997; Friedrich y col., 2000; Mukhopadhyaya y col., 2000; Rother y col., 2001; Appia-Ayme y col., 2001) sostienen la hipótesis que existiría un mecanismo común para la oxidación de los CIAR

en las bacterias quimiolitotróficas y fototróficas (Figura 3), en el cual el tiosulfato es el intermediario principal. Los genes *sox* en *Paracoccus pantotrophus* comprenden un grupo de al menos 15 genes, de los cuales 7 (*soxXYZABCD*) son esenciales para la oxidación del tiosulfato. Interesantemente cuando la bacteria crece en tiosulfato además de estos 7 genes, se inducen los genes *soxFGH* (Wodara y col., 1997; Friedrich y col., 2000). Este cluster de genes también se induce en la bacteria fotosintética *Rhodovulum sulfidophilum* cuando crece en tiosulfato (Appia-Ayme y col., 2001). Este grupo de genes aún no han sido descritos en *A. ferrooxidans* y de no poseerlos, en sí ya representaría un interesante problema científico el mecanismo de oxidación del tiosulfato que emplea este acidófilo.

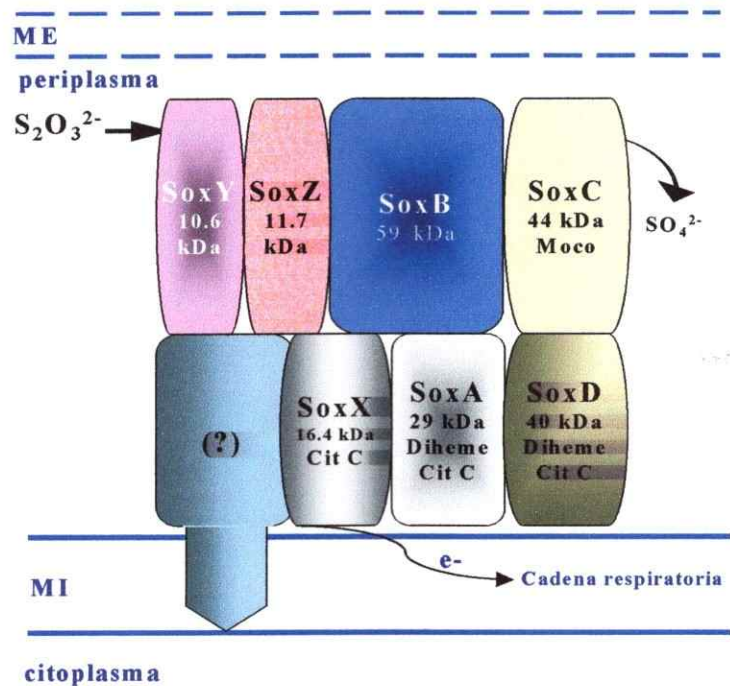


Figura 3. Oxidación del tiosulfato a través del complejo multienzimático Sox. ME, membrana externa; MI, membrana interna (Kappler y col., 2001).

La segunda y tercera vías para la oxidación del tiosulfato, se hallarían presentes en los tiobacilos acidófilos quimilitotróficos obligados como es el caso de *A. ferrooxidans* y en algunos facultativos como *Acidiphilium acidophilum* (ex-*Thiobacillus acidophilus*). Varios organismos acidófilos pueden utilizar el tiosulfato como única fuente de energía, entre los que destacan *A. caldus*, *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans*. El mecanismo de la oxidación biológica del tiosulfato en estos microorganismos aún es motivo de controversia. Sin embargo se postula que en la segunda vía, el tiosulfato sería convertido a tetrionato (Figura 4) mediante la enzima tiosulfato deshidrogenasa (TD) según la siguiente reacción (Suzuki, 1999):



Posteriormente, el tetrionato sería hidrolizado por la tetrionato hidrolasa (De Jong y col., 1997). La enzima TD ha sido parcialmente purificada a partir de tres microorganismos lixiviantes: *A. acidophilum* (Meulenberg y col., 1993), *A. thiooxidans* (Chan y Suzuki, 1994; Nakamura y col., 2001) y *A. ferrooxidans* (Silver y Lundgren, 1968). En *A. ferrooxidans* estaría compuesta por tres polipéptidos y presenta una actividad óptima a pH 5 (Visser y col., 1997). De acuerdo con estos estudios preliminares y por analogía con el sistema de oxidación del tiosulfato en *Paracoccus*, la TD en *A. ferrooxidans* estaría conformada por varias subunidades (Lu, 1986; Pronk, 1991; Kelly y col., 1997; Visser y col., 1997; Friedrich, 1998). Estos antecedentes sugieren que la oxidación del tiosulfato en *A. ferrooxidans* podría llevarse a cabo en el periplasma.

En cuanto a la tercera vía, ésta se iniciaría con la ruptura del enlace S-S del tiosulfato por la enzima tiosulfato azufre transferasa (TST; Figura 4) de acuerdo a la reacción reversible (Suzuki, 1999):



Seguidamente, el  $\text{S}^0$  sería oxidado por la enzima azufre oxidasa y el  $\text{SO}_3^{2-}$  por la sulfito oxido reductasa (Suzuki, 1999).

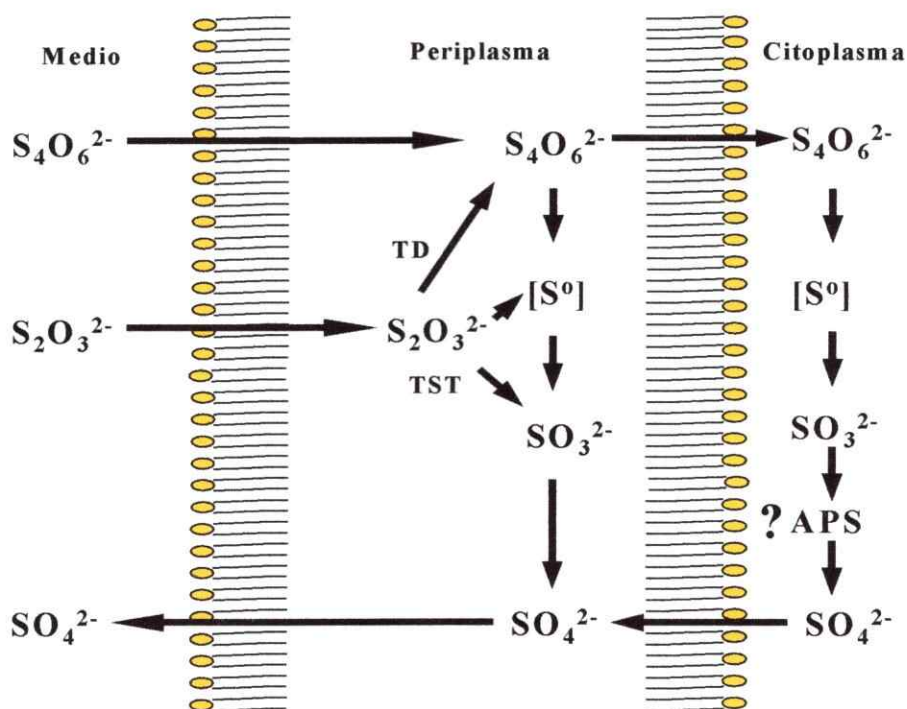


Figura 4. Posible modelo de la oxidación del tiosulfato en tiobacilos aerobios estrictos. El tiosulfato podría ser oxidado vía tetratiónato por una tiosulfato deshidrogenasa (TD) o ser hidrolizado a azufre y sulfito por acción de una tiosulfato azufre transferasa (TST). El mecanismo de la oxidación del tetratiónato aún es motivo de discusión (tomado de Brüser y col., 2000 con modificaciones).

Sin embargo el estudio de esta bacteria se complica aún más por su gran versatilidad metabólica, ya que también tiene los componentes genéticos de las vías de oxidación del sulfito dependiente e independiente de AMP (Brüsser y col., 2000). En la producción del sulfito podría participar una TST (Figura 4). Desde el punto de vista evolutivo existen evidencias de la ocurrencia de procesos de convergencia evolutiva en los diversos grupos de microorganismos para obtener energía a partir de los CIAR, pero utilizando distintos sistemas enzimológicos, y algunos de los cuales podrían tener componentes similares (Kelly y col., 1997).

#### *1.4.2.1. Las azufre transferasas en los seres vivos*

Las tiosulfato azufre transferasas (TST) constituyen una superfamilia de proteínas de amplia distribución en los tres dominios de los seres vivos y catalizan la transferencia del átomo de azufre sulfano de una molécula donadora a un aceptor tiofílico. Se consideran como miembros de la superfamilia TST a las tiosulfato:cianuro azufre transferasas (rodanasas, EC 2.8.1.1), 3-mercaptopiruvato:ditiol azufre transferasas (MPST, EC 2.8.1.2), tiosulfato:tíol azufre transferasas (EC 2.8.1.5) y tiosulfato:ditiol azufre transferasas (EC 2.8.1.5) (Papenbrock y Schmidt, 2000). Todas ellas están estrechamente relacionadas por el tipo de reacción que catalizan y probablemente también por su secuencia primaria de aminoácidos.

De éstas solamente las rodanasas han sido ampliamente estudiadas y se caracterizan por transferir el azufre sulfano del tiosulfato al ion cianuro (CN<sup>-</sup>). Los genes y la estructura cristalina de algunas de estas proteínas de *Eukarya* y *Bacteria* han sido determinadas. Por ejemplo la rodanasa mitocondrial de hígado de bovino ha sido

ampliamente caracterizada bioquímicamente y su estructura cristalina ya ha sido establecida. La enzima es un monómero de 239 aminoácidos (33 kDa de peso molecular) y consiste de dos dominios rodanasa estructuralmente similares (Ploegman y col., 1978). Esta característica es interesante en relación a su función y evolución ya que posiblemente esta proteína se habría originado a partir de una duplicación génica y que los módulos divergieron durante la evolución pero manteniendo su estructura terciaria. En el dominio rodanasa del C-terminal se localiza la cisteína (Cys-247) responsable de la catálisis (Ploegman y col., 1978). Esta cisteína altamente conservada conjuntamente con los aminoácidos con carga positiva Arg-186 y Lys-249 que participan en la unión del sustrato (Ploegman y col., 1987) son los residuos más importantes del sitio activo. Esta enzima se halla localizada en las mitocondrias de las células eucarióticas mientras que proteínas similares a rodanasas como las MPST se localizan en el citosol (Nagahara y col., 1995). Proteínas homólogas a la rodanasa de bovino se han descrito en *Bacteria*. Siendo las más caracterizadas las de *Synechococcus* (RhdA, Laudenbach y col., 1991), *Azotobacter vinelandii* (RhodA, Colnaghi y col., 1996; Pagani y col., 2000; Bordo y col., 2000) y *E. coli* (SseA, Colnaghi y col., 2001). Por otro lado el secuenciamiento completo de una variedad de genomas ha mostrado la existencia de genes que codifican para azufre transferasas que presentan un único dominio rodanasa en el mismo genoma (Ray y col., 2000; Spallarossa y col., 2001). Por ejemplo en el genoma de *E. coli* en particular existen 8 genes entre ellos *glpE*, *pspE* y *ygaP*, que codifican para proteínas con un solo dominio rodanasa, además de los genes *sseA* y *ynjE* que codifican para proteínas con dos dominios rodanasas. El panorama se complica aún más ya que hay proteínas que presentan un dominio rodanasa asociado a otros dominios no relacionados.

En *E. coli* tenemos entre estas a YceA que tiene adicionalmente el dominio C5 de unión a metal (Koonin y col., 2000).

Si bien las TST comprenden una superfamilia de enzimas de amplia distribución en los tres dominios de los seres vivos (Papenbrock y Schmidt, 2000; Ray y col., 2000; Tatusov y col., 2000; Fitz-Gibbon y col., 2002), su función fisiológica aún sigue siendo motivo de controversia. Además de su participación en el metabolismo del tiosulfato, entre las funciones atribuidas a las TST que destacan, tenemos su rol en la destoxificación del cianuro (Dooley y col., 1995), arsénico (Wysocki, 1997), del ion sulfuro (Picton, 2002) y la movilización del azufre para la biosíntesis o reparación de los centros de Fe-S (Bonomi y col., 1977; Pagani y Galante, 1983; Pagani y col., 1984; Cerletti, 1986).

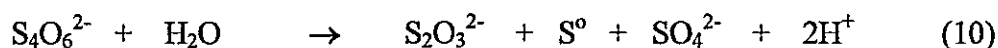
#### 1.4.2.2. *Las TST en A. ferrooxidans*

La actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa o rodanasa ha sido detectada en extractos crudos, células enteras (Gardner y Rawlings, 2000) y en una proteína parcialmente purificada a partir de *A. ferrooxidans* (Tabita y col., 1969). Esta enzima presenta actividad óptima en el rango de pH 7.5 a 9.0 al igual que otras rodanasas de otros organismos. En vista que existen evidencias que el tiosulfato sería oxidado en el periplasma de la bacteria, esta enzima no estaría directamente involucrada en el metabolismo de este compuesto energético. Una TST periplásmica podría ser la responsable de dicha función. Conocer la secuencia y anotación correspondiente del genoma de la cepa 23270 de *A. ferrooxidans* permitirá aclarar el panorama sobre la

existencia y diversidad de los miembros de esta superfamilia de proteínas en esta bacteria quimiolitotrófica estricta.

#### 1.4.3. Oxidación del tetrionato

El tetrionato se forma durante la oxidación del tiosulfato (Pronk y col., 1990) y puede servir como única fuente de energía en los aciditiobacilos. El metabolismo del tetrionato ocurre mediante una reacción de hidrólisis para generar tiosulfato, azufre elemental y sulfato, según la ecuación:



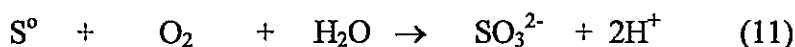
La enzima clave que cataliza esta reacción se denomina tetrionato hidrolasa. Esta enzima ha sido purificada en *A. ferrooxidans* (De Jong y col., 1997). Esta enzima produce largas cadenas de azufre en ausencia de oxígeno molecular y es activa a pHs ácidos, lo cual sugiere su localización periplásmica. Estos resultados están en concordancia con los hallazgos de azufre elemental en el espacio periplásmico de *A. ferrooxidans* (Hazeu y col., 1998).

#### 1.4.4. Oxidación del azufre elemental

La baja solubilidad e hidrofobicidad del azufre molecular ( $\text{S}_8$ ) hace suponer que las reacciones que ocurren en la superficie del sólido tendría un rol crucial en la oxidación biológica del  $\text{S}_8$ . Razón por la cual se ve favorecida la hipótesis de que el azufre molecular requiere ser activado. En dicha activación, el  $\text{S}_8$  sería inicialmente reducido a  $\text{H}_2\text{S}$ . Bacon e Ingledew (1989) demostraron que *A. ferrooxidans* liberaría al medio de



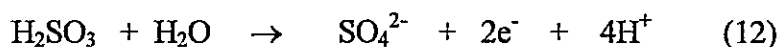
cultivo pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>S. Se postula que la oxidación sería catalizada por la enzima oxidante del azufre de acuerdo a la siguiente ecuación:



Esta reacción es inhibida por N-etilmaleimida (NEM) un agente que se une a grupos tioles (Suzuki, 1999). La enzima oxidante de azufre ha sido purificada a partir de *A. ferrooxidans* pero su significado fisiológico ha sido cuestionado ya que la reacción que catalizaría no explica cómo se sintetizaría ATP y equivalentes reductores (Dopson y Lindström, 1999).

#### 1.4.5. Oxidación del sulfito

El sulfito es otro de los intermediarios importantes durante la oxidación de los compuestos inorgánicos de azufre por aciditiobacilos. Se han descrito dos mecanismos diferentes para la oxidación del sulfito. En el primero, el sulfito sería oxidado a sulfato por una sulfito oxidasa o sulfito citocromo *c* oxidoreductasa (SOR)(Suzuki, 1999):



Aparentemente esta vía es la más empleada. La sulfito oxidasa transferiría directamente los electrones desde el sulfito al citocromo *c*, y se sintetizaría ATP como consecuencia del transporte de electrones y la formación de fuerza protón motriz. Esta enzima ha sido parcialmente purificada a partir de *A. ferrooxidans* y no presenta grupos hemo (Sugio y col., 1992; Jong y col., 2000; Kappler y Dahl, 2001). Sin embargo, se postula que algunos organismos quimiolitotróficos además oxidarían el sulfito usando la vía reversa de la actividad adenosina fosfosulfato reductasa (APSR). En esta vía el

sulfito se condensaría con la adenosina 5-monofosfato (AMP) para formar adenosina 5-fosfosulfato (APS) según las reacciones:



La ruptura del APS se halla ligada a la formación de ADP. Esta fosforilación a nivel de sustrato con sulfito produciría  $\frac{1}{2}$  ATP por sulfito. Esta reacción iría hacia la producción de sulfato en las bacterias quimiolitotróficas que oxidan compuestos inorgánicos de azufre, produciendo un enlace fosfato de alta energía cuando el AMP es convertido a ADP. El AMP se regeneraría mediante una adenilato quinasa en presencia de Pi. Cuando el tiosulfato es el donador de electrones en las bacterias quimiolitotróficas, este podría ser hidrolizado en azufre elemental y sulfito, los cuales serían oxidados a sulfato (Madigan y col., 2000).

### 1.5. Asimilación del azufre y del tiosulfato en *Bacteria*

El sulfato es asimilado por una variedad de organismos con el fin de utilizarlo en la biosíntesis de los aminoácidos azufrados metionina y cisteína. En los seres vivos la síntesis de casi todas las proteínas se inicia con metionina mientras que la cisteína juega un rol vital en la estructura, estabilidad y función catalítica de muchas proteínas (Kobayashi y col., 1997; Raina y Missiakas, 1997; Chung y col., 2000). Por esta razón el azufre es un componente esencial en muchos procesos biológicos. Resulta de interés mencionar que en muchas de las enzimas descritas que participan en el metabolismo oxidativo de los compuestos inorgánicos de azufre existen aminoácidos azufrados esenciales para su actividad. Como es el caso de la polisulfuro azufre transferasa Sud de

*Wolinella succinogenes* (Klimmek y col., 1999), la proteína SoxY de *P. pantotrophus* GB17 (Quentmeier y col., 2001), y otras relacionadas (Friedrich y col., 2000; Appia-Ayme y col., 2001). Considerando que muchas de ellas se inducen cuando el microorganismo oxida un sustrato azufrado, los requerimientos de aminoácidos azufrados se incrementarían, por lo tanto el transporte y asimilación de azufre sería vital en estos microorganismos.

Con la finalidad de transportar y asimilar el azufre, muchos organismos expresan una serie de transportadores y enzimas que están involucrados en dicha función. Una de las características del medio intracelular es ser reductor y por ello el sulfato antes de incorporarse a las moléculas orgánicas tiene que ser reducido y debe mantenerse en esa condición, para lo cual se requiere del gasto de mucho ATP (Sekowska y col., 2000). La ausencia de oxígeno y la compartimentalización celular facilita a la célula lograr este objetivo. Interesantemente, la incorporación del tiosulfato en *E. coli* no requiere de mayor gasto de ATP, y se ha demostrado que el tiosulfato es un excelente fuente de azufre (Sirko, 1990; Hryniewicz y col., 1990; Sirko y col., 1995).

En *E. coli* se han descrito los componentes genéticos moleculares del transporte y asimilación del sulfato y tiosulfato, muchos de los cuales se encuentran organizados en operones (Sekowska y col., 2000). En primer lugar el sulfato o tiosulfato serían transportados al citoplasma a través de una permeasa (sulfato/tiosulfato permeasa CysUWA) o de una proteína de unión a sulfato/tiosulfato (Sbp/CysP). Seguidamente se iniciaría la reducción del sulfato vía APS a sulfuro y éste sería finalmente utilizado en la biosíntesis de la cisteína (Figura 5). Ya hace algunos años Fry y García (1989) describieron en *A. ferrooxidans* algunas de las proteínas que participan en la asimilación

reductiva del sulfato, entre ellas la ATP sulfurilasa (CysD) y la APS quinasa (CysC). Por la peculiar fisiología de esta bacteria de oxidar y a su vez reducir compuestos azufrados se postula que la vía de reducción desasimilativa del sulfato podría funcionar en sentido reverso (Madigan y col., 2000).

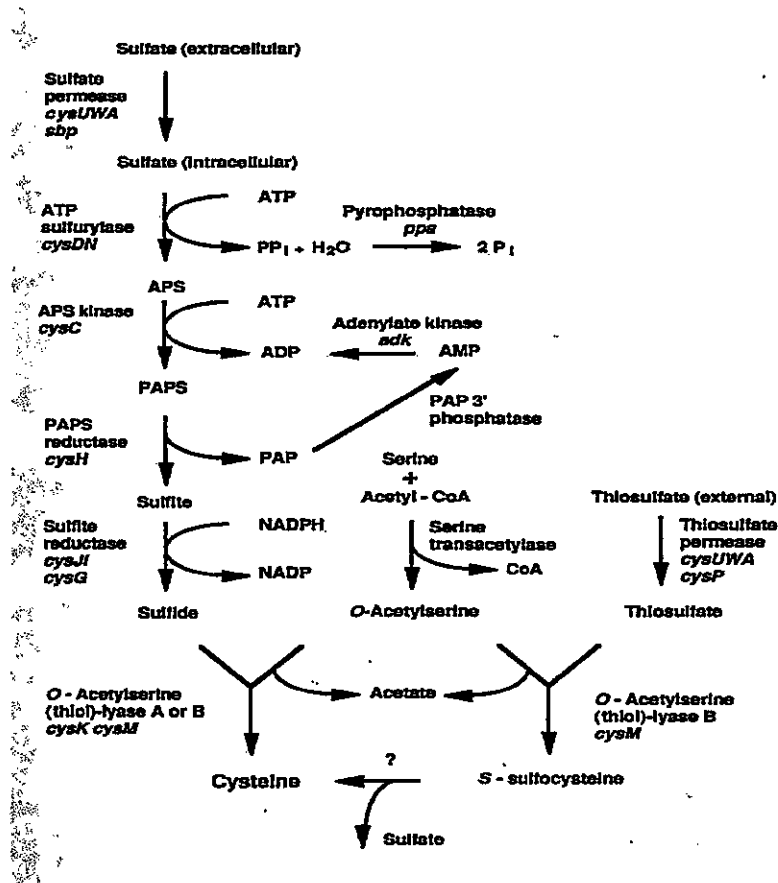


Figura 5. Vías de la asimilación del sulfato/tiosulfato y biosíntesis de la cisteína en *E. coli* (Sekowska y col., 2000).

## 1.6. Expresión de proteínas durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en azufre elemental

En experimentos previos a esta tesis, en nuestro laboratorio se han detectado mediante electroforesis bidimensional, varias diferencias en el patrón de expresión de proteínas en respuesta a distintos sustratos oxidables en microorganismos acidófilos quimiolitotróficos de interés en biominería, entre ellos *A. ferrooxidans*. Por ejemplo, la rusticianina se halla fuertemente inducida en las células crecidas en ion ferroso y disminuida en azufre (Osorio y col., 1993). Posteriormente, Guiliani y Jerez (1999) compararon el patrón de expresión de proteínas de membrana externa, membrana interna y fracción soluble y observaron varias proteínas sobreexpresadas en ion ferroso y otras en azufre elemental. Algunas de las proteínas que se inducen cuando las células crecen en azufre son similares a proteínas que participan en el metabolismo de compuestos azufrados.

Estos experimentos previos, conjuntamente con las evidencias presentadas de que el tiosulfato sería uno de los intermediarios principales de la oxidación de la pirita (Schippers y col., 1999) y del azufre elemental (Shrihari y col., 1993) nos permitió proponer como hipótesis de trabajo que las enzimas que participan en el metabolismo del tiosulfato se inducirían cuando *A. ferrooxidans* es cultivado en pirita y azufre elemental, mientras se espera un efecto contrario cuando la bacteria crece en hierro.

Durante el desarrollo de esta tesis se caracterizó una proteína de 21 kDa (P21) que se induce cuando *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crece en pirita, tiosulfato y otros compuestos inorgánicos de azufre reducido. Se encontró que esta proteína tiene un

---

dominio rodanasa típico de las TST y es exportada al lado periplásmico de la célula vía el sistema Sec. La búsqueda de otros componentes genéticos del metabolismo del tiosulfato se realizó a través de métodos bioinformáticos analizando vía internet la secuencia del genoma inconcluso de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. De esta manera se encontró otros dos genes similares a TST uno de los cuales se caracterizó parcialmente. Por otro lado mediante el análisis del proteoma de *A. ferrooxidans* identificamos además una proteína de 33 kDa de peso molecular que se induce cuando la bacteria crece en tiosulfato. El gen correspondiente fue localizado mediante genética reversa y presenta similitud con proteínas de unión a sulfato/tiosulfato.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas, plasmidios y condiciones de cultivo

#### 2.1.1. *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859

Se utilizó la cepa ATCC 19859 de *A. ferrooxidans* la cual se creció en el medio 9K modificado según el sustrato oxidable. Para el crecimiento en ion ferroso las células se cultivaron a 30°C en un medio a pH 1.5 que contenía ( $\text{g l}^{-1}$ ):  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 33.3;  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.4;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.1; y  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ , 0.04 (Amaro y col., 1991; Varela y col., 1998). Los cultivos en azufre elemental se realizaron en perlas de azufre al 5% y pH 2.5 (Arredondo y col., 1994). Para el crecimiento en los sulfuros metálicos, el sulfato ferroso del medio 9K se reemplazó por el correspondiente sulfuro metálico 1% (p/v). El ZnS, CuS y PbS (pureza > de 99%) se adquirieron de Aldrich® (Wisconsin, USA). La pirita (40% p/p Fe, pasada por un tamiz de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro) nos fue proporcionada por el Dr. Paul Norris. Los cultivos de *A. ferrooxidans* en tiosulfato se realizaron en el medio 71 DSMZ (<http://www.gbf.de/dsmz/media/med071.htm>) conteniendo 20 mM de tiosulfato y los siguientes componentes ( $\text{g l}^{-1}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.0;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.25. El pH se mantuvo estable alrededor de 4.6 por la adición de 1 M de NaOH.

### 2.1.2. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron JM109 (Promega<sup>®</sup>), BL21(DE3) (Novagen<sup>®</sup>) y BL21(DE3)pLysS (Novagen<sup>®</sup>). Estas se crecieron en medio Luria-Bertani (LB, g l<sup>-1</sup>: triptona 10.0; extracto de levadura 5.0 y NaCl 5.0) (Sambrook y Russell, 2001).

Para la preparación de placas con medio sólido, al medio LB se le adicionó agar (Difco<sup>®</sup>) a una concentración final de 1.5 % (p/v). En algunos casos el medio LB se suplementó con 1 mM de iso propil tio-β-D-galactósido (IPTG), 80 μg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal) y 100 ug/ml de Ampicilina o 34 μg/ml de cloramfenicol. Las soluciones stock de los antibióticos estuvieron a una concentración de 10 mg/ml. La cepa BL21(DE3) de *E. coli* que lleva el plasmidio pGZ105 con el inserto de *glpE* que codifica para la rodanasa de *E. coli* (Ray y col., 2000) fue gentilmente donada por el Dr. Timothy Larson.

### 2.1.3. Cepas y plasmidios de *E. coli* usadas y generadas durante la ejecución de esta Tesis

En las tablas 1 y 2 se indican las características más relevantes de las cepas y plasmidios usadas y generadas durante la ejecución de esta tesis.



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

Cepa	Características relevantes	Referencia
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96</i> <i>relA1 thi Δ(lac-proAB) F'[traD36 proAB<sup>+</sup></i> <i>lacI<sup>q</sup> lacZ ΔM15]</i> .	Sambrook y Russell (2001)
BL21(DE3)	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i> . Es un huésped de expresión general.	Novagen
BL21(DE3)pLysS	<i>F ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i> pLysS (Cm <sup>R</sup> ). Es un huésped de expresión en niveles altamente controladas.	Studier (1991)
PR21H	BL21(DE3), con el plasmidio pPR21H	Esta tesis
PR21MH	BL21(DE3), con el plasmidio pPR21MH	Esta tesis
MA14H	BL21(DE3)pLysS, con el plasmidio pMA14H	Esta tesis
PR1	BL21(DE3), con el plasmidio pET21b(+)	Esta tesis
PR2	BL21(DE3)pLysS, con el plasmidio pET21b(+)	Esta tesis

Tabla 3. Plasmidios de *E. coli* empleados y construidos en esta tesis

Plasmidio	Características relevantes	Referencia
pGEM-T	Derivado de pGEM-5ZF(+). Tamaño 3000 pb y lineal. Tiene timinas añadidas en el extremo 3'. Número de copias: 300-700. Confiere resistencia a Amp. Promotores T7 y SP6. Se usa para clonar productos de PCR.	Robles y Doers (1994)
pGEM-T Easy	Similar al anterior pero tiene 2 sitios de restricción adicionales. Tamaño: 3015 pb.	Robles y Doers (1994)
pET21b(+)	Derivado del pBR322. Número de copias: 25. Tamaño 5443 pb. Tiene un promotor T7, RBS de la proteína de la cápside mayor del fago T7. El sitio de clonamiento múltiple permite añadir 6 His en el C-terminal. Confiere resistencia a Amp.	Studier y col., (1990)
PLysS	Derivado de pACYC184, tiene el gen de la lizosima del fago T7 bajo el control del promotor T7. El plasmidio confiere resistencia al Cm.	Studier (1991)
pGEM-Tp21H	Derivado del pGEM-T con la inserción de <i>p21</i>	Esta tesis
PGEM-Tp21MH	Derivado del pGEM-T con la inserción de <i>p21</i> sin la secuencia del péptido señal	Esta tesis
pGEM-Tp14H	Derivado del pGEM-T con la inserción de <i>p14</i>	Esta tesis
pPR21H	Derivado del pET21b(+) con la inserción de <i>p21</i> en el sitio <i>NdeI/XhoI</i>	Esta tesis
pPR21MH	Derivado del pET21b(+) con la inserción en el sitio <i>NdeI/XhoI</i> de <i>p21MH</i>	Esta tesis
pMA14H	Derivado del pET21b(+) con la inserción en el sitio <i>NdeI/XhoI</i> de <i>p14H</i>	Esta tesis
pGZ105	Derivado del pT7-7 con la inserción de <i>glpE</i>	Ray y col., (2000)

## 2.2. Técnicas de biología molecular

Se utilizaron técnicas de DNA recombinante estándares similares a las descritas por Sambrook y Russell., (2001).

### 2.2.1. Extracción de DNA cromosómico

Para la extracción de DNA cromosómico de *A. ferrooxidans* se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del Wizard genomic DNA Purification kit (Promega®). El mismo se basa en una lisis celular seguido de digestión enzimática del RNA, precipitación del DNA genómico con isopropanol y solubilización en agua. El paso de preparación de las células se modificó y adaptó para *A. ferrooxidans* de la siguiente manera: 100 ml de cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en ion ferroso se centrifugaron a  $8000 \times g$  durante 10 min, y luego el pellet se resuspendió en 1 ml de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.0177M, pH 1.75. Este paso tiene por objetivo limpiar las células y eliminar el exceso de Fe<sup>3+</sup> que presenta el cultivo. Posteriormente el protocolo se utilizó sin modificaciones.

### 2.2.2. Extracción de DNA plasmidial

Se utilizó el protocolo de Wizard Plus Minipreps DNA Purification System Kit (Promega®). Este sistema se basa en una lisis celular alcalina, seguida de neutralización y centrifugación. Se utilizaron cultivos de *E. coli* crecidos en 5 ml de medio LB-Amp. Se siguió el protocolo recomendado por el proveedor cambiando el primer paso. Este cambio consistió en centrifugar 1.5 ml de cultivo a  $10,000 \times g$  por 2 min, y eliminar el sobrenadante. Sobre el pellet de células se volvió a centrifugar 1.5 ml del cultivo 2 veces

más. De esta forma se acumuló mayor masa celular ya que el cultivo utilizado se creció sólo entre 5 y 6 horas, en lugar de las 12 horas que se emplean habitualmente en un cultivo de toda la noche. El resto del protocolo se llevo a cabo sin cambios.

### 2.2.3. Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA genómico se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) de una dilución 1:50 de la solución de DNA obtenida (Sambrook y Russell, 2001). Una  $A_{260}$  corresponde a 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA en la solución. La pureza se comprobó mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$ .

### 2.2.4. Digestiones de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por el proveedor de las enzimas (New England Biolabs<sup>®</sup>). 1  $\mu\text{g}$  de los plasmidios pGEM-Tp21, pGEM-Tp14 o pET21b(+) se digirieron con 10 unidades enzimáticas de las enzimas de restricción correspondientes en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  durante 2 h a 37°C.

### 2.2.5. Ligaciones de DNA

Previo a las ligaciones con los vectores, a los fragmentos de PCR amplificados con la polimerasa *Pwo* se les realizó un tratamiento para añadirles una adenina (“A-tailing”). Este procedimiento se realiza porque la polimerasa *Pwo* no añade esta base nucleotídica en los amplificados. Brevemente, este tratamiento consistió en incubar 140 ng de fragmento con 1 unidad de Polimerasa *Taq* y 0.2 mM de ATP en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  durante 20 min a 70°C (Knoche y Kephart, 1999).

Para la ligación de los amplificadores por PCR de los genes *p21* y *p14* en el vector pGEM-T ó pGEM-T Easy se utilizaron 10 ng de vector y entre 10-50 ng de fragmento de PCR (lo necesario para alcanzar una relación molar de 1:1 a 3:1), 3 unidades de DNA ligasa T4 (Promega) en un volumen final de 10  $\mu$ l. La reacción se incubó a 4°C durante toda la noche. Para la ligación de los fragmentos *p21* o *p14* con el vector pET21b(+), todos digeridos con las enzimas *NdeI* y *XhoI*, se utilizaron 25 ng del vector y 20 ng del fragmento y se procedió a la reacción de ligación en las condiciones ya descritas.

#### 2.2.6. Transformaciones

En las transformaciones se utilizó productos de reacción de ligación o vectores. En el primer caso, se usó las células competentes JM109 (Promega®) que presentan una elevada eficiencia de transformación ( $1 \times 10^8$  ufc/ $\mu$ g de DNA) por lo que son adecuadas para transformar las bacterias con productos de ligación. Se utilizaron 50  $\mu$ l de la suspensión de células y 5  $\mu$ l de la reacción de ligación. La mezcla se incubó 20 min en baño de hielo y 2 min a 42°C, retornando rápidamente el tubo al hielo. Luego se agregó 950  $\mu$ l de medio LB, se incubó por 1 h a 37°C con agitación y se plaquearon alícuotas de 100 y 200  $\mu$ l en placas Petri con agar LB-Amp/IPTG/X-Gal.

Para la transformación con vectores se utilizó 25  $\mu$ l de la suspensión de células JM109 o BL21(DE3) o (BL21DE3)pLysS y 50 ng de vector. La mezcla se incubó 20 min en baño de hielo y 2 min a 42°C, retornando el tubo inmediatamente al hielo. Luego se agregó 950  $\mu$ l de medio LB, se incubó por 1 h a 37°C con agitación y se plaquearon

alícuotas de 100 y 200  $\mu$ l en placas Petri con agar LB-Amp o LB-Amp/Cm, según sea el caso.

### 2.2.7. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Para visualizar el DNA plasmidial o cromosomal, ya sea íntegro o digerido con enzimas de restricción, se utilizaron geles de agarosa. Los geles se prepararon en amortiguador TAE 0.5X (20 mM Tris-acetato pH 8.0, 0.5 mM EDTA), con una concentración de 1% de agarosa ultrapura (Gibco BRL<sup>®</sup> o Winkler<sup>®</sup>). Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga (0.25 % azul de bromofenol, 40 % sacarosa).

Como marcadores de estándares de peso molecular se utilizaron 1 kb DNA Ladder (Gibco BRL<sup>®</sup>) y 1 kb Ladder (Promega<sup>®</sup>). La tinción se realizó durante 10 min en una solución de TAE 0.5X con bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu$ g/ml. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta de 320 nm.

### 2.2.8. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa

Se utilizó el protocolo de Wizard PCR Preps DNA Purification System Kit (Promega<sup>®</sup>), sin modificaciones hasta el paso final. El método se basa en la escisión de la banda desde el gel de agarosa y la solubilización del material extraído en presencia de una resina que une DNA. La resina se carga en una mini columna, y se lava dos veces con isopropanol y el DNA se eluye con 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O precalentada a 65°C.

### 2.2.9. Clonamiento de productos de PCR

Para el clonamiento de fragmentos amplificados por PCR se utilizaron como vectores los plasmidios pGEM-T y pGEM-T Easy (Promega®). Estos vectores están específicamente diseñados para el clonamiento de productos de PCR ya que poseen nucleótidos de timina en sus extremos 3', los cuales se complementan con los nucleótidos de adenina del extremo 5' del amplificado, agregados por error de ciertas DNA polimerasas, como la *Taq* polimerasa.

Para las reacciones de ligación, se siguieron las instrucciones sugeridas por los proveedores, utilizando 1 µl de DNA ligasa T4 (3 U/µl) (Promega®), 1 µl de tampón para ligasa 10X, 1 µl de plasmidio (10 ng) y 7 µl de inserto (10-50 ng). Esta reacción se incubó por toda la noche a 4°C. Para transformar 50 µl de células competentes de la cepa JM109 (Promega®) de *E. coli* se utilizó un volumen de 5 µl de la reacción de ligación siguiendo el protocolo ya descrito. Al finalizar la transformación, a los tubos se les adicionó 950 µl de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación durante 1 h. Luego se plaquearon alícuotas de 100 y 200 µl de esta incubación en placas LB-Amp/IPTG/X-Gal. Las placas se incubaron a 37°C hasta el día siguiente. Las colonias celestes o blancas que se obtenían, se analizaron mediante PCR de colonias con los partidores SP6 y T7, que flanquean el sitio de clonamiento del vector.

### 2.2.10. Reacción de PCR sobre las colonias recombinantes

Se hizo la reacción de PCR con colonias para analizar los clones recombinantes obtenidos y comprobar la presencia de inserto. Esta reacción se realizó sin purificar el DNA plasmidial. El principio se basa en que este último queda en solución luego de la

lisis que sufren las bacterias con el primer paso de la PCR, que se realiza a 95°C. Se utilizaron partidores complementarios a las secuencias del vector que flanquean el sitio donde está clonado el inserto. Por lo tanto, si la colonia escogida tiene inserto, la reacción de PCR con colonias mostrará un amplificado del tamaño del inserto más un número de pares de bases, que corresponden al tamaño que se amplificaría si el vector no tuviese inserto. Se utilizó como templado 1 µl de una suspensión de células obtenidas picando un tercio de una colonia en 150 µl de agua destilada estéril. La reacción se realizó en un volumen de 10 µl conteniendo 15 pmoles de partidores, 0.1 mM dNTPs y 0.2 unidades de polimerasa *Taq*.

#### 2.2.11. Secuenciación de DNA

Para el secuenciamiento de DNA se utilizó el método de la terminación por didesoxinucleotido empleando el sistema dsDNA Cycle Sequencing System de Gibco BRL<sup>®</sup> sequence DNA usando [ $\gamma^{33}\text{P}$ ]ATP. Las secuencias de DNA obtenidas se compilaron y analizaron mediante el paquete de programas GCG versión 9.1 de la Universidad de Wisconsin (Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis.).

### 2.3. Búsqueda de genes de TSTs y de la proteína de unión a tiosulfato en

#### *A. ferrooxidans* ATCC 19859

##### 2.3.1. Búsqueda de los genes *p21*, *p14*, *p16* y *p33*

La búsqueda del gen de la proteína P21 se realizó haciendo un BlastP de la secuencia aminoácidica del extremo amino terminal de la proteína P21 contra la secuencia del genoma inconcluso de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*



(<http://www.tigr.org>). Este análisis nos permitió encontrar un marco abierto de lectura de 645 pb que codifica para una posible tiosulfato azufre transferasa y que presenta un dominio rodanasa característico de esta familia de proteínas. Este marco abierto de lectura se encuentra en el contig 7916. De manera similar se procedió para ubicar el gen que codifica para la proteína P33, encontrándose un marco abierto de lectura de 1008 pb que codifica una posible proteína de unión a sulfato/tiosulfato.

La búsqueda de otros genes homólogos a tiosulfato azufre transferasas en *A. ferrooxidans* se realizó haciendo un BlastP de la secuencia aminoacídica completa de la proteína P21 u otras TSTs contra la secuencia del genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*. Mediante este procedimiento se logró encontrar dos posibles marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas homólogas a rodanasas. A estos se les denominó *p14* y *p16* y se encuentran en los contigs 7920 y 7913, respectivamente.

#### 2.3.1.1. Partidores y condiciones de PCR para amplificar el gen *p21*

Las secuencias de los partidores para clonar el gen *p21* se diseñaron a partir del marco abierto de lectura obtenido de la secuencia del genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* (<http://www.tigr.org>). Los partidores específicos utilizados para el clonamiento del gen de la proteína P21 fueron:

P21NH2-*Nde*I (5'-ggAgAATCATATgTTCAAgCgCCTAgCA-3'),

P21M-*Nde*I (5'TggCCTCCCATATgAgACAgTggTAACCAA-3'),

P21CTER-*Xho*IHT (5'-TCCAAACCTCgAggATgCgCCTgCgggTTgTC-3') y

P21CTER-*Xho*I (5'-TgTTTCCAgAgCTCTCAATgCgCCTgCgg-3').

El esquema general de las reacciones de PCR fue el siguiente: 3 min a 95°C, seguidos por N ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de hibridación (X), con Y min de síntesis a 72°C. Finalizando con 3 min de síntesis final a 72°C. El número de ciclos (N), la temperatura de hibridación (X) y el tiempo de síntesis (Y), son función del tamaño del amplificado a obtener y de la T<sub>m</sub> de los partidores utilizados.

Para amplificar el gen *p21* se utilizó el protocolo "two-step HotPCR": 2 min a 95°C seguido por 25 ciclos a 95°C por 30 s y 72°C por 1 min, y finalmente 4 min a 72°C. Este protocolo se aplica cuando las T<sub>m</sub> de los partidores del gen a clonar son cercanos a la temperatura de hibridación como es el caso de los partidores diseñados para el clonamiento del gen *p21*. Las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador MJ Research.

#### 2.3.1.2. Partidores y condiciones de PCR para amplificar el gen *p14*

Los partidores utilizados para el clonamiento del gen de la proteína P14 fueron los siguientes:

P14NTER-*Nde*I (5'-gTTTTTA~~gTCATAT~~ggggAAggTCATgg-3')

P14CTER-*Xho*IHT (5'-TAggCTCCggCTCTCgA~~gggAAACgAC~~-3')

Las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador Tgradiente (Whatman Biometra). Este equipo permite determinar con mayor rapidez la temperatura óptima de hibridación del gen, al establecer en un solo paso una gradiente de temperaturas de hibridación. La gradiente incluyó las temperaturas 58.4, 60.8, 63.2, 65.6, 67.9, 70.1 y 71.5 °C. El protocolo de la reacción de la PCR fue el siguiente: 3 min a 95°C, seguidos por 25 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a la temperatura de hibridación, con 45 seg de

síntesis a 72°C. Finalizando con 3 min de síntesis final a 72°C. Este sistema nos permitió establecer en un solo paso que 60.8°C era la temperatura óptima para la amplificación del gen *p14*.

### 2.3.1.3. Clonamiento y expresión del gen *p21*.

Se utilizó el sistema de clonamiento pGEM-T (Promega®) y el sistema de expresión pET (Novagen®). El gen *p21* con péptido señal se obtuvo mediante PCR usando los partidores P21NH2-*Nde*I y P21CTER-*Xho*IHT correspondientes a las secuencias de los extremos amino terminal y carboxilo terminal de la proteína P21 y que contienen los sitios de restricción *Nde*I and *Xho*I, respectivamente. El gen *p21* sin péptido líder se clonó mediante el uso de los partidores P21M-*Nde*I y P21CTER-*Xho*IHT. Se usó la polimerasa *Pwo* (Roche®) y las amplificaciones se realizaron a bajo número de ciclos para disminuir los errores en las secuencias. Los fragmentos de DNA se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, se recuperaron y purificaron mediante el sistema de purificación “Wizard PCR Preps DNA Purification System Kit” (Promega®) y se ligaron al vector pGEM-T (Promega®). Con los productos de la ligación (plasmidios pGEM-T*p21H* y pGEM-T*p21HM*) se transformó la cepa JM109 de *E. coli* y los clones positivos se analizaron mediante PCR de colonia. Los plasmidios con el inserto se purificaron con el “Wizard Plus Minipreps DNA Purification System Kit” (Promega®). Los insertos se liberaron mediante la digestión de los plasmidios con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I y se ligaron al vector pET21b(+) (Novagen®). Los productos de ligación (los vectores pPR21H y pPR21MH con y sin secuencia codificante del péptido líder) se usaron para transformar la cepa BL21(DE3) de *E. coli*.

Los clones recombinantes se seleccionaron sobre medio sólido de LB-Amp (100 µg/ml). El análisis de la inducción/expresión se realizó en presencia y ausencia de 1 mM de IPTG, el cual fue añadido cuando la DO<sub>600</sub> nm de los cultivos alcanzaron 0.6 de absorbancia. La expresión de la proteína P21 recombinante (P21r) con y sin péptido señal fue analizado mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS y geles bidimensionales de extractos totales de células.

#### 2.3.1.4. Clonamiento y expresión del gen *p14*

Se utilizó básicamente la misma estrategia utilizada para el clonamiento y expresión del gen *p21*. El gen *p14* se obtuvo mediante PCR usando los partidores P14NTER-*Nde*I y P14CTER-*Xho*IHT correspondientes a las secuencias de los extremos amino y carboxilo terminales de la proteína P14 y que contienen los sitios de restricción *Nde*I and *Xho*I, respectivamente. Para la separación, purificación y ligación de los fragmentos de DNA se utilizó los mismos procedimientos descritos para el gen *p21* (2.3.1.3).

Con los productos de la ligación (pGEM-T*p14H*) se transformó la cepa JM109 de *E. coli* y los clones positivos se analizaron mediante PCR de colonia. Para purificar los plasmidios con el inserto se utilizó el “Wizard Plus Minipreps DNA purification system Kit” (Promega®). Los insertos se liberaron mediante la digestión de los plasmidios con las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I y se ligaron al vector pET21b(+) (Novagen®). De esta reacción se obtuvo el vector pMA14H que se usó para transformar la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. Los clones recombinantes se seleccionaron sobre medio sólido de LB-Amp/Cm (100 µg/ml y 34 µg/ml, respectivamente). El análisis de la inducción/expresión se realizó en presencia y ausencia de 1 mM de IPTG, el cual fue

añadido cuando la  $DO_{600}$  nm de los cultivos alcanzó 0.6 de absorbancia. La expresión de la proteína P14 recombinante (P14r) fue analizada mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS de extractos totales de células.

#### **2.4. Expresión y purificación de la proteína P21 recombinante (P21r)**

Para la purificación de la proteína P21r en condiciones desnaturalantes, se creció 5 ml de cultivo de la cepas durante toda la noche. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 1 ml de LB fresco, el que fue utilizado como inóculo para 300 ml de cultivo. El cultivo de 300 ml de la cepa BL21(DE3) transformada con el vector pPR21H o pPR21MH fue crecido hasta una  $DO_{600}$  nm de 0.6 e inducido con 1 mM de IPTG. Luego de 3 h las células se colectaron por centrifugación durante 20 min a 4,500 g y el pellet se resuspendió en 30 ml de amortiguador de unión 1X que contenía 5 mM de imidazol, 0.5 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 7.9. Las células se lisaron por sonicación (6 veces por intervalos de 30 s). Después de recolectar las células mediante centrifugación (20,000 x g por 15 min) el pellet se resuspendió en 5 ml de amortiguador de unión 1X que contenía 6 M de urea y se incubó por 1 h en un baño con hielo. Las muestras se centrifugaron (39,000 x g por 20 min) y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.45  $\mu$ m de porosidad. Seguidamente se aplicaron sobre una columna que contenía 1 ml de resina his-NTA. La proteína P21r fue eluida con 10 ml de amortiguador de elusión que contenía 300 mM de imidazol, 0.25 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, pH 7.9 y 6 M de urea. Las fracciones colectadas (0.5 ml) se analizaron mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS. Finalmente, las fracciones que contenían la proteína P21r, las cuales tuvieron escasa contaminación por otras proteínas, se

juntaron y renaturaron eliminando la urea mediante cinco pasos secuenciales de diálisis con amortiguador fosfato 67 mM (pH 5) con 6 M, 2 M, 1 M, 0.5 M y sin urea. Todas las diálisis se realizaron en presencia de 50 mM de tiosulfato y 200 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol.

## 2.5. Análisis de proteínas

### 2.5.1. Marcación de proteínas *in vivo* con [ $^{35}$ S]metionina

Para analizar el patrón global de síntesis de proteínas de las bacterias de *A. ferrooxidans*, las células se marcaron con 0.1 mCi de [ $^{35}$ S]metionina (NEN<sup>®</sup>, actividad específica = 1,087 Ci/mmol) durante el crecimiento. Las proteínas radiactivas se separaron por electroforesis 2D en geles de poliacrilamida, seguido de fluorografía y autorradiografía (O'Farrel, 1975; O'Farrel et al., 1977; Amaro et al., 1991; Seeger y Jerez, 1993).

### 2.5.2. Preparación de muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida

Las muestras para la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se trataron con amortiguador de muestra (Laemmli, 1970) que contenía: Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0,001%. Se calentaron a 100°C por 5 min. Luego se centrifugaron por 5 min para tomar el sobrenadante con las proteínas solubilizadas para la electroforesis.

Las muestras de proteínas totales para la electroforesis bidimensional sin alcanzar el equilibrio (2D-NEPHGE) se trataron tal como lo describen O'Farrel (1975) y Seeger y

col., (1996). Las muestras de células (4 mg de peso húmedo) se resuspendieron en 80  $\mu$ l de una solución de sonicación que contenía Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), MgCl<sub>2</sub> 5 mM y 50  $\mu$ g/ml de RNasa pancreática, se sonicaron y trataron con DNasa 50  $\mu$ g/ml, concentración final, por 10 min en baño de hielo. La mezcla se liofilizó y disolvió en un volumen adecuado de amortiguador de lisis (urea 9,5 M, Nonidet P-40 al 2%, anfolitos al 2% (pH 3-10, BioRad®) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 5%), para ser finalmente aplicadas en un gel. Para un gel 2D radiactivo se aplicaron 500,000 cpm.

### 2.5.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Los geles para electroforesis de poliacrilamida-SDS se prepararon según la técnica descrita por Laemmli (1970). Para el análisis de las proteínas totales se usó un gel concentrador al 3% y un gel separador con una concentración de 12.5% o 15% en poliacrilamida en presencia de SDS al 0.1%. Las electroforesis se corrieron a 200 V, hasta que el colorante indicador alcanzara el borde inferior del gel. Las proteínas se fijaron y se tiñeron con una solución que contenía azul de Coomassie al 2% en metanol al 50% y ácido acético al 7% por 30 min. Luego se destiñeron mediante lavados sucesivos con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 7%.

### 2.5.4. Electroforesis bidimensional de proteínas

Se utilizaron la técnica descrita por O'Farrel (1975) y O'Farrel y col. (1977). La primera dimensión consistía en una electroforesis en gradiente de pH sin alcanzar el equilibrio (2D NEPHGE). Para los geles en gradiente de pH sin alcanzar el equilibrio se estableció una gradiente de 3 a 10. La mezcla contenía urea 9.2 M, Nonidet P-40 al 2%,

acrilamida al 3.8%, bisacrilamida al 0.2%, anfolitos al 2% (del rango de pH 3 a 10), persulfato de amonio al 0.02% y N,N,N',N'-tetrametilendiamina al 0.014%. La electroforesis se realizó de manera que el reservorio superior de la cámara contuviese la solución de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM y el inferior la solución de NaOH 20 mM. Los geles se sometieron a electroforesis a 400 V por 5 h. Seguidamente, los geles se equilibraron durante 2 h en amortiguador de muestra (glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2.3% y Tris-HCl 0.0625 M, pH 6.8). Los geles equilibrados se sometieron inmediatamente a la segunda dimensión. La segunda dimensión consistía básicamente en el sistema de electroforesis de poliacrilamida-SDS, con algunas modificaciones. Se usó un gel separador de 11.5% de poliacrilamida y uno concentrador de 4,75% de poliacrilamida. Sobre el gel concentrador se colocó una solución de agarosa al 1% en amortiguador de muestra. Con esta solución todavía líquida, se colocó el gel de la primera dimensión, cubriéndolo nuevamente con esta solución de agarosa. La electroforesis, tinción y desteñido se realizaron en la forma descrita para la electroforesis de poliacrilamida-SDS. En el caso de los geles con las muestras radiactivas, estos se incubaron por 30 min con una solución para la detección fluorográfica (Amplify<sup>®</sup>, Amersham). Luego de secarse a 80 °C y al vacío, se expusieron a películas radiográficas (Fuji<sup>®</sup> tipo Super RX) a -80°C. Finalmente, las películas se revelaron y fijaron de acuerdo a procedimientos estándares.

#### 2.5.5. Preparación de las proteínas para microsecuenciamiento del extremo amino terminal

Las manchas de las proteínas de interés se cortaron con un bisturí a partir de los geles 2D teñidos con azul de Coomassie y secados. Después de rehidratarlos con 500 µl



de  $H_3BO_3$  al 0.1% durante 2 h a temperatura ambiente, los fragmentos se colocaron en los pocillos de un gel de poliacrilamida desnaturante-SDS al 12.5% y se le agregó 25  $\mu$ l de amortiguador de muestra 1X y se corrieron a 40 V hasta que la muestra atravesó el gel concentrador y luego a 100 V. Concluida la electroforesis de poliacrilamida-SDS, las proteínas se electrotransfirieron sobre membranas de difluoruro de polivinilideno (PDVF) (Matsudaira, 1989). La transferencia se realizó a 800 mA por 36 min y la tinción con 0.1% de azul de Coomasie en 50% de metanol por 5 min. La membrana se destiñó con una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10%.

#### 2.5.6. Microsecuenciación del extremo amino terminal

La microsecuenciación se realizó mediante la degradación de Edman (Matsudaira, 1989) en el Laboratoire de Microséquence des Protéines del Instituto Pasteur (Francia). Para la comparación de las secuencias obtenidas con proteínas en bases de datos se utilizó el algoritmo BlastT versión 2.0 (Altschul y col., 1997).

#### 2.5.7. Determinación cuantitativa de proteínas

Se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976) usando el Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Pierce<sup>®</sup>).

### 2.6. Análisis inmunológico de la expresión de la proteína P21r

Con el fin de analizar la expresión de la proteína P21 en células de *A. ferrooxidans* crecidas en distintos sustratos oxidables y en *E. coli* sobreexpresando esta proteína, se procedió a preparar un antisuero en ratones para usarlo en ensayos de Western blot.

### 2.6.1. Preparación de anticuerpos anti P21r

El antisuero contra la proteína P21r se preparó mediante inmunizaciones intraperitoneales (IP) en un ratón Balb/C. Se utilizó como antígeno aproximadamente 50 µg/dosis de proteína P21r. Esta cantidad de P21r se sometió a una electroforesis 2D con el fin de eliminar las posibles proteínas contaminantes. Para preparar las dosis de inmunización, se cortó el trozo de gel 2D que contenía la proteína P21r se rehidrató en el pocillo de un gel para electroforesis en una matriz solubilizable ProtoPrep<sup>®</sup> (National Diagnostics, Atlanta, USA), se rehidrató por 1 h en amortiguador de muestra 1X diluida con 50 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1% de SDS, pH 8. En este gel la acrilamida es reemplazada con ProtoPrep<sup>®</sup> y sirve para separar, purificar y recuperar proteínas para producir anticuerpos. Este consistió en un gel separador que se preparó con 11.25 ml de la solución de ProtoPrep<sup>®</sup> Concentrate, 3.75 ml de ProtoPrep<sup>®</sup> Buffer, 120 µl de persulfato de amonio al 10% y 15 µl de N,N,N',N'-tetrametilendiamina. El gel concentrador consistió en mezclar 2.5 ml de ProtoPrep<sup>®</sup> Stacking Buffer, 2.5 ml de ProtoPrep<sup>®</sup> Concentrate, 5 ml de agua bidestilada, 70 µl de persulfato de amonio al 10% y 10 µl de N,N,N',N'-tetrametilendiamina. Después de la electroforesis el gel se coloreó con azul de Coomassie, las bandas de la proteína P21r se cortaron y lavaron cuatro veces con agua bidestilada. Los trozos de gel que contenían la proteína P21r se pesaron y se disolvieron en un volumen (asumiendo 1 mg = 1 µl) de "ProtoPrep<sup>®</sup> Dissolution Reagent" por una hora a 80°C en baño de agua. Una vez ya disuelta, la mezcla viscosa de ProtoPrep<sup>®</sup> se mezcló con un volumen de coadyuvante completo de Freund (Gibco BRL<sup>®</sup>) y se agitó en un vortex durante 1 h para producir una emulsión inyectable. Las

inmunizaciones IP se realizaron cuatro veces, con intervalos de una semana. Después de una semana de la última dosis, se colectó la sangre del ratón y se obtuvo el suero mediante centrifugación.

### 2.6.2. Inmunoelectrotransferencia

Se utilizó la técnica de inmunoelectroforesis o "Western blot". Con este fin se separaron las proteínas totales mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. Se aplicó una corriente constante de 800 mA durante 36 min. La eficiencia de la electrotransferencia se confirmó mediante el uso de marcadores moleculares preteñidos (New England Biolabs®) y tiñendo el gel después de la electrotransferencia.

### 2.6.3. Detección inmunológica de proteínas

La membrana de PVDF conteniendo las proteínas transferidas, se incubó por 2 h con un amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.6) que contenía NaCl 137 mM (TBS), Tween 20 al 0.1% (TBST) y seroalbúmina bovina (BSA) al 1% (TBST-BSA). Luego se lavó tres veces por 15 min cada vez con TBS-T y luego se incubó por toda la noche con el antisuero policlonal de ratón anti P21r diluido 1/2,500. Seguidamente la membrana se lavó tres veces por 15 min cada vez con TBST. Se incubó por 2 h con anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham®) como anticuerpo secundario a una dilución 1/5,000. Se repitieron los tres lavados de la membrana y se procedió a la detección de la reacción antígeno-anticuerpo sobre la membrana. Con este fin se aplicó el método colorimétrico recomendado por Promega®. Este consistió en

incubar la membrana con amortiguador TBS que contenía metanol 20% (v/v), 4-Cloro-1-naftol 0.5 mg/ml (Biorad®), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.15% (Merck®). La reacción se realizó en la oscuridad y luego se visualizó las bandas. Las intensidades relativas de las bandas de la proteína P21 en los Western blots se determinaron mediante el uso de un scanner y el programa Scion Image ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)) para el análisis de imágenes.

La especificidad del suero anti-P21r se probó tanto con suero preinmune e inmune (dilución 1/4,000) contra la proteína P21r y proteínas totales de *A. ferrooxidans* y *E. coli* BL21(DE3). No se observó reacción cruzada con proteínas de *E. coli*, mientras que solamente se observó una banda de reacción en las muestras de *A. ferrooxidans* y ninguna banda se observó con el suero preinmune, indicando que el suero fue monoespecífico.

#### 2.6.4. Inmunomicroscopía electrónica con cortes finos de células de *A. ferrooxidans* ATCC 19859

Células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre e ion ferroso se cosecharon por centrifugación (10 min, 6,000 x g, 4°C), lavadas en 1 ml de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.0177M (pH 1.75) y los pellets se fijaron con 4% de paraformaldehído en amortiguador fosfato 0.1 M (pH 7.0) por 2 h a 4°C. Seguidamente, las células se deshidrataron con varias series de etanol y se infiltraron con 1:1 Unicril®-etanol y Unicryl® puro (Energy Beam Sciences, Inc.) por 4 h y toda la noche, respectivamente. Las muestras se colocaron en cápsulas de gelatina y se dejó polimerizar por 72 h a 45°C. Los cortes ultrafinos se realizaron con un Ultramicrotomo Sorval MT-2B y se colectaron sobre rejillas níquel.

Los cortes ultrafinos se bloquearon toda la noche con BSA al 1% en amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 7.6) que contenía 137 mM de NaCl y 0.05% de Tween 20 (TBST). Los cortes se lavaron cinco veces con TBST y se incubaron con el anticuerpo anti-P21r a una dilución de 1/50 en TBST-BSA por 2 h a temperatura ambiente. Los cortes ultrafinos se lavaron cinco veces de la misma manera (10 min cada vez), y se incubaron con el anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con partículas de oro de 10 nm de diámetro (Sigma<sup>®</sup>) a una dilución de 1/10 por 1 h en TBST-BSA para poder detectar la unión del anticuerpo primario. Seguidamente, los cortes se lavaron cinco veces con TBST y tres veces con agua bidestilada. Finalmente, las secciones se tiñeron con acetato de uranilo y se observaron a 80 kV en un microscopio electrónico de transmisión (Phillips Tecnai 12) en el Centro de Microscopía Electrónica de la Universidad Católica de Chile.

## **2.7. Fraccionamiento subcelular de *A. ferrooxidans* y *E. coli***

Para localizar la proteína P21 se procedió al fraccionamiento subcelular de *A. ferrooxidans* en las siguientes fracciones: membrana externa, membrana interna y soluble. Paralelamente se extrajeron proteínas del periplasma de las células mediante shock osmótico en frío.

### **2.7.1. Separación de fracción soluble, membrana interna y externa**

La membrana externa se obtuvo de acuerdo a lo descrito por Guiliani y Jerez 2000. Según éste procedimiento se define la fracción soluble (FS) como el sobrenadante obtenido después de la primera centrifugación a 100,000 x g por 2 h y el pellet como la

fracción de membrana total (MT). La fracción con las proteínas de membrana interna (PMI) se consideró como el último sobrenadante obtenido después del tratamiento de la fracción de membrana total en presencia de lauril sarcosinato de sodio al 2% y el pellet resultante fue la preparación de proteínas de membrana externa (PME).

Las células se cosecharon por centrifugación a  $15,000 \times g$  por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pellet se lavó tres veces con ácido sulfúrico diluido 0.01 N (pH 2.0), tres veces con citrato de sodio 10 mM (pH 6.9) y una vez con amortiguador de sonicación (Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM; pH 8.15; RNasa A 50  $\mu\text{g}$  por ml). Todas las soluciones contuvieron 50  $\mu\text{g}$  por ml de PMSF. El pellet se resuspendió a razón de 20 mg de células (peso húmedo) por 2 ml de amortiguador de sonicación. La suspensión celular se sonicó cinco veces por 30 seg y el lisado se centrifugó a baja velocidad ( $11,500 \text{ g} \times 20 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ ) para eliminar las células enteras. El sobrenadante se centrifugó a  $100,000 \times g$  por 2 h a  $4^{\circ}\text{C}$ , y el sobrenadante obtenido en este caso se consideró como la fracción soluble (FS) y el pellet como la fracción de membrana total (MT). La FS contiene las proteínas del periplasma y del citoplasma. El pellet de MT se lavó con amortiguador de sonicación en presencia de NaCl 50 mM, se resuspendió en lauril sarcosinato de sodio al 2% e incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 h. La suspensión fue centrifugada a baja velocidad ( $11,500 \text{ g} \times 20 \text{ min}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ ) y el sobrenadante se recentrifugó a  $100,000 \text{ g} \times 2 \text{ h}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante final obtenido contiene las proteínas de la membrana interna (PMI) y el pellet resultante, las proteínas de membrana externa (PME). La PME obtenidas de 20 mg de células se solubilizaron con 40  $\mu\text{l}$  de Nonidet P-40, 10  $\mu\text{l}$  de DTT y 5  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol a  $56^{\circ}\text{C}$  en baño de agua por 30 min. Para preparar las fracciones correspondientes a *E. coli*

se siguió el mismo procedimiento con la excepción de no lavar las células con ácido sulfúrico 0.01N (pH 2.0) y citrato de sodio 10 mM (pH 6.9).

### 2.7.2. Extracción de proteínas del periplasma de *A. ferrooxidans*

Se procedió de acuerdo a Laudenbach y col. (1991), con modificaciones. Las células crecidas en azufre elemental, ion ferroso o tiosulfato se cosecharon por centrifugación a 10,000 g x 15 min a 4°C y se lavaron dos veces por centrifugación (9,000 x g por 5 min a 4°C) con el medio base sin sustrato oxidable. El pellet de células resultante se resuspendió en Tris-HCl 30 mM (pH 7.5) conteniendo EDTA 2 mM y sacarosa al 40% a la razón de 20 mg por ml, y se incubó a 30°C con agitación rotatoria (150 rpm). Las células se colectaron por centrifugación (8,000 x g por 10 min a 4°C) y el pellet resultante se resuspendió en Tris-HCl 30 mM previamente enfriado a razón de 35 mg/ml. Esta suspensión se incubó en baño de hielo por 10 min y el sobrenadante se separó por centrifugación a 12,000 x g por 10 min. Este sobrenadante se define como la fracción que contiene las proteínas del periplasma (FP) obtenidas mediante shock osmótico en frío.

### 2.8. Determinación de la actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa

El ensayo se sustenta en que las tiosulfato:cianuro azufre transferasas (rodanasas) catalizan la transferencia del azufre sulfano del tiosulfato al cianuro, generando tiocianato y sulfito. En el ensayo se mide la velocidad con que la enzima produce tiocianato. El tiocianato se cuantifica como tiocianato férrico midiendo su absorbancia a 470 nm ( $A_{470}$  nm). La actividad enzimática con extractos crudos o proteína purificada se

determinó inicialmente en las condiciones de pH, sales y temperatura establecidos por Silver y Lundgren (1969) y Ray y col., (2000). Las mediciones se realizaron a 30°C en una solución de Tris-HCl 100 mM (pH 8.5), tiosulfato de sodio 50 mM, KCN 50 mM en un volumen final de 1 ml. La reacción se inició por la adición de KCN y se detuvo con 0.25 ml de formaldehído al 37%. Se desarrolló el color con la adición de 0.2 ml del reactivo de nitrato férrico (100 g de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$  y 200 ml de  $\text{HNO}_3$  al 65% para 1,500 ml de reactivo). Las muestras se centrifugaron a 13,000 x g por 5 min y se determinó la  $A_{470}$  nm. Además se midió la actividad rodanasa en las condiciones descritas por Singlenton y Smith (1988) y Gardner y Rawlings (2000). Las mediciones se realizaron a 30°C en una solución de amortiguador fosfato 67 mM (pH 7.5), tiosulfato de sodio 100 mM, KCN 100 mM y NaCl al 20% en un volumen final de 0.5 ml. La reacción se inició por la adición de KCN y se detuvo con 45  $\mu\text{l}$  de formaldehído al 37%. El desarrollo del color se realizó con 0.5 ml de reactivo de nitrato férrico ya descrito y se midió la  $A_{470}$ . La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{M}$  de tiocianato por minuto en las condiciones antes descritas. En todas las determinaciones se usó como controles las reacciones no enzimática y sin sustrato. Con fines de comparación, se utilizó la rodanasa GlpE recombinante de *E. coli* (Ray y col., 2000).

## **2.9. Análisis *in silico* de secuencias y comparación con bases de datos**

El análisis de la identidad/similitud en los bancos de datos se realizó mediante los programas BLASTP y PSI-BLAST (Altschul y col., 1997) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utilizando el sitio del genoma inconcluso de *A.*



*ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://www.tigr.org>). Esta secuencia genómica se utilizó también para el diseño de partidores específicos.

Los alineamientos múltiples se realizaron mediante el programa ClustalW 1.8 (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) y se editaron con el programa BOXSHADE 3.21 ([http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/software/BOX\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/software/BOX_form.html)). Las masas moleculares y los puntos isoeléctricos de los ORFs se calcularon usando el programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>). La posible presencia de péptido señal se analizó usando el programa SignalP versión 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y los dominios de transmembrana con el programa TMPRED (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED>). Las posibles funciones y localizaciones subcelulares de las proteínas codificadas por los diferentes ORFs se predijeron mediante el uso del programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## **2.10. Número de acceso a base de datos de la secuencia nucleotídica**

La secuencia nucleotídica del gen *p21* se halla disponible en el banco de datos de EMBL con el número: AJ312238.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. La oxidación del tiosulfato en *A. ferrooxidans*

La proteómica constituye una herramienta muy útil para analizar la expresión de proteínas de un organismo expuesto a distintas condiciones medio ambientales. A partir de la secuencia del extremo amino terminal de las proteínas se puede llegar a ubicar el gen correspondiente en la secuencia del genoma del organismo en estudio, si es que éste se ha secuenciado total o parcialmente, como es el caso de *A. ferrooxidans*. Como parte de esta tesis se utilizó esta estrategia experimental e *in silico* para intentar dilucidar el metabolismo del tiosulfato en *A. ferrooxidans* ATCC 19859. Parte de estos resultados ha sido publicados recientemente (Ramírez y col., 2001; Ver Anexo).

##### 3.1.1. Identificación de una proteína de 21 kDa que se induce cuando *A. ferrooxidans* crece en pirita

Para caracterizar algunas de las proteínas sintetizadas por *A. ferrooxidans* durante su crecimiento en diferentes sustratos oxidables, se utilizaron geles 2D NEPHGE de las proteínas totales y se tiñeron con azul de Coomassie tal como se muestra en la figura 6. Publicaciones previas de nuestro laboratorio mostraron diferencias en el patrón general de síntesis de proteínas de *A. ferrooxidans* crecido en ion ferroso en comparación con el observado cuando la bacteria crece en azufre elemental (Osorio y col., 1993). Las diferencias incluyen la inducción y la represión de la síntesis de numerosos polipéptidos. Detectamos la inducción de una proteína de 21 kDa de peso molecular (P21) que

---

aumenta notoriamente su síntesis cuando la bacteria crece en pirita en comparación a ion ferroso (Figura 6B). Como se observa, la proteína P21 se halla totalmente ausente cuando *A. ferrooxidans* crece en ion ferroso (gel A) mientras que se induce abundantemente cuando las células crecen en pirita (gel B). Por otro lado, la rusticianina (Rus), una proteína que se sabe que se encuentra presente cuando el microorganismo crece en ion ferroso, se induce en ambas condiciones, aunque en mayores concentraciones en las células crecidas en ion ferroso.

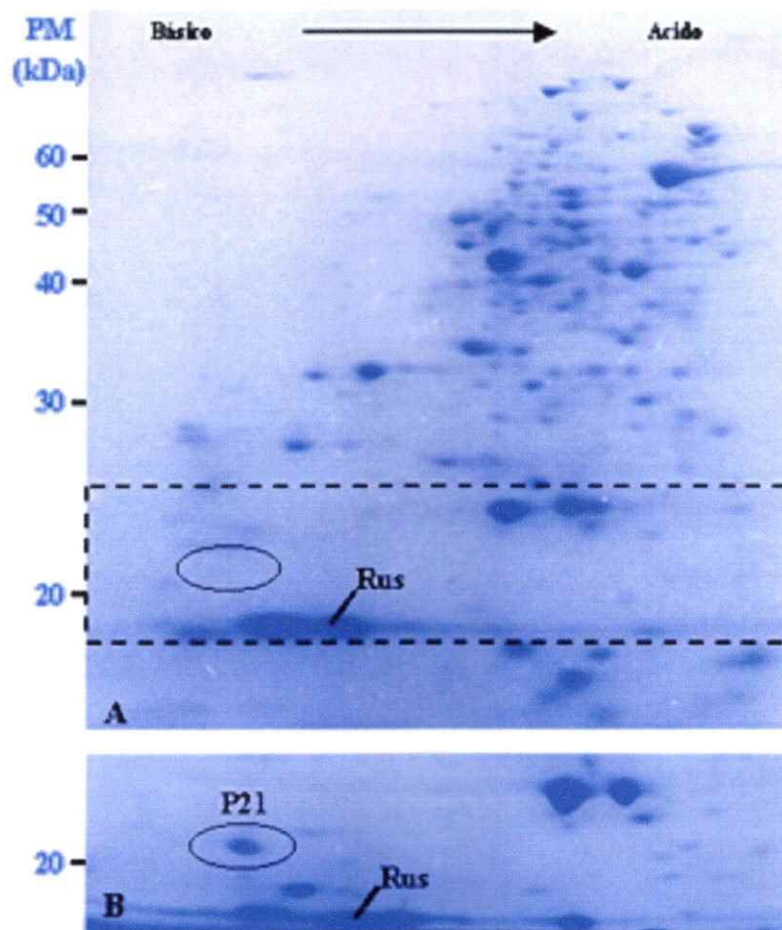


Figura 6. Inducción de la expresión de la proteína P21 cuando *A. ferrooxidans* crece en pirita. Las proteínas totales de las células crecidas en ion ferroso (A) o en pirita (B) se separaron mediante 2D-NEPHGE con un gradiente de pH entre 3.0 (a la derecha del gel) y 10.0 (a la izquierda del gel), y las proteínas se colorearon con azul de Coomassie. En el panel A, el área delimitada con líneas entrecortadas contiene el óvalo que muestra la región donde migra la proteína P21. En el panel B, solamente se muestra esta región. Los números a la izquierda de los gels indican los pesos moleculares de las proteínas estándares en kilodaltons. Rus, la posición de migración de la rusticianina.

### 3.1.2. Identificación del gen *p21* mediante genética reversa

Con el objetivo de identificar el gen *p21* se aisló la proteína P21 a partir de los geles 2D y se sometió su extremo amino terminal a microsecuenciación de Edman, obteniéndose la siguiente secuencia aminoacídica: DDSGNQAAQQVLNARMEKFFADQKPYG. Se buscó la presencia de esta secuencia en el genoma preliminar de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* disponible en internet (<http://www.tigr.org>) mediante el programa tBLASTN e identificamos un marco abierto de lectura de 645 pares de bases al interior del cual se hallaba una secuencia que presentaba 100% de identidad con el extremo amino terminal de la proteína P21 obtenida mediante microsecuenciación de Edman. El gen *p21* codifica para un polipéptido de 215 aminoácidos con un posible péptido señal de 28 aminoácidos (Figura 7), sugiriendo que la proteína P21 es exportada posiblemente al periplasma de *A. ferrooxidans*. Este péptido señal tiene todas las características de un péptido señal de una bacteria Gram-negativa: en el extremo del amino terminal presenta aminoácidos cargados positivamente, luego continúa una región de residuos hidrofóbicos, una glicina al final de esta región que permitiría la formación de una alfa hélice, y finalmente una secuencia consenso para el corte por la peptidasa (Ala/Gli/Ser)-X-(Ala/Gli/Ser), un motivo característico de aquellas proteínas cuyo transporte se realiza vía el sistema Sec (Pugsley, 1993). Los resultados mostraron que el sitio de corte precedido por el programa SignalP (A S A ↓ D D S) coincidía con la secuencia amino terminal de la proteína madura obtenida de los geles.

A

```

atggttcaagcgcctagcaaacgccgcaattccatttgccttggtcggtatgttattcggg
M F K R L A N A A I P F A L V G M L F G 20
      1                2                3
ctgtcggatatcgggtggcctccgccgacgacagtggttaaccaagccgcacaacaagtgtt
L S V S V A S A D D S G N Q A A Q Q V L 40
      4
aatgcacgcatggagaaaattctttgcgatcagaaaccctttccctacggcacctatcag
N A R M E K F F A D Q K P F P Y G T Y Q 60
tatacggaccgcagcttgttattggcgatcagcaaggatcccagcaaatatgcggtgatc
Y T D R S L L L A I S K D P S K Y A L I 80
gatatccggacgccaacctatcacgatttttctgcgaggatgcattccaacaagcatgtc
D I R T P T Y H D F F C G V H S N K H V 100
tgcaccggacggggctggcaacgtatttacggctatgcacagggccatgtgccagggtgct
C T G R G W Q R I Y G Y A Q G H V P G A 120
cagaatatcccgatatctgaaccttctgcgccatcaagagcgacagcattccccaaaaac
Q N I P Y L N L P A A I K S D S I P K N 140
aagaccgttatcctcatgtgtccgacgggccagctatccaaccagacggccggagtattg
K T V I L M C P T G Q L S N Q T A G V L 160
cgcatgctcgggttatgacgcctacgccttgcgtggcgggtcaatggctggaaaaaagca
R M L G Y D A Y A L R G G V N G W K K A 180
gggtacccattgtcatcggtaaagacggggcaccatggcgcaggcgtgtcatccctgg
G Y P I V I G K E P G T M A Q A C H P W 200
cagacgtgctggcggcagttccagtatgacaaccgcaggcgcattga
Q T C W R Q F Q Y D N P Q A H * 215

```

B

### Putative conserved domains have been detected



Figura 7. A, Secuencia nucleotídica del gen *p21* y de la secuencia de aminoácidos deducida para la proteína P21. En la secuencia de la proteína P21 se indica subrayado el péptido señal de 28 aminoácidos. En este péptido señal se indican (en gris): 1, los residuos cargados positivamente; 2, la región con residuos hidrofóbicos; 3, un residuo de Glicina y 4, la secuencia consenso de corte (Ala/Gli/Ser)-X-(Ala/Gli/Ser). La flecha indica el sitio de corte del péptido líder. En la secuencia nucleotídica se indica el posible codón de inicio (en verde) y de término (en rojo) de la traducción. B, la proteína P21 presenta un dominio rodanasa.

En base a esta información se procedió a diseñar los partidores específicos P21NH2-*Nde*I, P21M-*Nde*I, P21CTER-*Xho*IHT y P21CTER-*Xho*I para clonar y secuenciar el gen *p21* con y sin péptido señal. Estos partidores se utilizaron además para añadirle una cola de His durante su clonamiento, que nos permitió purificarla mediante el uso de una columna de afinidad por níquel.

### 3.1.3. Clonamiento y secuenciación del gen *p21*

Con los partidores diseñados se amplificó el gen *p21* con y sin péptido señal utilizando como templado el DNA de la cepa ATCC 19859 de *A. ferrooxidans*. A los fragmentos se les agregó sitios de restricción para las enzimas *Nde*I y *Xho*I en los extremos 5' y 3'. Estos fragmentos amplificados se ligaron al vector pGEM-T (Figura 9). La mezcla de ligamiento se usó para transformar la cepa de *E. coli* JM109. De las colonias transformantes y recombinantes se seleccionó un clon de cada construcción y se secuenciaron los vectores resultantes (pGEM-T*p21*H y pGEM-T*p21*MH). Todas las amplificaciones se realizaron usando el DNA genómico de la cepa ATCC 19859 de *A. ferrooxidans*. Es importante remarcar que los amplificados con los partidores diseñados del gen *p21* a partir de la secuencia del genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* dieron bandas específicas. La secuencia obtenida por nosotros presentó 100% de identidad con la secuencia hallada en el genoma de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

### 3.1.4. La proteína P21 presenta similitud con tiosulfato azufre transferasas

El análisis mediante el programa PSI-BLASTP de la secuencia aminoacídica de la proteína P21 con otras proteínas de banco de datos reveló la presencia en la proteína P21 de un dominio rodanasa que presenta un 27% de identidad y 42% de similitud con una azufre transferasa de *Deinococcus radiodurans* y valores parecidos con otras rodanasas de otros organismos. El alineamiento múltiple con el programa ClustalW de la proteína P21 con otras azufre transferasas cuyas actividades se han demostrado *in vitro* muestra que esta proteína tiene conservado el sitio activo y los motivos estructurales CH2A y CH2B (Fauman y col., 1998; Ray y col., 2000) característicos del dominio rodanasa en todas las proteínas comparadas (Figura 8). Estos resultados *in silico* incrementaron nuestro interés en clonar el gen *p21* en un vector de expresión y sobreexpresarlo en *E. coli* con el fin de reconstituir su actividad *in vitro*.





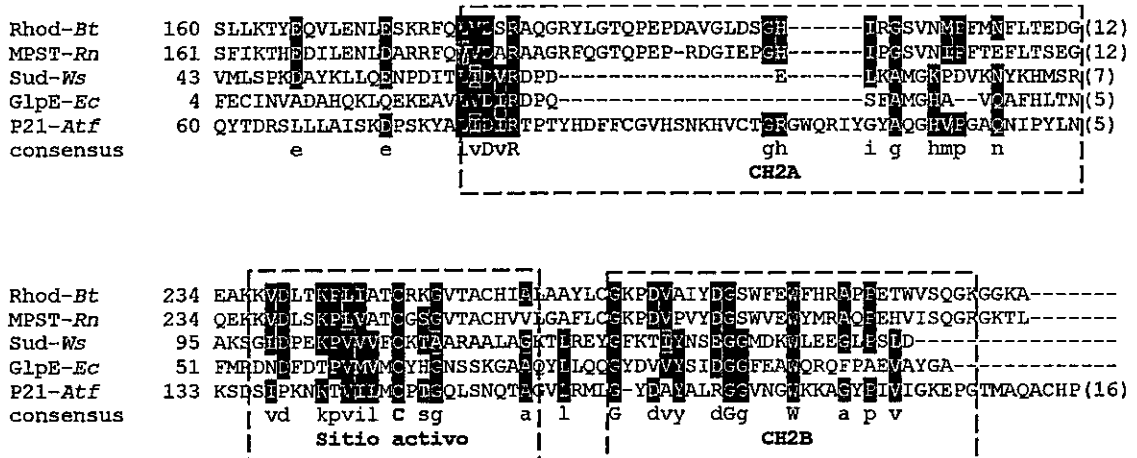


Figura 8. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína P21 de *A. ferrooxidans* con otras azufre transferasas representativas. El sitio activo y los dos motivos estructurales CH2A y CH2B del dominio rodanasa se indican en recuadros. En el sitio activo se indica en negrita una cisteína conservada en todas las secuencias. Se alinearon con las secuencias de la rodanasa GlpE de *E. coli* (GlpE-Ec), la rodanasa de *Bos taurus* (Rhod-Bt), la mercaptopiruvato azufre transferasa de *Ratus norvegicus* (MPST-Rn) y la sulfuro deshidrogenasa de *Wolinella succinogenes* (Sud-Ws). Números de acceso en banco de datos: GlpE-Ec, M96795; Sud-Ws, X81642; Rhod-Bt, M58561; MPST-Rn, D50564; P21-Atf, AJ312238.

### 3.1.5. Clonamiento del gen *p21* de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 en el sistema de expresión pET

Con el fin de dilucidar las propiedades funcionales de la proteína P21 decidimos en primera instancia clonarla el gen *p21* en un vector de clonamiento (ver 3.1.3) y de allí subclonarlo en el vector de expresión pET. Los plasmidios pGEM-*Tp21H* o pGEM-*Tp21MH* que contenían el gen *p21* con o sin péptido señal se sometieron a digestiones con las enzimas *NdeI* y *XhoI* para liberar el inserto correspondiente para luego ligarlos al vector de expresión pET21b(+), previamente digerido con las mismas enzimas. Con los productos de ligación se transformó la cepa BL21(DE3) de *E. coli*. Esta cepa tiene una copia del gen de la RNA polimerasa del fago T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. La adición de IPTG a los cultivos induce la expresión de la T7 RNA polimerasa y ésta transcribe el gen clonado bajo el control del promotor T7. Las cepas obtenidas se denominaron PR21H y PR21MH.

La selección de las transformantes se realizó mediante resistencia a Amp y PCR de colonias. Los cultivos se crecieron en medio LB-Amp y se indujeron con 1 mM de IPTG durante 2 h. Cuando se analizaron los extractos crudos provenientes de la cepa PR21MH en presencia o ausencia de IPTG mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS, se observó la inducción de una banda proteica de 21 kDa (Figura 10c) en presencia de IPTG. La elevada sobreexpresión de la proteína P21 produjo cuerpos de inclusión por lo que se procedió a purificarla en condiciones desnaturantes por cromatografía de afinidad de níquel, seguida por renaturación. La secuencia del gen clonado se verificó mediante secuenciación de ambas hebras, mostrando un 100% de identidad con la secuencia

obtenida a partir del genoma de la cepa 23270 (datos no mostrados). En conclusión la proteína P21 es idéntica a la existente en la cepa ATCC 19859.

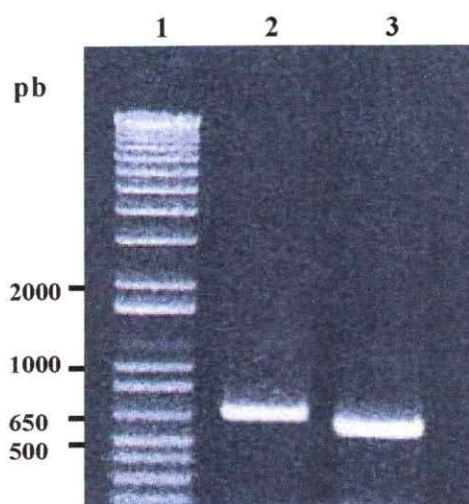


Figura 9. Amplificación por PCR del gen *p21* con y sin péptido señal. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. **1**, estándar de peso molecular. Los números de la izquierda indican el tamaño de éstos en pb; **2**, amplificado del gen *p21* con péptido señal empleando los partidores P21NH2-*Nde*I/P21CTER-*Xho*I/HT (662 pb); **3**, amplificado del gen *p21* sin péptido señal, usando los partidores P21M-*Nde*I/P21CTER-*Xho*I/HT (579 pb).

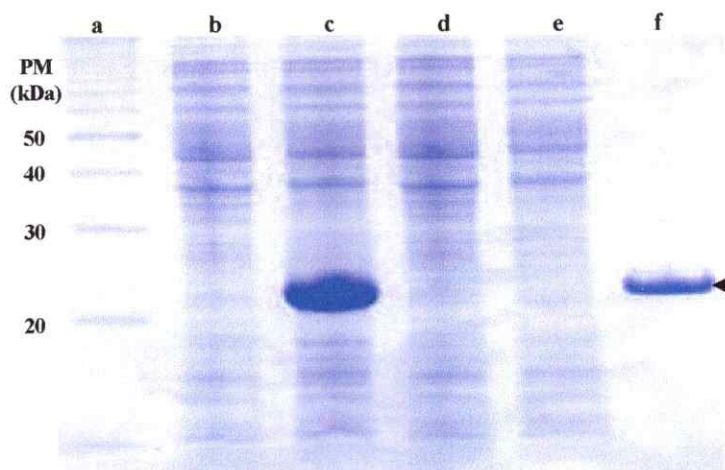


Figura 10. Sobreexpresión *in vivo* del gen *p21* en *E. coli*. El plasmidio pPR21MH (b, c) o el vector sin inserto (d, e) se usaron para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3). En la fase logarítmica de crecimiento a las cepas se adicionaron (c, e) o no (b, d) 1 mM de IPTG por 2 h. Muestras de proteínas totales (b, c, d y e), estándares de peso molecular (a) y la proteína purificada (f) se separaron mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS y se tiñeron con azul de Coomassie. La punta de una flecha indica la posición de migración de la proteína P21.

### 3.1.6. Análisis de la expresión de la proteína P21 en *A. ferrooxidans* crecido en distintos sustratos oxidables.

La síntesis de la proteína P21 similar a rodanasa aparentemente se halla regulada por la presencia de ion ferroso en el medio de crecimiento. Encontramos que esta expresión se encuentra fuertemente reprimida a medida que se incrementa la concentración del ion ferroso. En la tabla 5 se presentan los cambios observados en la expresión de la proteína P21 y de la rusticianina cuando *A. ferrooxidans* crece en azufre elemental y se le añade cantidades crecientes de ion ferroso. Se observa una evidente disminución de los niveles de síntesis de P21 y el incremento en los niveles de síntesis

de la Rus. Esto sugiere que la proteína P21 que se halla regulada por la concentración de ion ferroso en el medio de crecimiento.

Por otro lado, cuando se analizó la síntesis de la proteína P21 en células crecidas en ion ferroso, azufre elemental, tiosulfato o sulfuros metálicos (sulfuro ferroso, sulfuro de zinc y sulfuro de cobre) mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS seguido de Western blotting con el antisuero anti-P21r, se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 11A. Evidentemente, se observa una gran inducción de la proteína P21 cuando las células crecen en pirita (carril d), mientras que las células que crecen en ion ferroso se encuentran totalmente carentes de P21 (carril a), en concordancia con los resultados que se muestran en la tabla 5. Las células que crecen en presencia de azufre elemental (carril b), presentan niveles de inducción ligeramente menores al observado en células crecidas en pirita ( $\text{FeS}_2$ ), pero niveles mucho mayores que los observados cuando la bacteria crece en tiosulfato (carril c), CuS (carril e) o ZnS (carril f) (Figura 11B).

Tabla 4. Efecto de la concentración del ion ferroso sobre la expresión de la proteína P21

$\text{Fe}^{2+}$ (mM)	Niveles relativos de proteína <sup>a</sup>	
	P21 (%)	Rus (%)
0.5	100.0	100.0
5	44.4	260.8
10	2.7	391.3

<sup>a</sup> A los cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en azufre elemental se les añadió concentraciones crecientes de ion ferroso (0.5, 5 y 10 mM) y seguidamente se les añadió [<sup>35</sup>S]metionina. Después de 30 h en estas condiciones las proteínas totales se separaron por 2D y luego sometidas a autorradiografía. Las intensidades de las manchas correspondientes de la proteína P21 y la rusticianina se determinó mediante el uso del programa Scion Image.

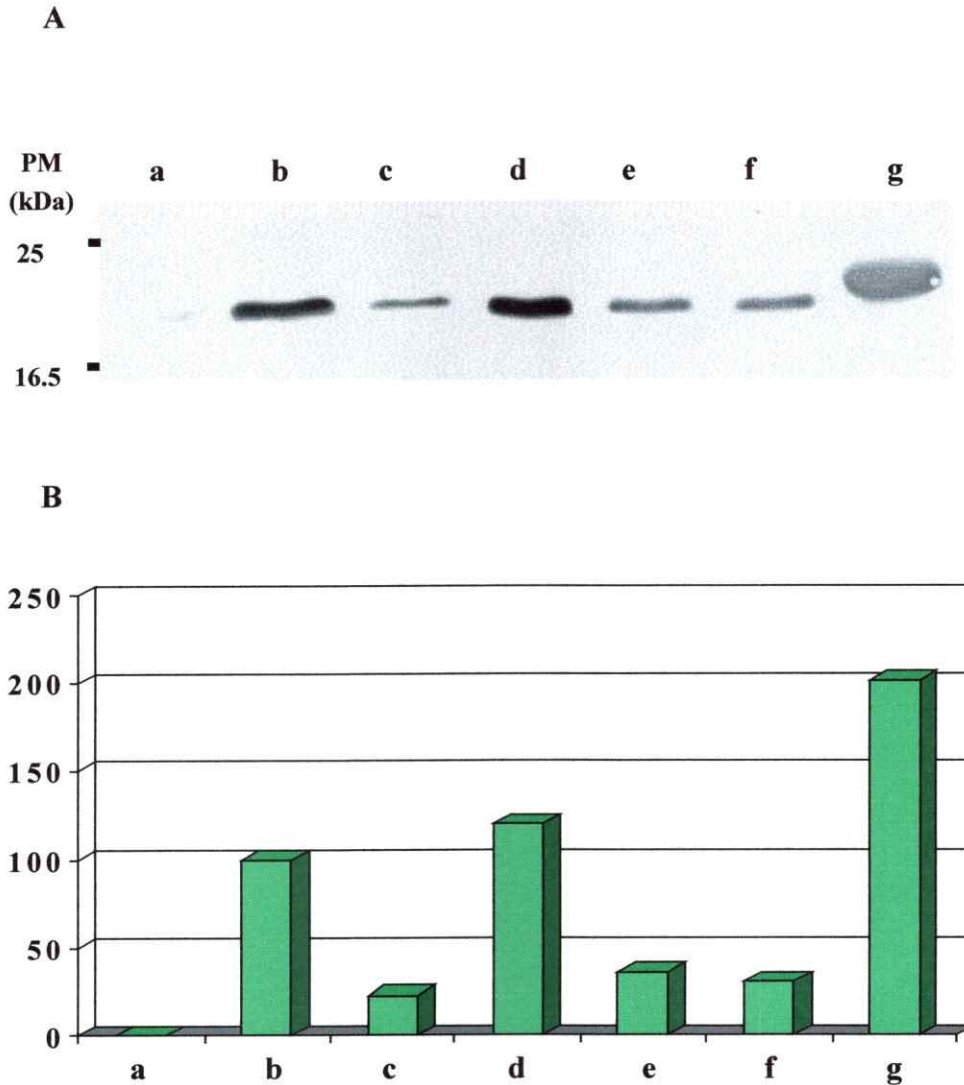


Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína P21 mediante Western blot en *A. ferrooxidans* crecido en distintas condiciones. **A**, Cantidades equivalentes de proteínas totales de células de *A. ferrooxidans* crecidas en ion ferroso (a), azufre elemental (b), tiosulfato (c), pirita (d), sulfuro de cobre (e) y sulfuro de zinc (f) y 2  $\mu\text{g}$  de P21r se separaron mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a una membrana de PVDF. Seguidamente se incubó la membrana con el antisuero anti-P21r y luego con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa. La reacción se detectó colorimétricamente y los cultivos se realizaron en las condiciones que se describen en Materiales y Métodos. **B**, Cuantificación de las bandas mostradas en A mediante el programa de procesamiento de imágenes Scion Image. Los valores son relativos a los obtenidos en azufre elemental (100%).

### 3.1.7. Localización celular de la proteína P21 en *A. ferrooxidans*

Las evidencias indican (Silver y Lundgren, 1968; Kelly y col., 1997; Visser y col., 1997) que la oxidación del tiosulfato ocurriría en el periplasma de la célula. En este sentido, si la proteína P21, participara en este proceso resultaba de interés determinar su localización celular en *A. ferrooxidans*. Para determinar la localización celular de la proteína P21, en primer lugar investigamos si el péptido señal predicho mediante el programa SignalP era procesado por la maquinaria de *E. coli*. Con esta finalidad analizamos la maduración de la proteína P21 en *E. coli* mediante geles 2D. Posteriormente analizamos con mayor profundidad la localización de la proteína P21 mediante inmunomicroscopía electrónica en células de *A. ferrooxidans* crecidas en ion ferroso y azufre elemental, y mediante Western blot en fracciones subcelulares de *A. ferrooxidans* crecido en azufre y *E. coli* sobreexpresando la proteína P21 con péptido señal.

#### 3.1.7.1. Procesamiento de la proteína P21 en *E. coli*

Para estudiar el procesamiento del péptido señal de la proteína P21 ésta se sobreexpresó en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* y se analizó la síntesis de P21 en presencia o ausencia de IPTG. Se usaron las cepas PR21H y PR21MH que están transformadas con los vectores de expresión pPR21H y pPR21MH que llevan el gen que codifica la proteína P21 con o sin péptido señal, respectivamente. En estos vectores, río abajo del promotor del fago T7 se halla el codón de inicio. Éste se encuentra sobrepuesto con el sitio *NdeI* (CATATG) del vector pET. Los genes que se clonan en este sistema con el fin de sobreexpresarlos, usualmente se amplifican mediante PCR

empleando un partidador que introduce un sitio *NdeI* al inicio de la secuencia codificante. Las cepas que portaban los plasmidios pPR21H y pPR21MH expresaron abundantemente la proteína P21 con o sin péptido señal. En la construcción del plasmidio pPR21MH fue necesario cambiar un ácido aspártico por una metionina para poder eliminar el péptido señal (Figura 12).

Para investigar si la proteína P21 con péptido señal era procesado en *E. coli*, se analizó las proteínas totales de las cepas transformadas con los plasmidios pPR21H y pPR21MH mediante electroforesis bidimensional. La proteína P21 sobreexpresada sin péptido señal se muestra en la figura 12A. La sobreexpresión del gen *p21* con péptido señal en la cepa *E. coli* BL21(DE3) se presenta en la figura 12B. Se observan dos manchas: una de 23 y otra de 21 kDa de peso molecular. La migración de estas proteínas se hallan en concordancia con los pesos moleculares y puntos isoelectricos predecidos para los polipéptidos antes y después del procesamiento y remoción del péptido señal de la proteína P23. Esto se confirmó mediante el secuenciamiento de Edman del extremo amino terminal de ambas proteínas. En conclusión estos resultados sugieren fuertemente que la maquinaria del sistema de secreción tipo II (Sec) de *E. coli* reconoce y procesa el péptido señal de la proteína P21 de *A. ferrooxidans*.



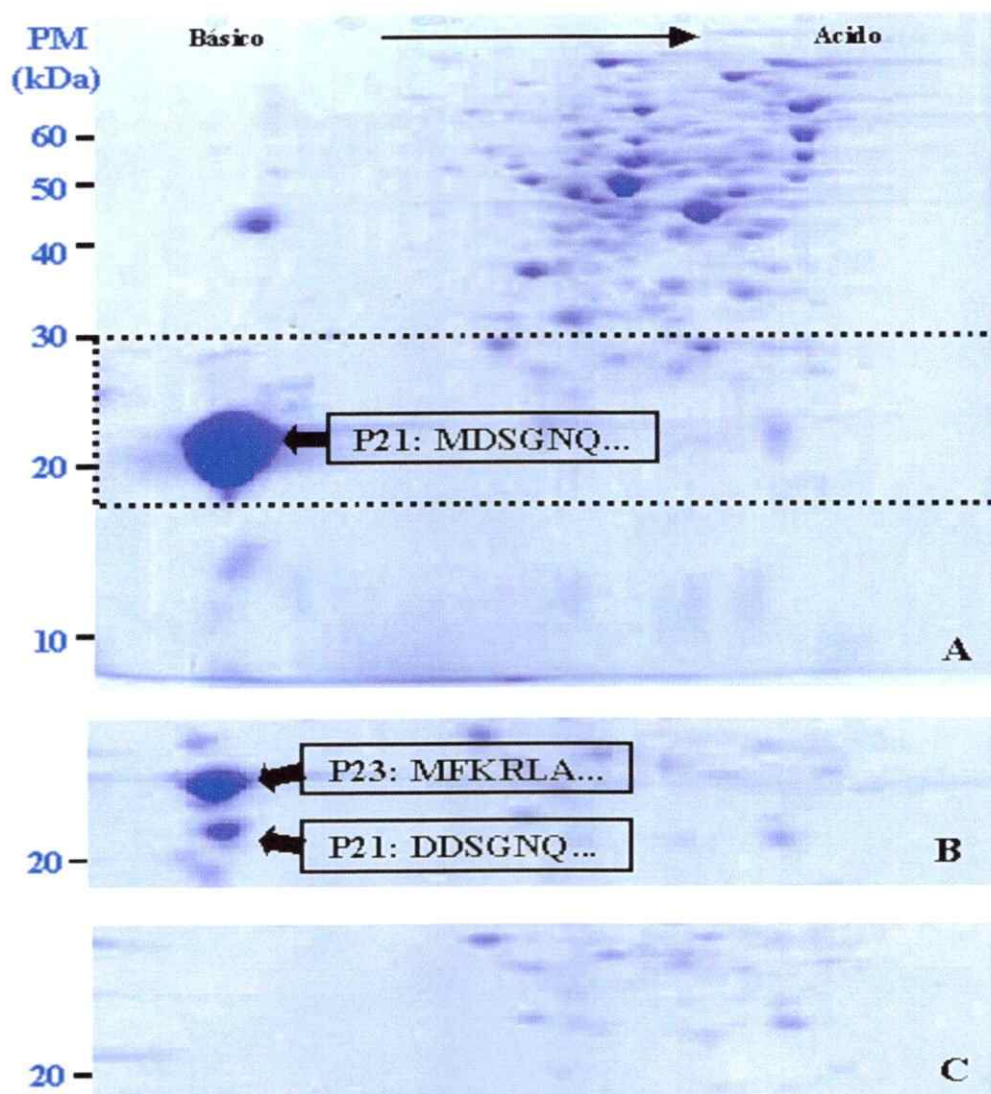


Figura 12. El péptido señal de la proteína P21 es procesado cuando el gen *p21* se expresa en *E. coli*. Para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se usaron el plasmidio pPR21MH que lleva el gen *p21* sin el péptido señal (A), el plasmidio pPR21H con el gen *p21* con péptido señal (B), o el vector sin el inserto (C). Todas las cepas se crecieron por 2 h en presencia de 1 mM de IPTG. Las proteínas totales se separaron mediante 2D-NEPHGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Los números de la izquierda indican los marcadores de peso molecular. En el gel A, el recuadro de líneas punteadas indica el área de migración de la proteína P21. Solamente esta área se indica en los geles B y C. En el gel A, la secuencia de la proteína P21 se inicia con un aminoácido diferente debido al cambio que se realizó de un ácido aspártico por una metionina durante el clonamiento para eliminar el péptido señal.

### 3.1.7.2. Localización de la proteína P21 en *A. ferrooxidans* mediante inmunocitoquímica y fraccionamiento subcelular

Para investigar la localización de la proteína P21 en células de *A. ferrooxidans* se usó anticuerpos monoespecíficos anti-P21r producidos en ratón. En una primera aproximación se analizó la localización de la P21 mediante inmunomicroscopía electrónica en células crecidas en ion ferroso y azufre. Como se observa en la figura 13A las partículas de oro coloidal (flecha) unidas al anticuerpo secundario que reconocen a los anticuerpos primarios contra la proteína P21 se hallan concentradas en la periferia de las células crecidas en azufre, sugiriendo que esta proteína se halla asociada con la envoltura celular de *A. ferrooxidans*. Por otro lado, se observó baja afinidad del anticuerpo con las células crecidas en ion ferroso (Figura 13B) con escasas partículas de oro coloidal distribuidas al azar. Estos resultados son concordantes con la expresión de la proteína P21 bajo estas dos condiciones (Figura 11; Tabla 5).

A pesar de la similitud de la proteína P21 con las proteínas P14 y P16 (50% y 61% respectivamente), los anticuerpos contra P21 no reconocieron a las proteínas P14 y P16 codificadas en otros ORFs de *A. ferrooxidans*, indicando su condición de monoespecífico (resultados no mostrados). La presencia de péptido señal y la ausencia de dominios transmembrana en P21 incrementa la posibilidad de que esta proteína se localice en el espacio periplásmico de *A. ferrooxidans*. Con la finalidad de corroborar esta posibilidad se extrajo las proteínas del periplasma de *A. ferrooxidans* crecido en distintos sustratos oxidables (ion ferroso, azufre elemental y tiosulfato, Figura 14A) mediante shock osmótico en frío (Laudenbach y col., 1991). Sin embargo cuando se

analizó mediante Western blot las proteínas de *A. ferrooxidans* extraídas mediante esta metodología, no se observó ninguna reacción con el anticuerpo anti-P21r (Figura 14B).

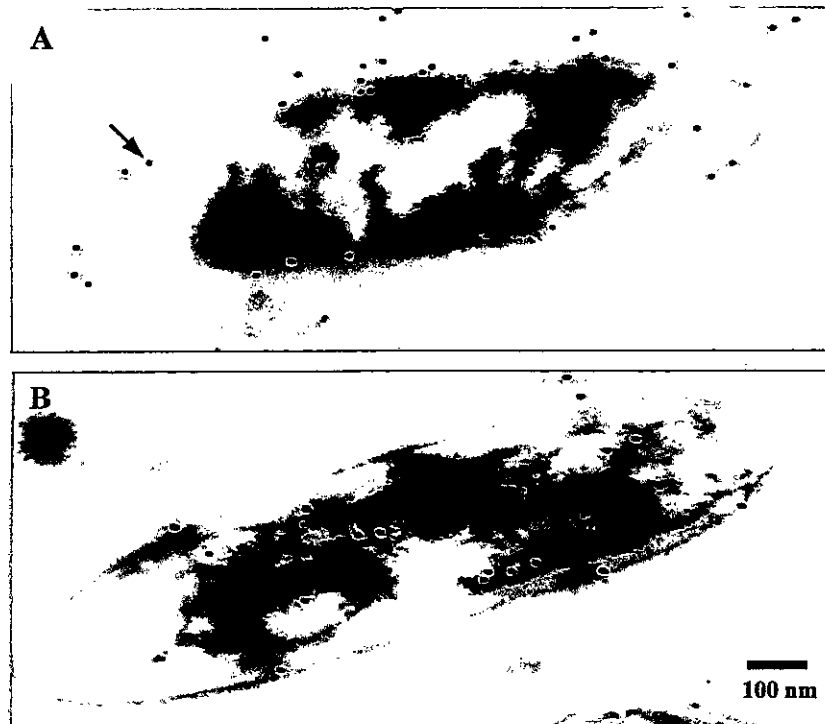


Figura 13. Localización de la proteína P21 en células de *A. ferrooxidans* crecidas en diferentes sustratos oxidables. Secciones ultrafinas de células crecidas en el medio de cultivo con azufre elemental (A) o ion ferroso (B) se sometieron a inmunocitoquímica con partículas de oro coloidal (flecha) y luego se observaron mediante microscopía electrónica.

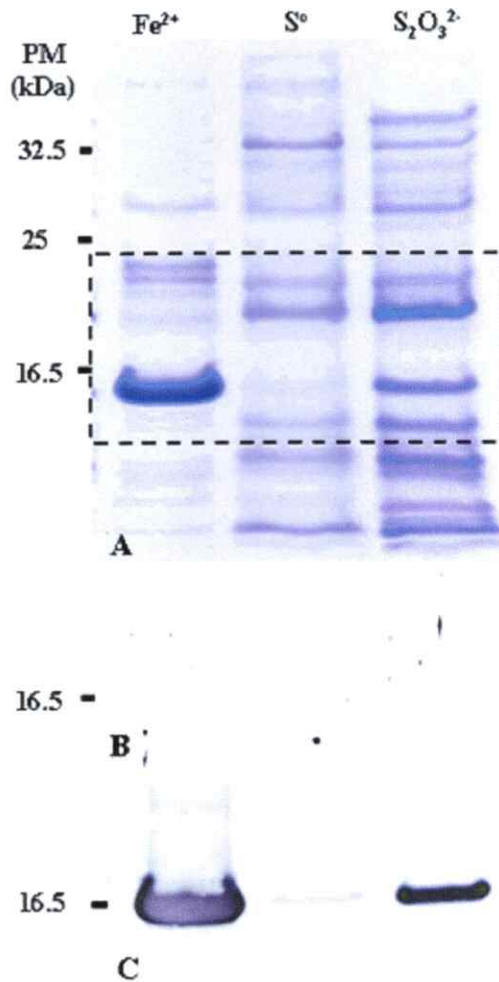


Figura 14. Proteínas del periplasma de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crecido en distintos sustratos oxidables. Las proteínas (4  $\mu\text{g}$ ) de la fracción de periplasma de células crecidas en ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) y tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) se extrajeron mediante shock osmótico en frío y se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 15% (panel A). Las proteínas separadas se tiñeron con azul de Coomassie (A) o se transfirieron a una membrana de PVDF y se enfrentaron con el anticuerpo anti-P21 (B). Como control de la preparación de las fracciones de periplasma se detectó la rusticianina con un anticuerpo anti-Rus (C). En A se muestra el área enmarcada con líneas entrecortadas la posición de migración de la proteína P21 y de la Rus. Solo esta región se presenta en los paneles B y C. Los números a la izquierda de los geles indican los estándares de pesos moleculares en kilodaltons.

Estos resultados nos indican que la proteína P21 similar a rodanasa podría estar asociada a la membrana, sola o con otras proteínas formando complejos. Por esta razón era pertinente determinar si la proteína P21 se encontraba asociada a la membrana, y si esta posibilidad era cierta, evaluar si dicha asociación ocurría con la membrana interna o externa.

Como una primera aproximación se aislaron las proteínas totales de membrana (MT) de esta bacteria crecida en azufre elemental y se analizó la presencia de la proteína P21 mediante Western blot con el anticuerpo anti-P21r. Estos experimentos iniciales mostraron que la P21 se asocia a la MT (datos no mostrados). Para determinar si dicha asociación era con la membrana externa o la interna, se realizó el fraccionamiento subcelular de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental y de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) que sobreexpresa la proteína P21r con péptido señal (PR21H). Al analizar las fracciones soluble (FS), proteínas de membrana interna (PMI) y membrana externa (PME) mediante análisis de Western blot (Figura 15), se observó que la proteína P21 se encuentra tanto en la fracción soluble (carril a) como en la fracción de membrana interna (carril c) y no es detectable en la fracción de membrana externa (carril e) de *A. ferrooxidans*. Similares resultados se obtuvieron con la cepa de *E. coli* BL21(DE3) sobreexpresando la P21 con péptido señal (carriles b, d, f). Asimismo, se aprecia claramente la presencia de la proteína P21 sin procesar y procesada en la fracción PMI de la cepa de *E. coli* que sobreexpresa la proteína P21r con péptido señal (carril d) en concordancia con los resultados mostrados en la figura 12.

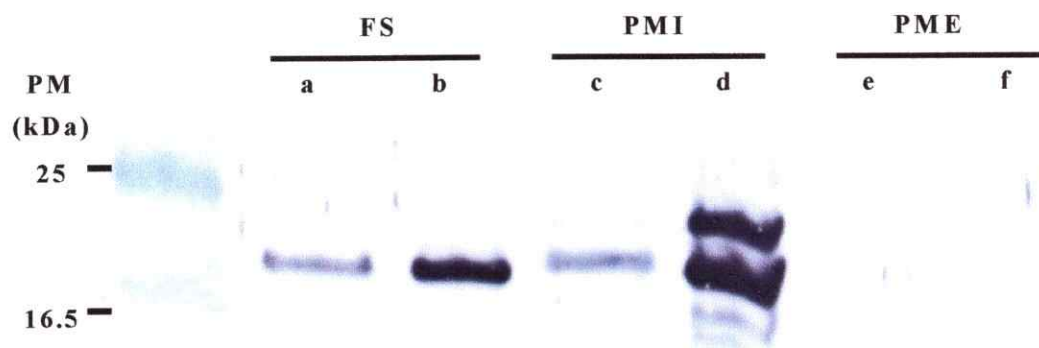


Figura 15. Localización subcelular de la proteína P21 de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental y en *E. coli* que sobreexpresa P21r con péptido señal. Cantidades equivalentes (12  $\mu$ g) de proteínas de la fracción soluble (FS), membrana interna (PMI) y membrana externa (PME) de células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre elemental (carriles a, c, e) y de *E. coli* sobreexpresando la proteína P21r con péptido señal crecido en LB-Amp en presencia de 1 mM de IPTG por 2 h (b, d, f) se separaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 15%. Seguidamente se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF y se detectó la proteína P21 mediante ensayos de Western blot. Los números a la izquierda de los geles indican los pesos moleculares estándares en kilodaltons.

### 3.1.8. Análisis funcional de la proteína P21r

La capacidad de la proteína P21 recombinante (P21r) para transferir el azufre sulfano del tiosulfato al cianuro se determinó según las condiciones descritas en Materiales y Métodos (Gardner y Rawlings, 2000; Singleton y Smith, 1988) en i) extractos crudos de *E. coli* que sobreexpresa la proteína P21r o ii) con P21r purificada mediante cromatografía de afinidad. Sin embargo, no se detectó actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa bajo estas condiciones (resultados no mostrados). Para descartar la posible interferencia de las Histidinas presentes en el carboxilo terminal de la proteína recombinante, se midió la actividad rodanasa en extractos libres

---

de células de *E. coli* que sobreexpresan la proteína P21r sin cola de His, obteniéndose también resultados negativos (resultados no mostrados), lo que nos indicaría que la adición de las His no sería la causa de la falta de actividad rodanasa esperada.

### 3.1.9. *Acidithiobacillus ferrooxidans* presenta actividad tiosulfato cianuro:azufre transferasa

Las actividades TST se midieron en las condiciones descritas por Silver y Lundgren, (1969) y Ray y col., (2000) en extractos crudos de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crecidos en ion ferroso, azufre elemental y pirita con la finalidad de evaluar si existía algunas diferencias en dichas actividades dependiente del sustrato oxidable en que creciera esta bacteria. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre los niveles encontrados en ion ferroso respecto a los otros sustratos (Figura 16). Encontraron resultados similares Gardner y Rawlings (2000) cuando compararon las actividades rodanasa en la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 33020 crecido en tetrionato versus ion ferroso.

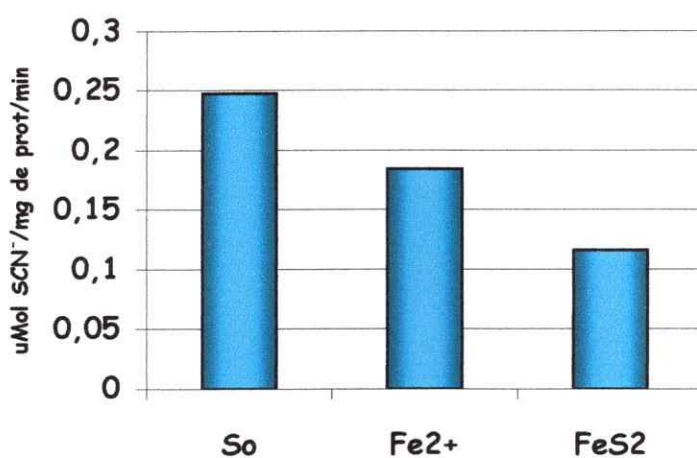


Figura 16. Actividad rodanasa en *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crecido en azufre elemental ( $S^0$ ), ion ferroso ( $Fe^{2+}$ ) y pirita ( $FeS_2$ ). Las determinaciones se realizaron según Silver y Lundgren (1969) y Ray y col., (2000) como se describe en Materiales y Métodos.



### 3.2. Identificación de otras TSTs en *A. ferrooxidans* mediante métodos bioinformáticos

Los antecedentes preliminares indican que existe actividad rodanasa en extractos crudos de células de *A. ferrooxidans*. Con la finalidad de encontrar los posibles genes de la(s) proteína(s) responsable(s) de dicha actividad se realizó la búsqueda de genes similares a rodanasas en la secuencia del genoma de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, con resultados positivos. La búsqueda en el genoma se realizó por BLASTP y PSI-BLAST (Altschul y col., 1997) utilizando como gen modelo las secuencias proteicas de los genes *glpE* de *E. coli* (Ray y col., 2001) y *p21* de *A. ferrooxidans* que presentan un sólo dominio rodanasa y los genes *rhod* de bovino (Ploegman y col., 1978) y *rhda* de *Azotobacter vinelandii* (Colnaghi y col., 1996; Pagani y col., 2000; Bordo y col., 2000) que presentan dos dominios rodanasas. Nuestros resultados fueron positivos solamente con las secuencias que contienen solo un dominio rodanasa.

Nuestra búsqueda demostró que en la secuencia del genoma inconcluso de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 no solamente existe un gen que codificaría para una proteína similar a rodanasa, sino que existen al menos dos secuencias que presentan similitud significativa con rodanasas: una de ellas codificaría para una proteína de 14 kDa de peso molecular (P14; Figura 17) y la otra para una de 16 kDa (P16; Figura 18). Ambas secuencias presentaron un dominio con similitud significativa con el dominio rodanasa.

A

```

atggggaaggatcatggggaatctcttgccgatttcatacgggcg
M G K V M G K S L A D F I R A      15

gcgcgccgtcagattcgcgaaatagactgcgatacgttggaggat
A R R Q I R E I D C D T L E D      30

tggctgccggagccgggacgatgtgctggtgggacgttcgggag
W L R S R D D V L V V D V R E      45

gccagtgcctttctggatgggcatctgccgggcccacatccatgtg
A S A F L D G H L P G A I H V      60

cctcgcggttatctggaggcactggcggaccctgattacggccat
P R G Y L E A L A D P D Y G H      75

tgccacccggagttggccgttgccgcgcatcgggtcgttgcctt
C H P E L A V A R D R V V V L      90

tactgtgacagcggaaacacgttcggcgctggcagcggtgacctg
Y C D S G T R S A L A A V T L     105

caggagatgggcttcaccgaagtctataaccttgggtggcggtatc
Q E M G F T E V Y N L G G G I     120

aatgtctgggatgccgaggacaagccggtcgtttcctga
N V W D A E D K P V V S *         132

```

B

### Putative conserved domains have been detected



Figura 17. **A**, secuencia nucleotídica completa del gen *pl4* y la secuencia aminoacídica deducida. En verde el codón de inicio y en rojo el codón de término de la traducción. Este gen se encuentra en el contig 7920 de la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. **B**, la proteína P14 presenta un dominio rodanasa.

## A

```

atggaccataaaaattcttttctttatcgagtcgcagtgcccttg
M D H K I L F F I E S Q W P L      15

ctgcttggggccgtggcgctgatcatcatgattttcaaggggcca
L L G A V A L I I M I F K G P      30

ttgaocgggagggcgggcggtatccatgaagtagaccggcgacc
L T R R A A G I H E V D P A T      45

gcggtacagttgatcaaccatgaagatgcggtaatcatcgatgtg
A V Q L I N H E D A V I I D V      60

cgggagcagaaagaatggtcgcaggggcatctgcccggtgcccg
R E Q K E W S Q G H L P G A R      75

cacattcctctgggtgacttgcccaaataatgcaggatctggag
H I P L G D L P K Y M Q D L E      90

aagcatcgtggtcatcatatcatctgtcagtggtgcgagtggtatg
K H R G H H I I C Q C A S G M      105

cgttcgtcgcgcgcccggccagcctgaaaaagccggccttgac
R S S R A A A S L K K A G F D      120

aagatttacagtctgagaggcgggatcggcgcggtggcggagtgcc
K I Y S L R G G I G A W R S A      135

ggtctgccggtagagaagtga
G L P V E K *      141

```

## B

Putative conserved domains have been detected



Figura 18. **A**, secuencia nucleotídica completa del gen *p16* y la secuencia aminoacídica deducida. En verde el codón de inicio y en rojo el codón de término de la traducción. Este gen se encuentra en el contig 7913 del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. **B**, esta proteína presenta un dominio rodanasa.

Estos dos posibles ORFs no presentan péptido señal y corresponden a posibles proteínas con puntos isoelectricos de 4.8 (P14) y 9.3 (P16). Las proteínas P14 y P16 también presentan el característico sitio activo con la cisteína conservada y los motivos estructurales CH2A y CH2B típicos del dominio rodanasa. El alineamiento múltiple de las proteínas P21, P16 y P14 nos permitió distinguir además algunas diferencias importantes entre estas proteínas (Figura 19). Interesantemente, solamente la proteína P21 presenta hacia el extremo carboxilo terminal un motivo Cys-X2-Trp-X2-Cys (subrayado en la Figura 19). Este motivo es similar al existente en la subunidad  $\beta$  de la nitrato reductasa/nitrito oxidasa asociada a membrana de *E. coli* (Berks y col., 1995) y que podría unir un centro de hierro-azufre: [3Fe-4S]. Asimismo solamente la proteína P21 presenta una inserción de 24 aminoácidos: PTYHDFFCGVHSNKHVCTGRGWQR (Figura 19, en color rojo; pI 9.0) al interior del dominio estructural CH2A que podría tener implicancias en la estabilidad a pHs ácidos o en la función de esta proteína. Interesantemente, se ha sugerido que los dos motivos estructurales CH2A y CH2B que flanquean el sitio activo de esta superfamilia de TSTs podrían jugar un rol muy importante en las interacciones proteína-proteína (Fauman y col., 1998).

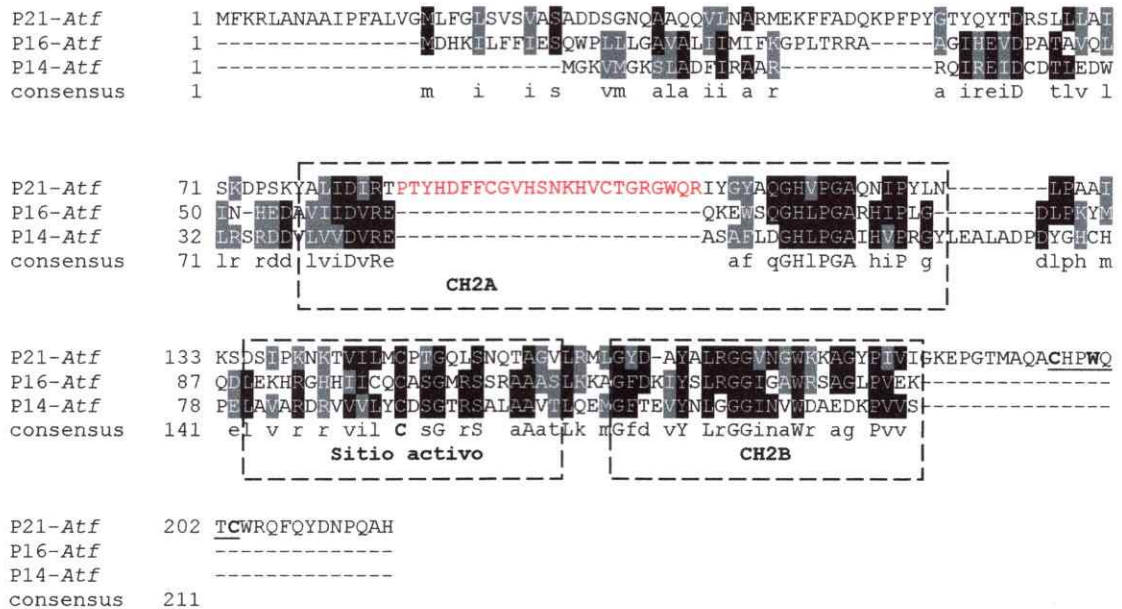


Figura 19. Alineamiento múltiple de proteínas de *At. ferrooxidans* que presentan similitud con rodanasas. P21-*Atf*, posible rodanasa periplasmática; P14-*Atf* y P16-*Atf* posibles rodanasas citoplasmáticas. El subrayado indica el motivo Cys<sub>169</sub>-X<sub>2</sub>-Tryp<sub>172</sub>-X<sub>2</sub>-Cys<sub>175</sub> que uniría un centro [3Fe-4S]. En color rojo una posible inserción de 24 aminoácidos en el motivo estructural CH2A de la proteína P21.

### 3.2.1. Clonamiento y expresión del gen *p14*

Con el fin de dilucidar las propiedades funcionales de la proteína P14 decidimos clonar y sobreexpresar el gen *p14* en *E. coli*. Como vector de clonamiento elegimos el sistema pGEM-T al cual ligamos los fragmentos amplificados por PCR del gen *p14* (Figura 20A), llevando los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. El producto de la ligación se usó para transformar la cepa de *E. coli* JM109. Luego de la selección de los transformantes por resistencia a Amp se verificó la presencia del gen *p14* mediante PCR. Se purificaron los plasmidios a partir de un clon positivo conteniendo el plasmidio con el gen *p14* (pGEM-*Tp14H*). Este se sometió a digestiones con las enzimas *NdeI* y *XhoI* para liberar el fragmento correspondiente y ligarlo al vector de expresión pET21b(+) previamente digerido con las mismas enzimas, que luego nos permitiera realizar el clonamiento en el vector de expresión. Con los productos de la ligación se transformó la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. La selección de los transformantes se realizó mediante resistencia a Amp/Cm y PCR de colonias. La cepa obtenida se denominó MA14H.

Para analizar la expresión del gen *p14* en la cepa MA14H, los cultivos se crecieron en medio LB-Amp/Cm y se indujeron con 1 mM IPTG durante 2 h. Cuando se analizaron los extractos crudos provenientes de células MA14H crecidas en ausencia o en presencia de IPTG, por electroforesis de poliacrilamida-SDS, se observó la inducción de una banda proteica de 14 kDa de peso molecular (Figura 20B, carril b).

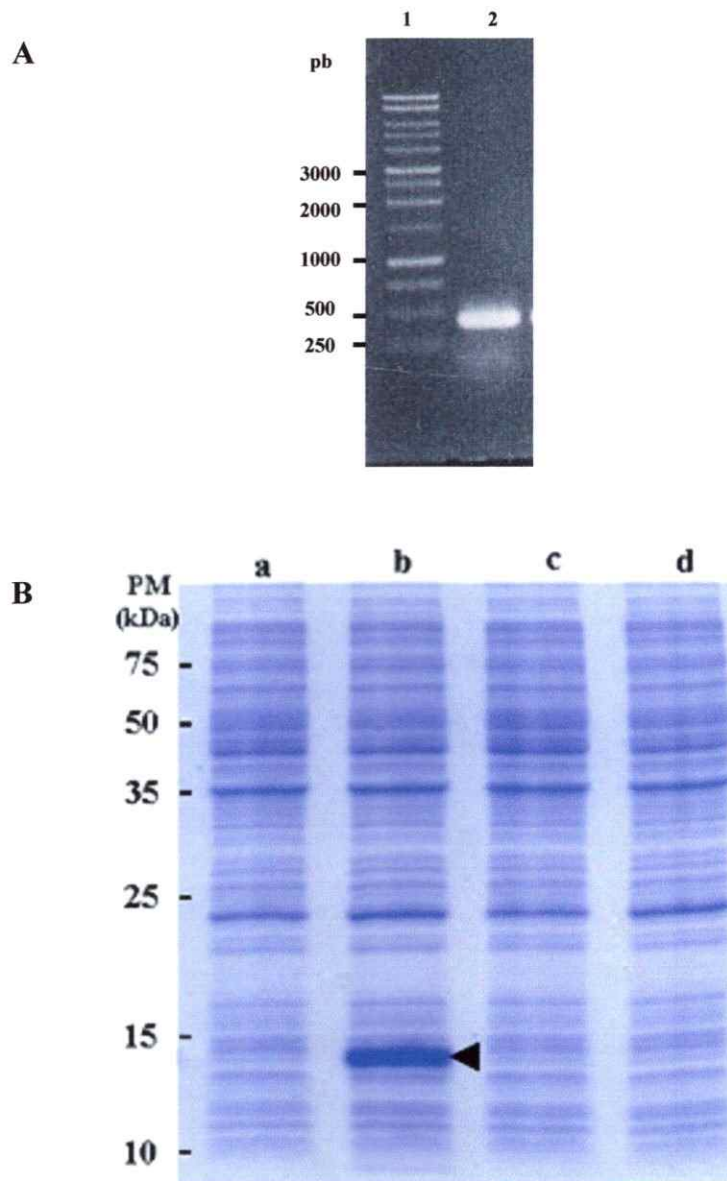


Figura 20. **A**, amplificación por PCR del gen *p14* de *A. ferrooxidans*. Los productos de la reacción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. **1**, estándar de peso molecular y los números de la izquierda indican el tamaño en pares de bases (pb). **2**, amplificado con los partidores P14NTER-*NdeI*/P14CTER-*XhoI*HT. **B**, sobreexpresión *in vivo* del gen *p14* en *E. coli*. La cepa MA14H (a, b) que lleva el vector con gen *p14* o de la cepa PR2 (c, d) que lleva el vector sin inserto se crecieron hasta que alcanzaran una  $DO_{600} = 0.6$ . Seguidamente éstas se crecieron en presencia (b, d) o en ausencia (a, c) de 1 mM IPTG por 2 h. Muestras de proteínas totales se separaron mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS al 15% y se tiñeron con azul de Coomassie. La punta de flecha indica la posición de migración de la proteína P14.

### 3.2.2. Análisis de la actividad tiosulfato cianuro:azufre transferasa de la proteína P14r

La capacidad de transferencia del azufre sulfano del tiosulfato al cianuro de la proteína P14 recombinante (P14r) se determinó según la metodología descrita por Ray y col., (2000) en extractos crudos de *E. coli* sobreexpresando P14r. Los extractos crudos de las cepas MA14H que lleva el vector con el gen *p14* y la cepa control que lleva el vector sin inserto inducidas con IPTG (aproximadamente 1  $\mu$ g de proteínas) se utilizaron para medir actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa o rodanasa (Figura 21).

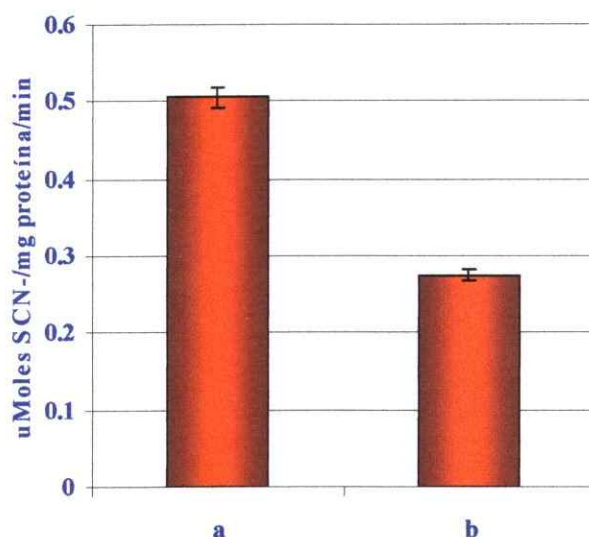


Figura 21. Análisis funcional del gen *p14* de *A. ferrooxidans*. La columna **a** corresponde a la actividad rodanasa en extractos crudos de las células MA14H (vector con el gen *p14*) y **b** al control (vector). Ambas cepas se crecieron hasta fase exponencial y se indujeron 2 h con 1 mM IPTG.



El ensayo se realizó a 30°C y la actividad detectada en la cepa MA14H fue casi el doble que de la cepa control (0.509 vs 0.274  $\mu$ moles SCN/min/mg de proteína). Por lo tanto, el gen *p14* codifica para una proteína funcional con actividad rodanasa, pero en comparación con los niveles observados con la rodanasa GlpE de *E. coli* fue menor (Ray y col., 2000). En conclusión la proteína P14 podría ser la responsable de la actividad rodanasa detectada en esta tesis en los extractos crudos de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crecido en azufre, ion ferroso y piritita, o las reportadas por Tabita y col., (1969) y Gardner y Rawlings (2000).

### **3.3. Una proteína de 33 kDa (P33) se induce cuando *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crece en tiosulfato**

En estudios previos a esta tesis, Osorio y col., (1993) compararon la expresión de proteínas cuando *A. ferrooxidans* crece en azufre en comparación a ion ferroso mediante geles 2D (Osorio y col., 1993). De igual modo, mediante geles 2D analizamos la expresión de proteínas de *A. ferrooxidans* y detectamos la inducción de la expresión de una proteína de 33 kDa (P33) de peso molecular cuando crece en tiosulfato en comparación a ion ferroso (Figura 22A y B). La secuencia aminoacídica del extremo amino terminal de esta proteína se determinó mediante microsecuenciación de Edman y fue el siguiente: ADMGWNGKAEAPRYQEQVFPPW. Los niveles de expresión de esta proteína se estimaron mediante el uso de un escaner y un programa para análisis de imágenes. Los niveles de expresión de la proteína P33 fue 5 veces mayor cuando la bacteria crece en tiosulfato que cuando lo hace en ion ferroso (Figura 22C).

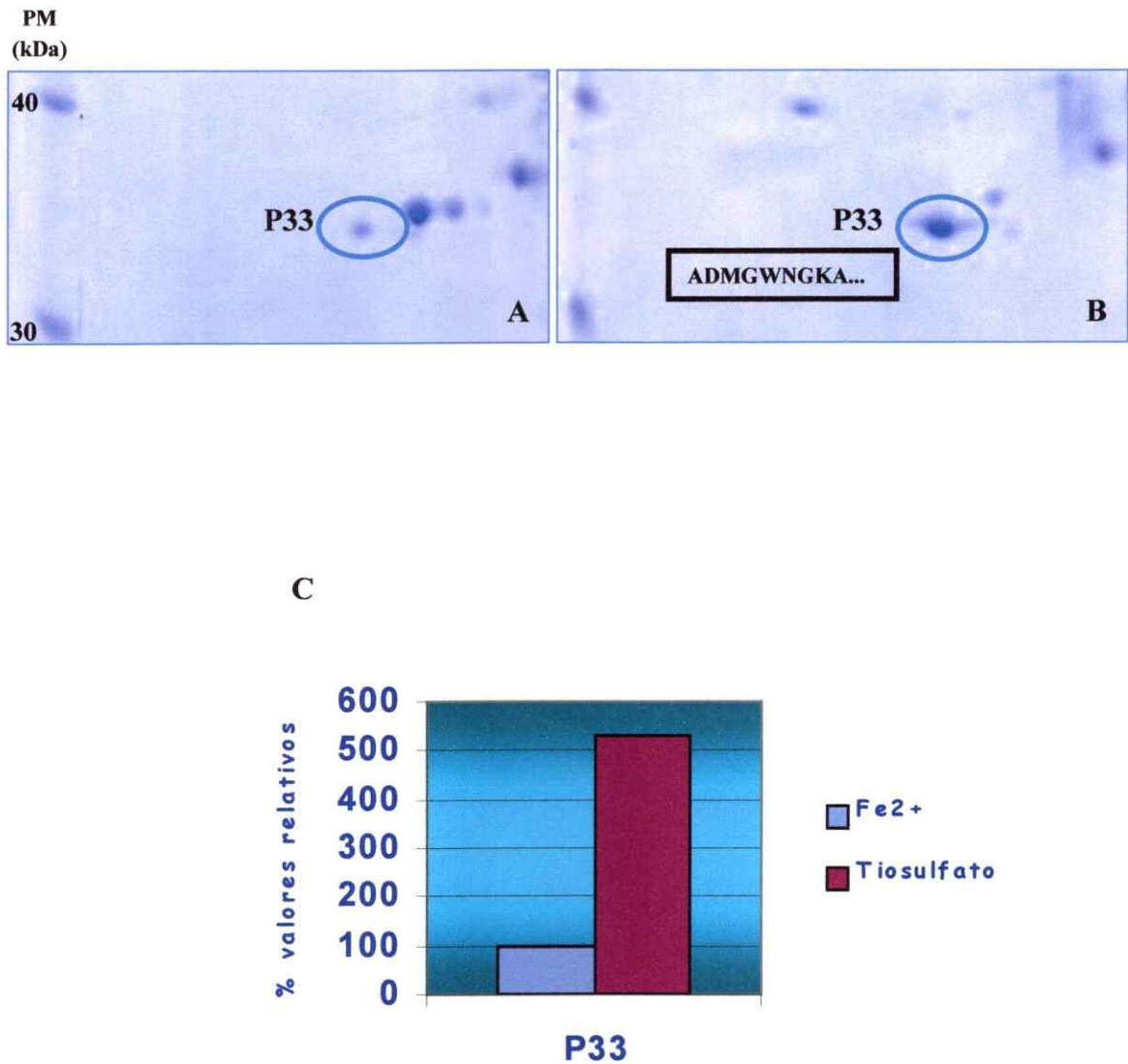


Figura 22. Inducción de la expresión de la proteína P33 cuando *A. ferrooxidans* crece en tiosulfato. Las proteínas totales de las células crecidas en ion ferroso (A) o en tiosulfato (B) se separaron mediante 2D-NEPHGE con un gradiente de pH entre 3.0 (a la derecha del gel) y 10.0 (a la izquierda del gel), y las proteínas se colorearon con azul de Coomassie. En el panel A y B sólo se muestra parte del gel 2D en que migra la proteína P33 (óvalo). En el recuadro se indican los primeros aminoácidos del extremo amino terminal. Los números a la izquierda de los gels indican los pesos moleculares estándares en kilodaltons. En C se muestra la cuantificación de la expresión de la proteína P33. Los valores son relativos al ion ferroso (100%).

### 3.3.1. Búsqueda del gen *p33* en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Con la finalidad de identificar el gen que codifica la proteína P33, se realizó un tBLASTN entre la secuencia del extremo amino terminal y el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Mediante este procedimiento ubicamos un marco abierto de lectura que codifica para una posible proteína de 336 aminoácidos (Figura 23A). La secuencia del extremo amino terminal obtenida por secuenciación de Edman de la proteína P33 extraída de los geles presentó un 100% de identidad con una secuencia (Figura 23A, en rojo) al interior de la encontrada en el genoma de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. El extremo amino terminal de la proteína P33 se inicia con una alanina en vez de metionina, lo que nos sugirió la presencia de un péptido señal. Para confirmar esta aseveración analizamos la secuencia amino terminal de esta proteína mediante el programa SignalP el cual predijo el sitio de corte en **AQA<sup>↓</sup>ADM**. El análisis de la secuencia confirmó la presencia de un péptido señal de 27 aminoácidos y el sitio de corte predicho coincidió con el obtenido mediante microsecuenciación de Edman. Este péptido señal presenta todas las características de uno que sería reconocido y procesado vía Sec (Figura 23A; Pugsley, 1993).

El análisis mediante el programa BLASTP de la secuencia aminoacídica de la proteína P33 con otras proteínas del banco de datos reveló la presencia en la proteína P33 de un dominio de unión a sulfato/tiosulfato (Figura 23B) y que presenta un 31% de identidad y 44% de similitud con una proteína de unión a sulfato (Sbp) de *Nostoc sp.*, y valores parecidos con otras proteínas de unión a sulfato/tiosulfato de otros organismos.

Por lo tanto, podemos concluir que *A. ferrooxidans* presenta una proteína de 33 kDa similar a una proteína de unión a sulfato/tiosulfato (Sbp), que se induce cuando la bacteria crece en tiosulfato en comparación a ion ferroso. La proteína P33 además presenta 26% de identidad y 41% de similitud con la proteína de unión a sulfato (Sbp) de *Salmonella typhimurium*.

## A

```

atgaaaaaaagtaaaacgctgcaagtcgctaccgtagctgcagtc
M K K S K T L Q V A T V A A V      15
 1                               2
gcatccttgcgtgttctgcggagtagccgccagcccgcgatgatg
A S L L F C G V A A Q A ↓ A D M    30
 3                               4
ggatggaacggaaaaagccgaggtccccgttatcaggagcaggtg
G W N G K A E A P R Y Q E Q V      45
                               5
ttccgccctggcaacatggtgaaaaacaatcccgcgatccatcag
F P P W Q H G E N N P A I H Q      60

ggcctggagttcacggtccccgaagtcgatgatctggcggacttc
G L E F T V P E V D D L A D F      75

cacggctccatagacaatccgcaactcacgatttttgtggggcggc
H G S I D N P Q L T I F V G G      90

aattactacttcgccatggctccgctggtaaaagcctttgaaaag
N Y Y F A M A P L V K A F E K     105

gaataccggctctccggggaagatctactacgagacggttgccg
E Y P A L R G K I Y Y E T L P     120

cccgcatcctgatcaagcagatgaagcaggggtggcaccatcacc
P G I L I K Q M K Q G G T I T     135

atcggcaacatgacgtggaccgtcaagcccgatgtctatgctgcc
I G N M T W T V K P D V Y A A     150

gggctgaagaaagtgaacgccttcatcaaggaaggtttgttcag
G L K K V N A F I K E G L L Q     165

ggtcctgcggtgccttatgtcaccaatgatctgaccatcatgatc
G P A V P Y V T N D L T I M I     180

```

```

ccgaaaggcaacccccgccacattaccggactccaggatctgggc
P K G N P A H I T G L Q D L G      195

aagcccggtgtgctgttatccatgcccaatcccgcctgggaaggc
K P G V R L S M P N P A W E G      210

gtcgccagacagatcaaaaatgtctctgaccaaggctggcggccck
V A R Q I K M S L T K A G G P      225

gcgctggagaaaaatggtgtacgacaccaaagtcaagaacggggaa
A L E K M V Y D T K V K N G E      240

acgatcctcaccataatccatcatcgtcagacgccgctcttctctg
T I L T H I H H R Q T P L F L      255

atgcagggcctcgctgacgcgggggtaacgtggaaatcggaagcg
M Q G L A D A G V T W K S E A      270

atcttcagggaacaggcggggcaccattgccaaagtcccgatc
I F Q E Q A G H P I A N V P I      285

cccgcaaggacaacaccacggcgatctatgcttccgcgtagtc
P A K D N T T A I Y A S A V V      300

aagggcgcgcgcatcccaagtgggctaaggactgggtgaatttt
K G A A H P K W A K D W V N F      315

ttgaagtcaccaccgccttgagatctttgagcactacggtttc
L K S P T A L Q I F E H Y G F      330

aagccgtacacgggcaaa5taa
K P Y T G K *      336

```

## B

## Putative conserved domains have been detected

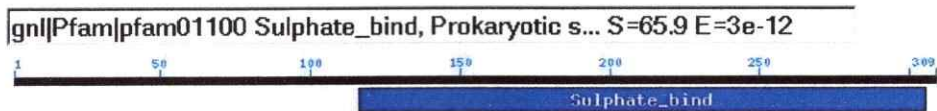


Figura 23. A, Secuencia génica de la proteína P33 de *A. ferrooxidans*. En la secuencia de la proteína P33 se indica subrayado el péptido señal de 27 aminoácidos. En este péptido señal se indican (en gris) con 1, los residuos cargados positivamente; 2, la región con residuos hidrofóbicos; 3, un residuo de Glicina y 4, la secuencia consenso de corte (Ala/Gli/Ser)-X-(Ala/Gli/Ser) de la peptidasa. La flecha indica el sitio de corte del péptido líder. La secuencia del extremo amino terminal de la proteína madura coincide con la obtenida a partir de la proteína P33 mediante microsecuenciación. Esta se indica en rojo y se marca con el número 5. En la secuencia nucleotídica se indica el posible codón de inicio (en verde) y de término (en rojo) de la traducción. B, la proteína P33 presenta un dominio de unión a sulfato.

### 3.4. Análisis del contexto genómico de la proteína P21 en el contig 7916

Cuando se analizó la región colindante al gen *p21*(ORF5) en el genoma incompleto de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, identificamos varios posibles ORFs relacionados con el metabolismo del azufre (Figura 24). Entre los ORFs que se localizan río arriba del gen *p21* tenemos el ORF4 (*tox1*) que codificaría para una proteína que presenta un 52% de similitud con la subunidad Dox-D de la oxidasa terminal de *Acidianus ambivalens* (Purschke y col., 1997) y una proteína de unión a sulfato/tiosulfato (ORF3). Estos posibles genes juntos con los ORF1, ORF2 y ORF6 aparentemente forman un grupo de genes que se transcribirían en la misma orientación. Por otro lado, en sentido divergente al “cluster” del gen *p21* se encuentran un posible gen (ORF7) que presenta elevada similitud con una tioredoxina de posible localización periplásmica, que conjuntamente con los ORF8 (*tox2*) y ORF9 se transcribirían en la misma dirección. Al comparar la secuencia aminoacídica del ORF8 con las disponibles en los bancos de datos nos mostró que ésta presenta un 51% de similitud a la subunidad Dox-D de la oxidasa terminal de *A. ambivalens*. Por lo tanto, en esta región existen dos posibles genes que codificarían para dos proteínas similares a la subunidad Dox-D de la oxidasa terminal de *A. ambivalens*. El porcentaje de similitud entre Tox1 y Tox2 fue de un 79% y sus pesos moleculares calculados son de 39.0 y 40.3 kDa. El tamaño de estas proteínas es de alrededor al doble de la correspondiente a Dox-D (20.4 kDa) de *A. ambivalens*. Cuando se realizó el alineamiento entre Tox1, Tox2, la subunidad Dox-D de *A. ambivalens* y otras relacionadas, éstas sólo alinearon con la región amino terminal de Tox1 y Tox2.

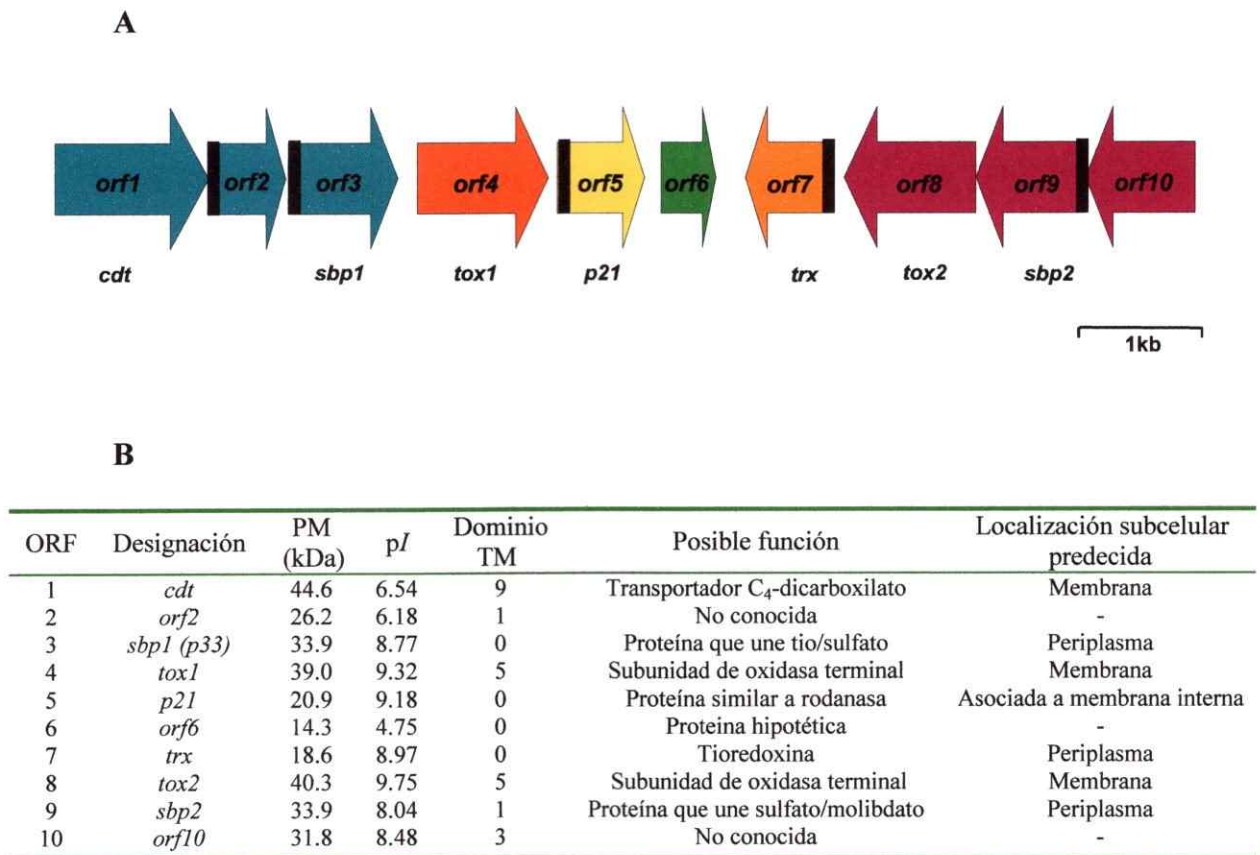


Figura 24. **A**, Representación esquemática de la región del contig 7916 que contiene al grupo de genes que rodea al gen *p21* de *A. ferrooxidans*. En negro las regiones codificantes para posibles péptidos señales que serían reconocidos por el sistema Sec. Los colores de los ORF indica posibles unidades transcripcionales. **B**, Algunas propiedades de los ORFs presentes en esta región. Los programas usados para determinar las propiedades de los productos génicos se indican en los Materiales y Métodos.

De gran interés es que la secuencia aminoacídica correspondiente al ORF3 (*sbp1*) fue la misma que la proteína P33 ya descrita en la sección 3.3 de esta tesis (Figura 23A). Además el ORF9 (*sbp2*) también codifica para una proteína de unión a sulfato/molibdato. Entre la proteína P33 (Sbp1) y la Sbp2 existe un 73% de identidad y un 84% de similitud. En conclusión, en esta región analizada y anotada del contig 7916

se localizan muy próximos los genes de las proteínas P33 y P21 que se inducen cuando *A. ferrooxidans* crece en tiosulfato y además existen otros genes relacionados con el metabolismo del azufre (Ramírez y col., 2002).

Por otro lado, los ORFs que codifican para las proteínas P14 y P16 se encuentran localizados en diferentes contigs (7920 y 7913) de la secuencia del genoma inconcluso de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, y el contexto génico es completamente distinto al observado alrededor del gen *p21* (Figura 25). Resulta de interés mencionar que los dos posibles marcos abiertos de lectura río arriba del gen *p16* codificarían para una tioredoxina y una glutaredoxina periplásmicas.

En experimentos paralelos a esta tesis, se aisló un fragmento cromosomal de 2991 pb a partir del DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 19859, el cual se clonó y secuenció. Estos resultados mostraron que la secuencia nucleotídica del gen *p21* y su péptido señal y los ORFs correspondientes a la tioredoxina y la subunidad de la oxidasa terminal presentes río abajo y río arriba del gen *p21* resultaron ser las mismas que las obtenidas a partir del genoma secuenciado disponible en internet de la cepa ATCC 23270 (resultados no mostrados). Estos datos demuestran la gran similitud existente entre estos genes en las dos cepas de *A. ferrooxidans*.



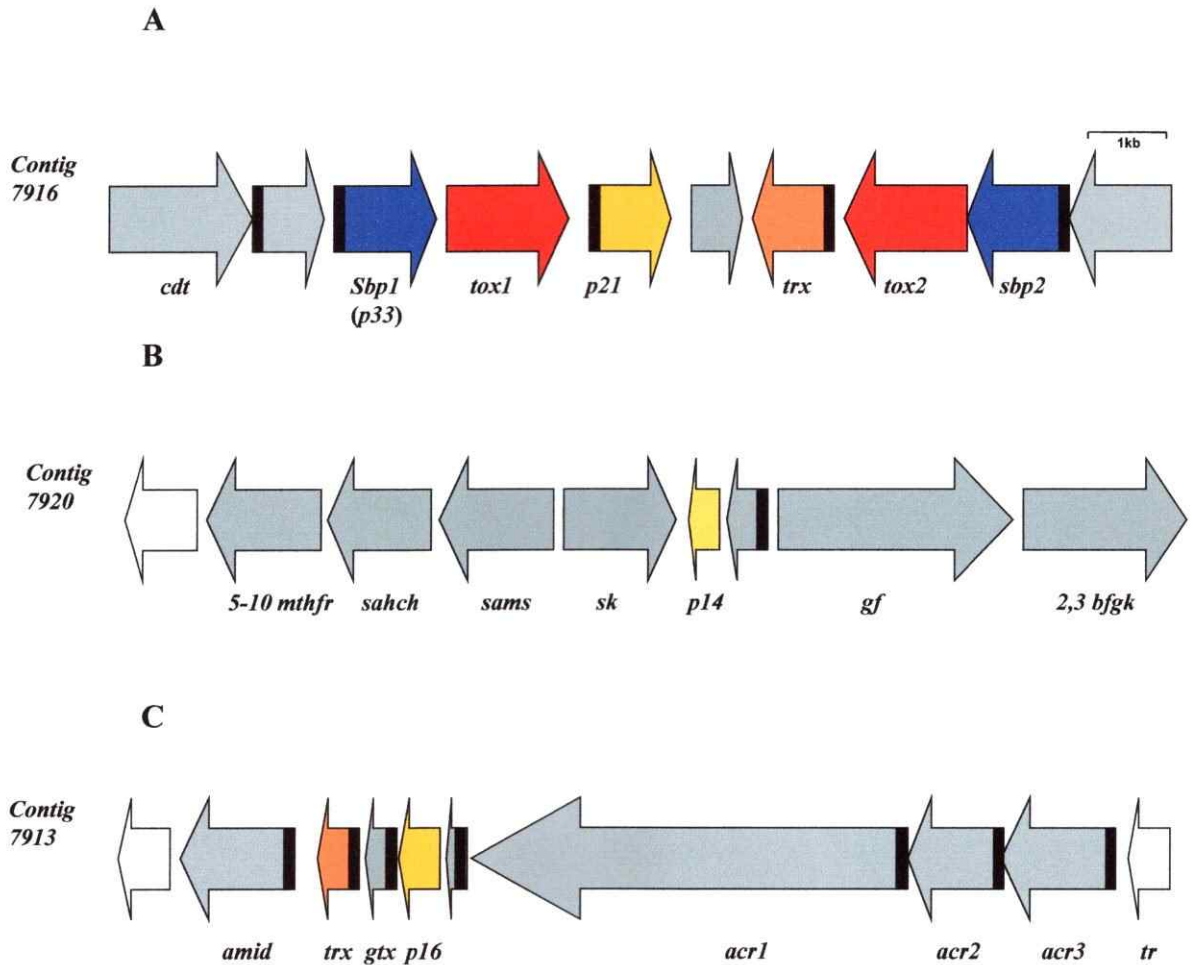


Figura 25. Representación esquemática comparativa de los contextos genómicos que rodean a los genes *p21*, *p14* y *p16* similares a rodanasas de *A. ferrooxidans* (en A, B y C en color amarillo). Los ORFs con los mismos colores representan a genes con elevada similitud entre ellas. En A, se muestra en color rojo dos ORFs (*tox1* y *tox2*) similares de una subunidad de oxidasa terminal y en azul dos ORFs (*sbp1* y *sbp2*) similares a proteínas de unión a sulfato. En B, contexto genómico de la proteína P14. En C, el contexto genómico de la proteína P16. Los programas usados para determinar las propiedades de los productos génicos se mencionan en Materiales y Métodos. Se indica en negro las regiones codificantes para posibles péptidos señales que serían reconocidos por el sistema Sec. *5,10-mthfr*, 5,10-metileno tetrahydrofolato reductasa; *sahch*, S-adenosil-L-homocisteina hidrolasa; *sams*, S-adenosilmetionina sintetasa; *sk*, azúcar quinasa; *gf*, glicógeno fosforilasa; *2,3-bfgk*, 2,3-bifosfoglicerato quinasa; *amid*, N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa; *trx*, tioredoxina; *gtx*, glutaredoxina, *acr1*, *acr2* y *acr3*, genes de resistencia a acriflavina; *tr*, regulador transcripcional.

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. La oxidación del tiosulfato en *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Considerando que el tiosulfato es uno de los intermediarios más importantes de la oxidación de los CIARs, la comprensión de sus vías de oxidación y de sus componentes genéticos y moleculares resultan de sumo interés para entender la naturaleza quimiolitotrófica y acidófila de *A. ferrooxidans*. En este sentido, el aporte de diversos estudios sobre la oxidación del tiosulfato a través del sistema Sox presente en algunos tiobacilos neutrófilos y en bacterias fototróficas ha significado una importante contribución (Friedrich, 2001; Kappler, 2001). Sin embargo, hasta la actualidad estos genes no han sido encontrados en *A. ferrooxidans*, lo que sugiere que la oxidación del tiosulfato podría ser distinta en este microorganismo. La ausencia del grupo de genes *sox* en el genoma de *Sulfolobus solfataricus* (She y col., 2001), una arquea acidófila que oxida facultativamente azufre elemental, sugiere que el mecanismo de oxidación del azufre en *S. solfataricus* podría ser similar al de *A. ferrooxidans*, ya que estos microorganismos también son acidófilos y pueden oxidar tiosulfato o sulfuros como fuente de energía.

En este contexto es posible que las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las tiosulfato azufre transferasas puedan cumplir un rol vital en el metabolismo del tiosulfato en *A. ferrooxidans*. Los resultados obtenidos en esta tesis revelan que *A. ferrooxidans* posee varios genes que codifican para azufre transferasas y entre éstas

existe una de 21 kDa de peso molecular que se induce cuando la bacteria crece en tiosulfato y otros CIAR en comparación a ion ferroso.

#### 4.2. Participación de la proteína P21 en el metabolismo del tiosulfato

La existencia en *A. ferrooxidans* ATCC 19859 de una proteína similar a una tiosulfato azufre transferasa que se exporta y cuya síntesis se regula dependiendo del sustrato oxidable en el cual crece la bacteria resulta de especial interés, considerando la propuesta de que la oxidación de la pirita generaría tiosulfato como uno de los productos intermediarios principales (Schippers y Sand, 1999). Por otro lado, se ha demostrado que *A. ferrooxidans* genera tiosulfato cuando crece en un medio con azufre elemental (Shrihari y col., 1993). Esto explicaría la inducción de la proteína P21 cuando las células crecen en azufre elemental. El tiosulfato producido a partir del azufre y el sulfito mediante reacción química entre ellos, permitiría el crecimiento de las células planctónicas no unidas al sustrato sólido. Si la proteína P21 participara en el metabolismo del tiosulfato, se esperaría un incremento de la expresión de esta proteína cuando la bacteria crece en pirita, tiosulfato o azufre, tal como lo hemos demostrado en este estudio. La ausencia de represión de la síntesis de P21 cuando *A. ferrooxidans* crece en pirita en comparación a ion ferroso fue un resultado inesperado. Sin embargo, esto se explicaría porque durante el ataque a la pirita solamente pequeñas cantidades de ion ferroso se hallarían libres. Esta hipótesis se ve reforzada por el hecho de que los niveles de P21 disminuyen drásticamente cuando hay altas concentraciones de ion ferroso en el medio (Tabla 4).

Tabita *et al.* (1969) reportaron la purificación parcial de una rodanasa de *A. ferrooxidans* la cual presenta una actividad azufre transferasa óptima en un rango de pH de 7.5 a 9.0. Recientemente, Gardner y Rawlings detectaron actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa en células enteras y extractos crudos libres de células de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, y *A. caldus* en tanto que esta actividad no se encuentra en *L. ferrooxidans*, ya que este microorganismo es capaz de oxidar solamente ion ferroso o el hierro presente en la pirita, pero no el ion sulfuro de este mineral (Schipper y Sand, 1999; Sand y col., 2001). Estos resultados apoyan la idea de la participación de una rodanasa en la oxidación de CIAR. Sin embargo, los estudios de Gardner y Rawlings (2000) demuestran que los niveles de actividad rodanasa en *A. ferrooxidans* son similares en células crecidas en ion ferroso o tetratiónato. En nuestro laboratorio también hemos medido esta actividad en extractos crudos de células de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crecido en azufre, ion ferroso o pirita, obteniéndose resultados similares (Figura 16). Los niveles obtenidos por nosotros fueron similares a los reportados por Tabita y col., (1969) (0.250  $\mu$ Moles SCN/min/mg de proteína). Por lo tanto, éstos son claramente diferentes de los esperados si los niveles sintetizados de P21 en las células crecidas en ion ferroso o azufre fueran responsables de la actividad rodanasa observada. Esto significaría que la proteína P21 no utiliza el cianuro como aceptor tiofilico o que la proteína P21 realiza su actividad azufre transferasa a pHs ácidos en los cuales el cianuro no se halla disponible. Si la proteína P21 no es la enzima responsable de la actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa detectada en los extractos crudos de *A. ferrooxidans*, entonces debe existir otra(s) proteína(s) responsable(s) de esta actividad.

Una de ellas podría ser la que fue purificada parcialmente por Tabita y col., (1969). La expresión de las rodanasas citoplasmáticas en otros organismos han mostrado ser constitutivas (Chandra y Friedrich, 1986; Friedrich, 1998). Por esta razón, existe la posibilidad de que la actividad medida por Gardner y Rawlings mayoritariamente corresponda a una rodanasa citoplasmática.

El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la proteína P21 con otras tiosulfato azufre transferasas cuyas actividades han sido demostradas *in vitro*, muestra una significativa similitud con estas (42%). La proteína P21 presenta además el dominio rodanasa típico de esta familia de proteínas que contienen los motivos estructurales altamente conservados CH2A, CH2B y un posible sitio activo con una Cys-119 (Figura 8). Asimismo, las proteínas P14 y P16 también presentan conservados los motivos del dominio rodanasa. Sin embargo, estas dos proteínas carecen de péptido señal, lo que sugiere su localización en el citoplasma. Por este motivo, las actividades tiosulfato:cianuro azufre transferasas anteriormente descritas en *A. ferrooxidans* podrían corresponder a éstas proteínas (Tabita y col., 1969). La existencia de una familia de proteínas con dominios de tipo rodanasa está bien documentada (Koonin y col., 2000). Por ello no se puede descartar la posibilidad que las proteínas P14 y P16 correspondan a otras proteínas bacterianas cuya función, estaría relacionadas por ejemplo, con la respuesta al stress.

Resulta de interés mencionar que la mayoría de las rodanasas bacterianas descritas presentan un punto isoeléctrico entre 4 y 5 y sus pesos moleculares varían entre 12,000-35,000 Daltons (Tabla 5). Sin embargo, el punto isoeléctrico de la proteína P21 madura observado en los geles 2D y el calculado (9.18) mediante el programa ProtParam nos

indicaba que estos valores no correspondían al común de la rodanasas descritas en otros organismos. Este valor es similar al de otras proteínas básicas presentes en el periplasma ácido de esta bacteria, tal como es el caso de la rusticianina.

Tabla 5. Pesos moleculares y puntos isoeléctricos de varias proteínas bacterianas que presentan uno o más dominos rodanasa

ORGANISMO	Peso Molecular (Dalt)	Punto isoelectrico (pI)
P21 de <i>A. ferrooxidans</i>	20915	9.18
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	33320	5.00
<i>Streptomyces coelicolor</i>	28986	4.81
<i>Azotobacter vinelandii</i>	29629	5.37
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	31424	4.80
<i>Synechococcus sp.</i>	35114	9.40
Sud de <i>Wollinella succinogenes</i>	16392	7.76
GlpE de <i>E. Coli</i>	12082	4.49
SseA de <i>E. Coli</i>	37003	4.99
<i>Bacillus firmus</i>	34287	4.98
<i>Deinococcus radiodurans</i>	32270	4.89
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	25084	4.70

La ausencia de actividad rodanasa *in vitro* para la proteína P21 en nuestros ensayos se puede deber a que el pH óptimo de la proteína corresponda al existente en el periplasma de *A. ferrooxidans*. Las condiciones del pH (7.5 a 9.0) del ensayo estándar para la actividad rodanasa pueden no ser las adecuadas para medir la posible actividad azufre transferasa de la proteína P21. Por otro lado, la disminución del pH a rangos de 3.0 - 4.0 no nos permitió el uso del cianuro como aceptor del azufre sulfano del tiosulfato. Alternativamente, la ausencia de actividad rodanasa de la proteína P21 se podría deber a la falta de otros polipéptidos necesarios para su actividad, como ocurre

con el complejo de oxidación del tiosulfato tipo Sox descrito en *P. versutus* (Friedrich, 1998). El hecho que la proteína P21 de *A. ferrooxidans* no se libere del periplasma mediante shock osmótico nos indica que podría estar asociada a la membrana, sola o con otras proteínas formando complejos. Esta aseveración se sustenta en los reportes de Oh y Suzuki (1977) quienes purifican un complejo multienzimático asociado a la membrana que participa en la oxidación del tiosulfato en *Starkeya novella* (ex-*Thiobacillus novellus*). Nuestros resultados demuestran que al menos el 50% de la proteína P21 se halla asociada a membrana interna (Figura 15). Precisamente Ogata y Volini (1990) demostraron que la rodanasa mitocondrial de bovino se halla asociada al menos en parte a la membrana mitocondrial formando un complejo multiproteico que sería el responsable de la generación de los centros de hierro-azufre. La proteína P21 podría interactuar con otros polipéptidos mediante los dominios estructurales CH2A y CH2B a los cuales se les asigna dicha función (Fauman y col., 1998; Ray y col., 2000).

#### **4.3. ¿La proteína P21 forma parte de un centro redox?**

Los estudios de una proteína de bajo peso molecular de *Wolinella succinogenes* demuestran que ésta presenta un dominio similar a rodanasa y que actúa como una sulfuro deshidrogenasa periplásmica (Kreis-Kleinschmidt y col., 1995). Esta proteína emplea la misma cisteína de su sitio activo tanto para la transferencia de aniones como para su actividad hidrolasa (Kreis-Kleinschmidt y col., 1995). Esto sugiere la posibilidad de que las proteínas similares a rodanasas pueden participar en una función redox, similar a la de las tioredoxinas. Esta posibilidad se ve reforzada por la presencia en el extremo carboxilo terminal de la proteína P21 de un posible motivo conteniendo

cisteínas: Cys<sub>169</sub>-X<sub>2</sub>-Trp<sub>172</sub>-X<sub>2</sub>-Cys<sub>175</sub>. Estas cisteínas podrían estar involucradas en la unión de un centro de hierro-azufre (Figura 19 y 26) presente en proteínas involucradas en el transporte de electrones (Berks y col., 1995). Por otro lado, es posible atribuirle a la proteína P21 de *A. ferrooxidans* una actividad redox de ditiol-disulfuros análoga a la descrita en *W. succinogenes*. Por otra parte, se ha descrito que las proteínas similares a rodanasas también podrían cumplir muchas otras actividades catalíticas, entre ellas: 1) en la destoxificación de compuestos tóxicos tales como el arsenito (Wysocki, 1997), el cianuro (Dooley y col., 1995) y del ion sulfuro (Picton, 2002) mediante la transferencia de aniones o reduciéndolos; 2) una actividad chaperona que permitiría una mayor eficiencia en el ensamblaje de los complejos hierro-azufre que contienen algunas proteínas (Koonin y col., 2000).

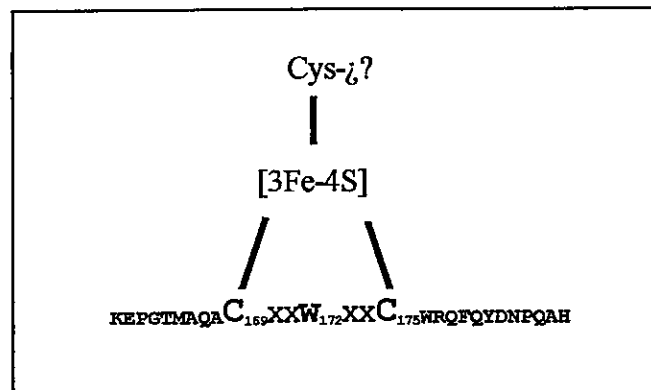


Figura 26. Posible motivo con cisteínas localizado en el extremo carboxilo terminal de la proteína P21 que podría estar involucrado en la unión de un centro de hierro-azufre (Berks y col., 1995). Este centro se encontraría unido por tres cisteínas, dos de las cuales podrían ser las Cys-169 y Cys-175, en tanto que la tercera podría ser la Cys-119 u otras presentes en la proteína P21.



#### 4.4. La proteína P21 conserva la estructura tipo rodanasa del sitio catalítico

Recientemente Spallarossa y col., (2001) al analizar comparativamente la estructura cristalina de la rodanasa GlpE de *E. coli* han descrito que el sitio de la catálisis se halla en un “loop” formado por 6 aminoácidos, entre los cuales se encuentra la cisteína 65. Este “loop” se forma entre la hoja  $\beta$ D y la  $\alpha$ -hélice D que forman parte del sitio catalítico descrito anteriormente por Fauman y col., (1998). Para dilucidar si la falta de actividad rodanasa de la proteína P21 en nuestros ensayos se debe a algún cambio importante en la estructura del sitio catalítico, realizamos el alineamiento entre la estructura de la proteína GlpE existente en el banco de datos (MMDB Id: [18023](#) PDB Id: [1GN0](#)) y la secuencia aminoacídica de la proteína P21 mediante el programa Cn3D (Hogue, 1997) (Figura 27A). Como se observa en la parte B y C de la figura 27, los aminoácidos del sitio catalítico de la proteína P21 son similares a los existentes en la proteína GlpE. Por lo tanto es posible que la proteína P21 también tenga actividad azufre transferasa y que esta no se pueda medir con los métodos estándares al pH en el cual la proteína P21 es activa y además soluble. Esta aseveración se ve reforzada por nuestra observación de que la P21 precipita *in vitro* a pHs mayores de 7 (resultados no mostrados).

La similitud estructural entre la rodanasa GlpE y la proteína P14 fue más significativa (datos no mostrados). Cabe resaltar que los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos entre ambas son cercanos (GlpE PM: 12 kDa y pI 4.49 y P14 PM: 14.5 kDa y pI 4.84). Además ninguna de ellas presenta péptido señal, carecen de la inserción de

---

24 aminoácidos PTYHDFFCGVHSNKHVCTGRGWQR y del motivo con cisteínas presente en el carboxilo terminal de la proteína P21. En conclusión estas dos secuencias podrían ser vitales para la estabilidad y actividad de la proteína P21 a pHs ácidos como en que se encuentra en el periplasma de *A. ferrooxidans*.

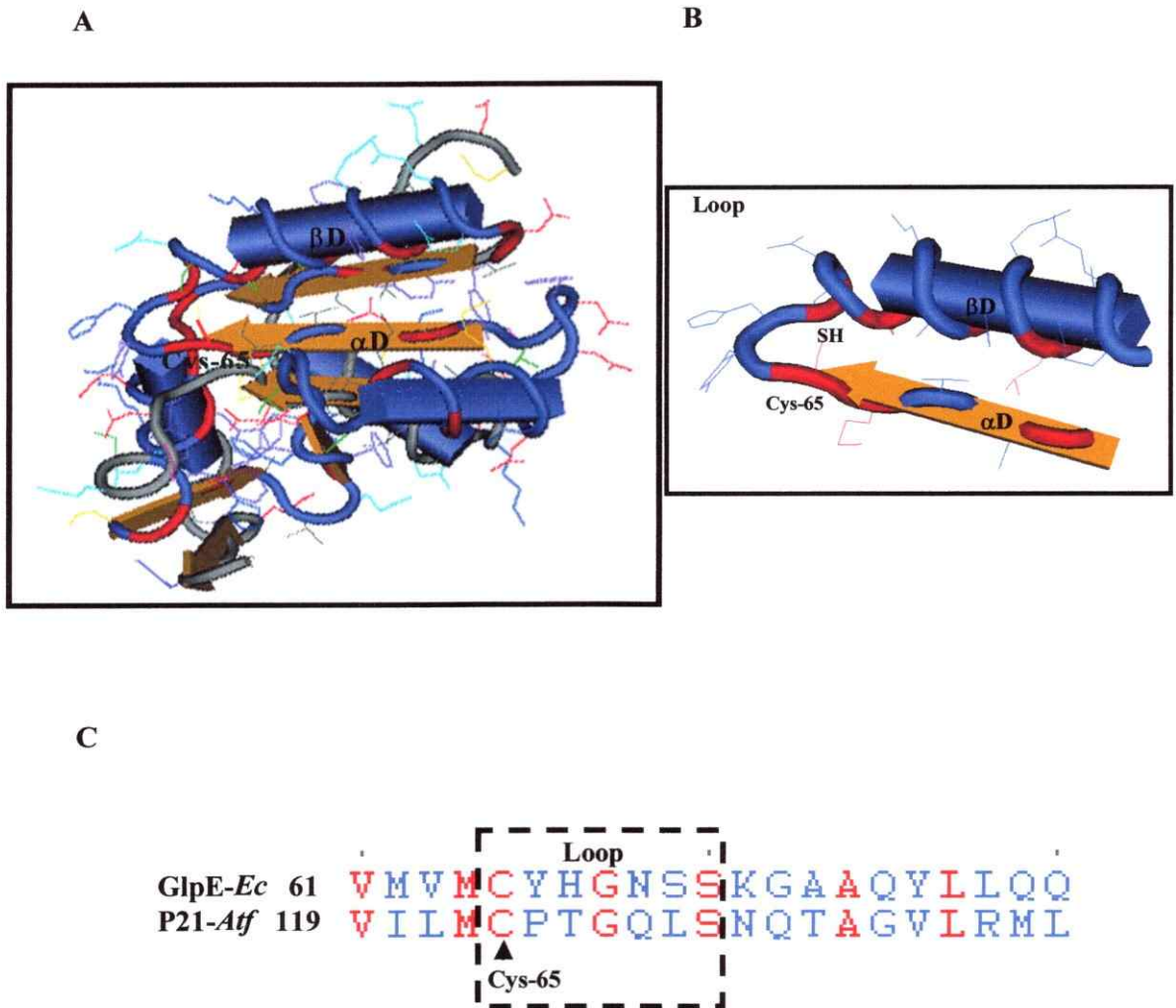


Figura 27. Análisis estructural comparativo entre la rodanasa GlpE (MMDB Id: [18023](#) PDB Id: [1GN0](#)) de *E. coli* y la secuencia aminoacídica de la proteína P21 de *A. ferrooxidans*. **A**, Alineamiento entre la estructura tridimensional de la rodanasa GlpE de *E. coli* con la secuencia aminoacídica de la proteína P21. Este alineamiento estructural se realizó con el programa Cn3D (Hogue, 1997). **B**, región del alineamiento estructural entre GlpE y P21. Se muestra el “loop” que conforma el sitio catalítico con la Cys-65 conservada. Este loop se forma entre la hoja βD y la α-hélice D (Spallarossa y col., 2001). En **C** se presenta el alineamiento de los aminoácidos que incluye la comparación estructural en **B**. En rojo lo aminoácidos idénticos y en azul los similares. El rectángulo de líneas entrecortadas corresponden a los aminoácidos que conforman el “loop” que incluye la Cys-65 conservada responsable de la catálisis.

#### 4.5. Asimilación de sulfato y/o tiosulfato por *A. ferrooxidans*

El hecho que hayamos detectado una proteína de 33 kDa similar a proteínas de unión a sulfato/tiosulfato (Sbp) cuando *A. ferrooxidans* crece en tiosulfato en comparación a ion ferroso resulta de especial interés para el entendimiento del metabolismo del tiosulfato en este microorganismo. El hecho que una proteína Sbp se induzca cinco veces en tiosulfato en relación a ion ferroso nos hace plantear la pregunta de ¿por qué la bacteria requiere assimilar mayor cantidad de azufre en forma de sulfato o tiosulfato hacia el medio intracelular cuando crece en tiosulfato?. Es posible pensar que la biosíntesis de aminoácidos azufrados como la cisteína se incremente, ya que éste aminoácido es muy importante en muchas enzimas que participan en la oxidación de compuestos azufrados, como lo es el caso de la polisulfuro azufre transferasa Sud de *Wolinella succinogenes* (Klimmek y col., 1999), la proteína SoxY de *P. pantotrophus* GB17 (Quentmeier y col., 2001), y otras relacionadas (Raina y Missiakas, 1997; Friedrich y col., 2000; Appia-Ayme y col., 2001). Las Sbp que participan en el transporte de sulfato y tiosulfato en bacterias han sido caracterizadas en *E. coli* (Sirko y col., 1995; Sekowska y col., 2000) y *Salmonella typhimurium* (Pflugrath y Quiócho, 1985; Pflugrath y Quiócho, 1988). Esta proteína periplásmica participa en el transporte activo del sulfato desde el periplasma hacia el medio intracelular. Su estructura cristalina es conocida e indica que consiste de dos dominios globulares elipsoidales similares y entre ellos se encuentra la hendidura que une el sulfato. El sulfato se une a los residuos localizados en la hendidura sólo mediante puentes de hidrógeno (Pflugrath y Quiócho, 1985). Por otro lado, se ha descrito que *E. coli* posee dos sistemas para el transporte del

tiosulfato. El gen *cysP* que codifica para una proteína de unión a tiosulfato (CysP) y el operón *cysUWA* para el sistema de transporte de sulfato/tiosulfato asociado a la membrana (Sekowska y col., 2000). El fracaso en aislar mutantes defectuosos en el transporte de sulfato y el fenotipo protótrofo de los mutantes *cysP* en *E. coli*, sugiere que ambos sistemas pueden transportar indistintamente tiosulfato o sulfato (Sirko y col., 1995). El alineamiento múltiple entre la P33 (Sbp1) de *A. ferrooxidans* y otras proteínas relacionadas muestra que de los 6 aminoácidos involucrados en la unión del sustrato sólo uno se halla conservado (datos no mostrados). Por lo tanto, en esta clase de proteínas sería más importante la conservación de la naturaleza de los residuos que unen el sustrato para mantener su especificidad en el transporte del sustrato.

Otra hipótesis que no se puede descartar en relación a las funciones de las proteína P21 y P33, es que cuando crecemos *A. ferrooxidans* en los medios de cultivo con azufre y en los CIAR, es posible que la bacteria esté en condiciones limitantes de sulfato y por esta razón se induzcan la proteína P21 y P33. Esta aseveración podría ser cierta ya que en la cianobacteria *Synechococcus sp.* PCC 7942, Laudenbach y col., (1991) detectan la inducción de una proteína de 33 kDa similar a rodanasa (RhdA) cuando la bacteria está en carencia de azufre. En el contexto genómico de esta RhdA se ubican dos ORFs que codifican para proteínas de unión a sulfato (*sbpA* y *sbpB*). Por esta razón, que una proteína similar a rodanasa participe en la asimilación del azufre en *A. ferrooxidans* no se puede descartar *a priori*. Sin embargo, esta posibilidad es poco probable ya que todos nuestros ensayos se realizaron con las células en la fase logarítmica tardía, en la que se espera que los niveles de sulfato en el medio se hayan incrementado como producto de la oxidación del azufre elemental o los CIAR. Nuestros resultados además demuestran

que los niveles de la proteína P21 disminuyen cuando se incrementa el ion ferroso (Tabla 5). Por lo tanto, existe algún mecanismo de regulación celular dependiente de la concentración del ion ferroso en el medio. En conclusión es más probable que la proteína P21 esté involucrada en la oxidación de CIAR que en la asimilación del sulfato o tiosulfato.

Debido a la ausencia de un sistema genético apropiado para el análisis genómico funcional en *A. ferrooxidans*, no ha sido posible aún asignar una función definitiva a la proteína P21 en el metabolismo del azufre. Sin embargo, considerando la proximidad al gen *p21* de genes que codificarían para un sistema de transporte de sulfato o tiosulfato (Figura 24), la especificidad y elevados niveles de expresión de P21 en azufre, tiosulfato, piritita y otros sulfuros metálicos, su posible localización asociada a la membrana interna pero hacia el lado periplásmico y su similitud con rodanasas, esta proteína P21 está probablemente involucrada en la oxidación o en la adquisición de compuestos azufrados.

En base a nuestros resultados y los antecedentes postulamos un posible modelo de trabajo para el metabolismo del tiosulfato en *A. ferrooxidans* (Figura 28). El modelo se sustenta en que hasta la fecha en este microorganismo no se han encontrado los genes *sox* y que por lo tanto las TST podrían estarían participando en la oxidación de los CIAR. El sulfato o tiosulfato sería asimilado al medio intracelular para suplir al organismo de aminoácidos azufrados necesarios para la biosíntesis de proteínas que participan en procesos oxidativos como las TST, tioredoxinas y citocromos.

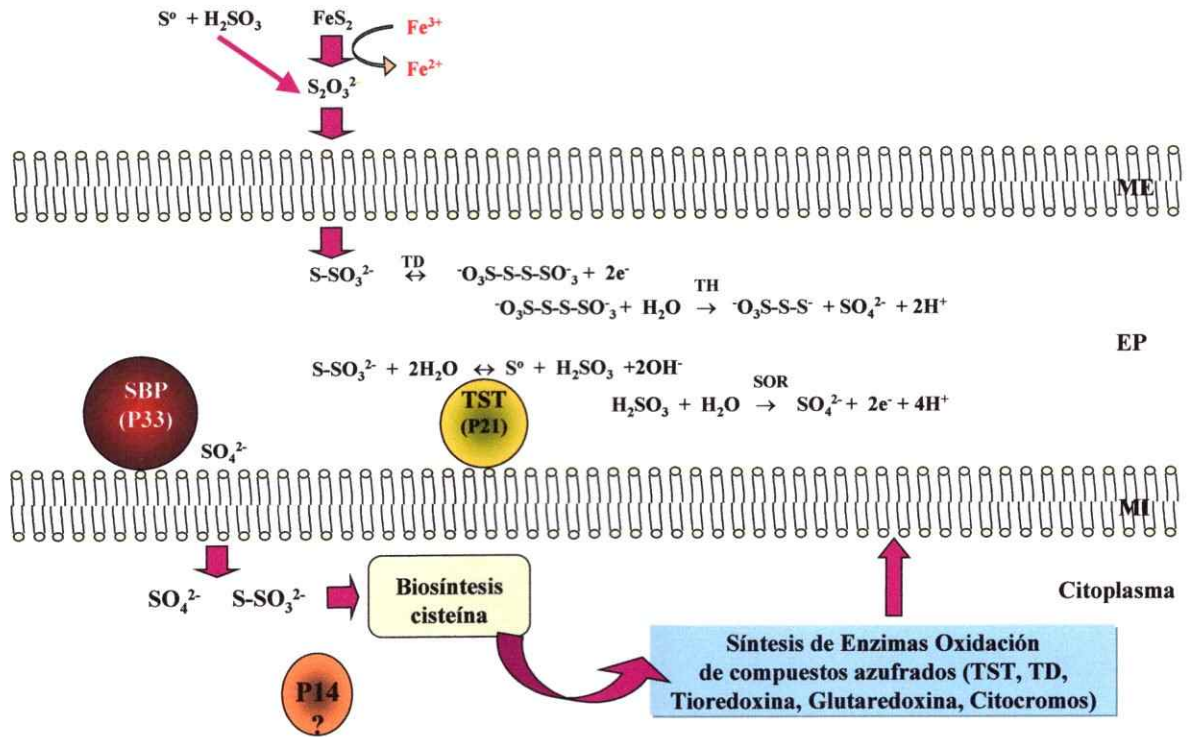


Figura 28. Modelo de trabajo para el metabolismo del tiosulfato en *A. ferrooxidans*. El tiosulfato generado a partir de la pirita o por la reacción química del azufre con el sulfito sería oxidado en el periplasma de la célula a través de dos posibles vías: por la enzima tiosulfato deshidrogenasa (TD) a tetratiónato o por la tiosulfato azufre transferasa (TST, P21). Por otro lado el sulfato o tiosulfato sería transportado al medio intracelular por la proteína SBP (P33) y sería utilizado en la biosíntesis de aminoácidos azufrados. TH, tiosulfato hidrolasa; SOR, sulfito oxido reductasa; ME, membrana externa; EP, espacio periplásmico; MI, membrana interna.

## 5. CONCLUSIONES

*A. ferrooxidans* posee una proteína de 21 kDa similar a tiosulfato:cianuro azufre transferasa o rodanasa que se exporta y posiblemente se localiza en el periplasma.

La síntesis de esta proteína se regula en forma dependiente del sustrato oxidable en que crece la bacteria. Se induce en pirita y otros compuestos inorgánicos de azufre reducido y se halla ausente en ion ferroso.

La proteína P21 presenta un péptido señal que es reconocido y procesado por el sistema de exportación de *E. coli*.

A pesar de tener las características estructurales y la cisteína responsable de la actividad catalítica, de las rodanasas, la proteína P21 no mostró actividad rodanasa en las condiciones estándares. Esto podría deberse a que es activa solamente a pHs ácidos similar al periplasma de *A. ferrooxidans* o que forma parte de un complejo multienzimático similar al sistema sox.

Existen al menos 2 genes adicionales (*p14* y *p16*) similares a rodanasas en el genoma de *A. ferrooxidans*.

*A. ferrooxidans* posee un gen que codifica para una posible proteína (P33) de unión a sulfato o tiosulfato que se induce cuando la bacteria crece en tiosulfato en comparación a ion ferroso. Este gen se encuentra junto con el gen *p21* en un contexto genómico que sugiere la participación de ambas proteínas en el metabolismo de compuestos azufrados.



## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, y D.L. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Amaro, A.M., D. Chamoro, M. Seeger, R. Arredondo, I. Peirano, y C.A. Jerez. 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**:910-915.
- Appia-Ayme, C., P.J. Little, Y. Matsumoto, A.P. Leech, y B.C. Berks. 2001. Cytochrome complex essential for photosynthetic oxidation of both thiosulfate and sulfide in *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Bacteriol.* **183**:6118-6118.
- Arredondo, R., A. García, y C.A. Jerez. 1994. The partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its attachment to solids. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2846-2851.
- Bacon, M., y W.J. Ingledew. 1989. The reductive reactions of *T. ferrooxidans* on sulphur and selenium. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:189-194
- Bonomi, F., S. Pagani, P. Cerletti, y C. Cannella. 1977. Rhodanese-mediated sulfur transfer to succinate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **72**:17-24.
- Bordo, D., D. Deriu, R. Colnaghi, A. Carpen, S. Pagani, y M. Bolognesi. 2000. The cristal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families. *J. Mol. Biol.* **298**:691-704.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

- Brüser, T., P.N.L. Lens, y H.G. Trüper.** 2000. The biological sulfur cycle. *En* P.L.N. Lens y L.H. Pol (eds) Environmental Technologies to treat sulfur pollution. IWA Publishing. London England. pp:47-85.
- Cabrejos, M.E., H.L. Zhao, M. Guacucano, S. Bueno, G. Levican, E. Garcia, E. Jedlicki, y D.S. Holmes.** 1999. IST1 insertional inactivation of the *resB* gene: implications for phenotypic switching in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**:223-229.
- Cerletti, P.** 1986. Seeking a better job for an under-employed enzyme: rhodanase. *Trends Biochem Sci.* **11**:369-372
- Chan, C.W., y I. Suzuki.** 1994. Thiosulfate oxidation by sulfur grown *Thiobacillus thiooxidans* cells, cell free extracts, and thiosulfate-oxidizing enzyme. *Can. J. Microbiol.* **40**:816-822.
- Colnaghi, R., S. Pagani, C. Kennedy, y M. Drummond.** 1996. Clonig, sequence analysis and overexpression of the rhodanese gene of *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* **236**:240-248.
- De Jong, G.A.H., W. Hazeu, P. Bos, y G. Kuenen.** 1997. Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **143**:499-504.
- De Jong, G.A.H., J.A. Tang, P. Bos, S. de Vries, y J.G.Kuenen.** 2000. Purification and characterization of a sulfite:cytochrome *c* oxidoreductase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* **8**:61-67.
- Dooley, T.P., S.K. Nair, R.E. Garcia, y B.C. Courtney.** 1995. Mouse rhodanese gene (*tst*): cDNA cloning, sequencing, and recombinant protein expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**:1101-1109.
- Dopson., M.** 2001. Potencial role of *Acidithiobacillus caldus* in bioleaching: a study of its sulfur metabolism, energetics and arsenic resistance. Tesis de PhD. Universidad de Umea, Suecia.

- Dopson, M., y E.B. Lindström.** 1999. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:36-40.
- Fauman, E.B., J.P. Cogswell, B. Lovejoy, W.J. Rocque, W. Holmes, V.G. Montana, H. Piwnica-Worms, M.J. Rink, y M.A. Saper.** 1998. Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* **93**:617-625.
- Fitz-Gibbon, S.T., H. Ladner, U.-J. Kim, K.O. Stetter, M.I. Simon, y J.H. Miller.** 2002. Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:984-989.
- Fowler, T.A., y F.K. Crundwell.** 1998. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: experiments with a controlled redox potencial indicate no direct bacterial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3570-3575.
- Friedrich, C.G.** 1998. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv. Microbial Physiology* **39**:235-289
- Friedrich, C.G., A. Quentmeier, F. Bardischewsky, D. Rother, R. Kraft, S. Kostka, y H. Prinz.** 2000. Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* **182**:4677-4687.
- Friedrich, C.G., D. Rother, F. Bardischewsky, A. Quentmeier, y J. Fischer.** 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2873-2882.
- Fry, I.J., y E. García.** 1989. Cloning and characterization of *Thiobacillus ferrooxidans* genes involved in sulfur assimilation. *En* J. Salley, R.G.L. McCready y P.L. Wichlacz (eds), *Biohydrometallurgy, proceeding of the international symposium held at Jackson Hole*, pp: 171-185. Wyoming, Canada.
- Gardner, M.N., y D.E. Rawlings.** 2000. Production of rhodanese by bacteria present in bio-oxidation plants used to recover gold from arsenopyrite concentrates. *J. Appl. Microbiol.* **89**:185-190.

- Guiliani, N., y C.A. Jerez.** 1999. Protein genes from *Thiobacillus ferrooxidans* that change their expression by growth under different energy sources. *En R. Amils y A. Ballester (eds), Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21ST century, parte B*, p: 79-87. Elsevier, The Netherlands.
- Guiliani, N., y C.A. Jerez.** 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2318-2324
- Hallberg, K.B., M. Dopson, y E.B. Lindström.** 1996. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* **178**:6-11.
- Han, C.J., y R.M. Kelly.** 1998. Biooxidation capacity of the extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* under bioenergetic challenge. *Biotechnol. Bioeng.* **58**:617-24.
- Hazeu, W., W.H. Batenburg-van Vegte, P. Bos, R.K. van der Pas, y J.G. Kuenen.** 1998. The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **150**: 574-579
- Hogue C.W.V.** 1997. Cn3D: a new generation of three-dimensional molecular structure viewer. *Trends Biochem. Sci.* **22**:314-316
- Hryniewicz, M., A. Sirko, A. Palucha, A. Böck, y D. Hulanicka.** 1990. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *J. Bacteriol.* **172**:3358-3366.
- Johnson, D.B.** 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**:307-317.
- Kappler, U., y C. Dahl.** 2001. Enzymology and molecular biology of prokaryotic sulfite oxidation. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**:1-9.

- Kappler, U., C.G. Friedrich, H.G. Trüper, y C. Dahl.** 2001. Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol.* **175**:102-111.
- Kelly, D.P.** 1985. Physiology of the thiobacilli: elucidating the sulphur oxidation pathway. *Microbiological Sciences* **2**:105-109.
- Kelly, D.P.** 1988. Oxidation of sulphur compounds. *En* J.A.Cole y S.J. Ferguson (eds) *The nitrogen and sulphur cycles*, pp: 65-98. Cambridge University Press, Great Britain.
- Kelly, D.P., y A.H. Harrison.** 1989. Genus *Thiobacillus*. *En* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. J.T.Staley, M.P.Bryant, N. Pfennig y J.G. Holt (Eds). 1 ed, vol 3, pp: 1842-1858. Baltimore: Willians and Wilkins.
- Kelly, D.P., y A.P. Wood.** 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen.nov., *Halothiobacillus* gen.nov. and *Thermithiobacillus* gen.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 511-516.
- Kelly, D. P., J.K. Shergill, W.-P. Lu, y A.P. Wood.** 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leewenhoek* **71**: 95-107.
- Klimmek, O., T. Stein, R. Pisa, J.S. Simon, y A. Kröger.** 1999. The single cysteine residue of the Sud protein is required for its function as a polysulfide-sulfur transferase in *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem.* **263**:79-84.
- Knoche K., y D. Kephart.** 1999. Cloning blunt-end *Pfu* DNA polymerase-generated PCR fragments into pGEMT®-T vector systems. *Promega Notes* **71**: 10-13.
- Kobayashi, T., S. Kishigami, M. Sone, H. Inokuchi, T. Mogi, y K. Ito.** 1997. Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bound formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11857-11862.

- Koonin, E.V., L. Aravind, y M. Y. Galperin.** 2000. A comparative-genomic view of the microbial stress-response. *En* Bacterial stress responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis (eds.). pp.417-444. ASM Press, Washington, D.C.
- Kreis-Kleinschmidt, V., F. Fahrenholz, E. Kojro, y A. Kröger.** 1995. Periplasmic sulphide dehydrogenase (Sud) from *Wolinella succinogenes*: isolation, nucleotide sequence of the *sud* gene and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **227**:137-142.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Larsson, L., G. Olsson, O. Holst, y H.T. Karlsson.** 1990. Pyrite oxidation by thermophilic archaeobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:697-701
- Laudenbach, D.E., D. Ehrhardt, L. Green, y A. Grossman.** 1991. Isolation and characterization of a sulfur-regulated gene encoding a periplasmically localized protein with sequence similarity to rhodanese. *J. Bacteriol.* **173**: 2751-2760
- Lindström, E.B., E. Gunneriusson, y O.H. Tuovinen.** 1992. Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**:133-155.
- Liu, Z., N. Guiliani, C. Appia-Ayme, F. Borne, J. Ratouchniak, y V. Bonnefoy.** 2000. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J. Bacteriol.* **182**:2269-2276.
- Lu, W.P.** 1986. A periplasmic location for the thiosulfate-oxidizing multi-enzyme system from *Thiobacillus versutus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**: 313-317.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, y J. Parker.** 2000. Brock biology of microorganisms. Ninth edition. Prentice Hall NJ.
- Matsudaira, P.T.** 1989. A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, Inc.

- Meulenberg, R., J.T. Pronk, W. Hazeu, J.P. van Dijken, J. Frank, P. Bos, y J.G. Kuenen.** 1993. Purification and partial characterization of thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2033-2039.
- Moriarty, D.J.W, y D.J.D. Nicholas.** 1970. Products of sulfide oxidation in extracts of *Thiobacillus concretivorus*. *Biochim. Biophys. Acta* **197**:143-151.
- Mukhopadhyaya, P.N., C. Deb, C. Lariri, y P. Roy.** 2000. A *soxA* gene, encoding a diheme cytochrome *c*, and a *sox* locus, esencial for sulfur oxidation in a new sulfur lithotrophic bacterium. *J. Bacteriol.* **182**: 4278-4287.
- Nagahara, N., T. Okazaki, y T. Nishino.** 1995. Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. *J. Biol. Chem.* **270**:16230-16235
- Nakamura, K., M. Nakamura, H. Yoshikawa, y Y. Amano.** 2001. Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* JCM7814. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:102-108.
- Nemati, M., J. Lowenadler, y S.T. Harrison.** 2000. Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Sulfolobus metallicus* (BC). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**:173-179.
- O'Farrell, P.H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**:4007-4021.
- O'Farrel, P.Z., H.M. Goodman, y P.H. O'Farrel.** 1977. High resolution two-dimensional electroforesis of basic as well as acidic proteins. *Cell* **12**:1133-1142.
- Ogata, K., y M. Volini.** 1990. Mitochondrial rhodanese: membrane-bound and complexed activity. *J. Biol. Chem.* **265**:8087-8093.
- Oh, J.K., y I. Suzuki.** 1977. Isolation and characterization of a membrane-associated thiosulphate-oxidizing system of *Thiobacillus novellus*. *J. Gen. Microbiol.* **99**:397-412.

- Osorio, G., P. Varela, R. Arredondo, M. Seeger, A.M. Amaro, y C.A. Jerez.** 1993. Changes in global expression of *Thiobacillus ferrooxidans* when grown on elementary sulphur. *En* A.E. Torma, M.L. Apel y C.L. Brierley (eds), Biohydrometallurgical Technologies, vol 2. pp: 565-575. TMS Press, Warrendale, Pa.
- Pagani, S., y Y.M. Galante.** 1983. Interaction of rhodanese with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **742**: 278-284.
- Pagani, S., F. Bonomi, y P. Cerletti.** 1984. Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **142**:361-366.
- Pagani, S., F. Forlani, A. Carpen, D. Bordo, y R. Colnaghi.** 2000. Mutagenic analysis of Thr-232 in rhodanese from *Azotobacter vinelandii* highlighted the differences of this prokaryotic enzyme from the known sulfurtransferases. *FEBS Letters* **472**:307-311.
- Papenbrock, J., y A. Schmidt.** 2000. Characterization of a sulfurtransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **267**:145-154.
- Pflugrath, J.W., y F.A. Quioco.** 1985. Sulphate sequestered in the sulphate-binding protein of *Salmonella typhimurium* is bound solely by hydrogen bonds. *Nature* **314**:257-260.
- Pflugrath, J.W., y F.A. Quioco.** 1988. The 2 Å resolution structure of the sulfate-binding protein involved in active transport in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* **200**:163-180.
- Picton, R., M.C. Eggo, G.A. Merrill, M.J. Langman y S. Singh.** 2002. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* **50**:201-205.
- Ploegman, J.H., G. Drent, K. H. Kalk, W.G.J. Hol, R. L. Heinrikson, P. Keim, L.Weng, y J. Russell.** 1978. The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* **273**:124-129.



- Pronk, J. T., R. Meulenberg, W. Hazeu, P. Bos, y J.G. Kuenen.** 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:293-306.
- Pronk, J.T.** 1991. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *En Physiology of the acidophilic thiobacilli* pp: 11-23. Technische Universiteit Delft, Tesis de PhD. The Netherlands.
- Purschke, W.G., C.L. Schmidt, A. Petersen, y G. Schäfer.** 1997. The terminal quinol oxidase of the hyperthermophilic archaeon *Acidianus ambivalens* exhibits a novel subunit structure and gene organization. *J. Bacteriol.* **179**:1344-1353
- Quentmeier, A., y C.G. Friedrich.** 2001. The cysteine residue of the SoxY protein as the active site of protein-bound sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *FEBS Letters* **503**:168-172.
- Raina, S., y D. Missiakas.** 1997. Making and breaking disulfide bonds. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:179-202.
- Ramírez, P., H. Toledo, N. Guiliani, y C.A. Jerez.** 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1837-1845.
- Rawlings, D.E.** 1997. Mesophilic, autotrophic bioleaching bacteria: description, physiology and role. *En Rawling (Ed), Biomining: theory, microbes and industrial processes*, pp 229-245. Springer, Germany.
- Rawlings, D.E., H. Tributsch, y G.S. 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
- Ray, W.K., G. Zeng, M.B. Potters, A.M. Mansuri y T.J. Larson.** 2000. Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* **182**:2277-2284.

- Robles, J., y M. Doers.** 1994. pGEM®-T vectors systems troubleshooting guide. Promega Notes 45, 19
- Rother, D., H.-J. Henrich, A. Quentmeier, F. Bardischewsky, y C.G. Friedrich.** 2001. Novel genes of the *sox* gene cluster, mutagenesis of the flavoprotein SoxF, and evidence for a general sulfur-oxidizing system in *Paracoccus pantotrophus* GB17. J. Bacteriol. 183:4499-4508
- Sambrook, J., y D.W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.
- Sand, W., T. Gehrke, R. Hallmann, y A. Schippers.** 1995. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism - a critical evaluation of bacterial leaching. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:961-966.
- Schippers, A., y W. Sand.** 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. Appl. Environ. Microbiol. 65:319-321.
- Schippers, A., T. Rohwerder, y W. Sand.** 1999. Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52:104-110.
- Seeger, M., y C.A. Jerez.** 1993. Phosphate-starvation induced changes in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Lett. 108:35-41.
- Seeger, M., G. Osorio, y C.A. Jerez.** 1996. Phosphorilation of GroEL, DnaK, and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. FEMS Microbiol. Lett. 138:129-134.
- Sekowska, A., H-F. Kung, y A. Danchin.** 2000. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2:145-177.
- Selkov, E., R. Overbeek, Y. Kogan, L. Chu, V. Vonstein, D. Holmes, S. Silver, R. Haselkorn, y M. Fonstein.** 2000. Functional analysis of gapped microbial genomes:

- amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3509-3514.
- She, Q., R.K. Singh, F. Confalonieri, Y. Zivanovic, G. Allard, M.J. Awayez, C.C. Chan-Weiher, I.G. Clausen, B.A. Curtis, A. De Moors, G. Erauso, C. Fletcher, P.M. Gordon, I. Heikamp-de Jong, A.C. Jeffries, C.J. Kozera, N. Medina, X. Peng, H.P. Thi-Ngoc, P. Redder, M.E. Schenk, C. Theriault, N. Tolstrup, R.L. Charlebois, W.F. Doolittle, M. Duguet, T. Gaasterland, R.A. Garrett, M.A. Ragan, C.W. Sensen, J. Van der Oost. 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:7835-7840.
- Shrihari, S.R. Bhavaraju, J.M. Modak, R. Kumar, and K.S. Gandhi. 1993. Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. Biotechnol. Bioeng. 41:612-616.
- Silver, M., y D.G. Lundgren. 1968. The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can. J. Biochem. 46: 1215-1220.
- Sirko, A., M. Hryniewicz, D. Hulanicka, y A. Böck. 1990. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. J. Bacteriol. 172:3351-3357.
- Sirko, A., M. Zatyka, E. Sadowy, y D. Hulanicka. 1995. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: evidence for a functional overlapping of sulfate- and thiosulfate binding proteins. J. Bacteriol. 177:4134-4136.
- Spallarossa, A., J.L. Donahue, T.J. Larson, M. Bolognesi, y D. Bordo. 2001. *Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. Structure 9:1117-1125.
- Studel, R. 2000. The chemical sulfur cycle. En P.L.N. Lens y L. Hulshoff Pol pp 1-31. Environmental Technologies to treat sulfur pollution. IWA Publishing. London England.
- Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, y J.W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 185:60-89

- Sugio, T., M. Noguchi, y T. Tano.** 1987. Detoxification of sulfite produced during the oxidation of elementary sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1431-1433.
- Sugio, T., T. Hirose, L.Z. Ye, y T. Tano.** 1992. Purification and some properties of sulfite:ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **174**:4189-4192.
- Suzuki, I.** 1999. Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* **45**:97-105
- Suzuki, I., y M. Silver.** 1966. The initial product and properties of the sulfur-oxidizing enzyme of thiobacilli. *Biochim. Biophys. Acta*, **122**:22-33.
- Tabita, R., M. Silver, y D.G. Lundgren.** 1969. The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **47**:1141-1145.
- Tatusov, R.L., M.Y. Galperin, D.A. Natale y E.V. Koonin.** 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**:33-36.
- Tributsch, H.** 1999. Direct versus indirect bioleaching. *En R. Amils y A. Ballester* (eds), *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21ST century*, parte A, pp: 51-60. Elsevier, The Netherlands.
- Visser, J.M., G.A.H. De Jong, L.A. Robertson, y J.G. Kuenen.** 1997. Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* **166**:372-378.
- Wodara, C., F. Bardischewsky, y C.G. Friedrich.** 1997. Cloning and characterization of sulfite dehydrogenase, two *c*-type cytochromes, and a flavoprotein of *Paracoccus denitrificans* GB17: esencial role of sulfite dehydrogenase in lithotrophic sulfur oxidation. *J Bacteriol.* **179**:5014-5023.

- Wysocki, R., P. Bobrowicz, y S. Ulaszewski.** 1997. The *Sacharomyces cerevisiae* ACR3 gene encodes a putative membrane protein involved in arsenite transport. *J. Biol. Chem.* **272**:30061-30066.

## 7. ANEXO



## An Exported Rhodanese-Like Protein Is Induced during Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in Metal Sulfides and Different Sulfur Compounds

Pablo Ramírez,<sup>1</sup> Héctor Toledo,<sup>2</sup> Nicolas Guiliani,<sup>1</sup> and Carlos A. Jerez<sup>1\*</sup>

Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology and Millennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences,<sup>1</sup> and ICBM, Faculty of Medicine,<sup>2</sup> University of Chile, Santiago, Chile

Received 7 November 2001/Accepted 9 January 2002

By proteomic analysis we found a 21-kDa protein (P21) from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 whose synthesis was greatly increased by growth of the bacteria in pyrite, thiosulfate, elemental sulfur, CuS, and ZnS and was almost completely repressed by growth in ferrous iron. After we determined the N-terminal amino acid sequence of P21, we used the available preliminary genomic sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to isolate the DNA region containing the *p21* gene. The nucleotide sequence of this DNA fragment contained a putative open reading frame (ORF) coding for a 23-kDa protein. This difference in size was due to the presence of a putative signal peptide in the ORF coding for P21. When *p21* was cloned and overexpressed in *Escherichia coli*, the signal peptide was removed, resulting in a mature protein with a molecular mass of 21 kDa and a calculated isoelectric point of 9.18. P21 exhibited 27% identity and 42% similarity to the *Deinococcus radiodurans* thiosulfate-sulfur transferase (rhodanese; EC 2.8.1.1) and similar values in relation to other rhodanases, conserving structural domains and an active site with a cysteine, both characteristic of this family of proteins. However, the purified recombinant P21 protein did not show rhodanese activity. Unlike cytoplasmic rhodanases, P21 was located in the periphery of *A. ferrooxidans* cells, as determined by immunocytochemical analysis, and was regulated depending on the oxidizable substrate. The genomic context around gene *p21* contained other ORFs corresponding to proteins such as thioredoxins and sulfate-thiosulfate binding proteins, clearly suggesting the involvement of P21 in inorganic sulfur metabolism in *A. ferrooxidans*.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a chemolithoautotrophic bacterium that obtains its energy from the oxidation of ferrous iron, elemental sulfur, or partially oxidized sulfur compounds (5, 14, 19, 24, 35, 38). The ability of these and other microorganisms present in their habitat to solubilize metal sulfides is successfully applied in biomining operations (5). Two mechanisms have been proposed for the dissolution of metal sulfides: the direct one and the indirect one (see reference 28). In the direct mechanism, the bacteria directly oxidize the mineral by biological means, without any requirement for ferric or ferrous ions (37).

Recent evidence favors the indirect mechanism of sulfide dissolution (8, 28–30) by which metal sulfides are degraded by a chemical attack of Fe(III) ions and/or protons on the crystal lattice (28, 29). The primary Fe(III) ions are supplied by the bacterial exopolymers (28), where they are complexed to glucuronic acid residues. The mechanism of degradation is determined by the mineral structure. According to the proposed model, the disulfides pyrite (FeS<sub>2</sub>), molybdenite (MoS<sub>2</sub>), and tungstenite (WS<sub>2</sub>) are degraded, generating thiosulfate as the main intermediate (30). Iron(III) ions are exclusively the oxidizing agents for the dissolution. Thiosulfate would be consequently degraded in a cyclic process to sulfate, with elemental sulfur being a side product. This explains why only Fe(II)

ion-oxidizing bacteria are capable of oxidizing these metal sulfides (29).

Metal sulfides such as sphalerite (ZnS), galena (PbS), covellite (CuS), and chalcopyrite (CuFeS<sub>2</sub>), among others, are degradable by iron(III) ion and proton attack. As a consequence, polysulfides and elemental sulfur are the main intermediates. In this case, thiosulfate is only a by-product of further degradation steps (29).

Because thiosulfate is the key compound in the oxidation of the sulfur moiety of pyrite, the mechanism has recently been defined as the thiosulfate mechanism. All reactions comprising this mechanism have been shown to occur on a purely chemical basis (30). However, sulfur compounds oxidizing enzymes such as the tetrathionate hydrolase of *A. ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, or *Thiobacillus acidophilus* may be involved (7, 9, 10, 15, 35). In addition, enzymes for thiosulfate or sulfite oxidation from *A. ferrooxidans* or *A. thiooxidans* may successfully compete with the chemical reactions with iron(III) ions as an oxidizing agent (30). A rhodanese activity has been previously described in *A. ferrooxidans* (36). This enzyme is a thiosulfate sulfur-transferase which breaks the S-S bond present in thiosulfate, generating sulfur and sulfite. Other enzymes may also participate in the thiosulfate mechanism, such as the thiosulfate-oxidizing enzyme of *A. ferrooxidans* (33).

By using two-dimensional (2-D) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), we have previously studied the global changes in gene expression of *A. ferrooxidans* when the microorganism is grown on ferrous iron or sulfur and have identified some of these proteins (12, 23). To further define some of the

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Phone: (056) 678-73-76. Fax: (056) 271-29-83. E-mail: cjerez@uchile.cl.

components involved in the oxidation of sulfur and metal sulfides, we analyzed here by means of 2-D PAGE the proteins synthesized by the bacterium when grown on Fe(II) ions, elemental sulfur, pyrite, thiosulfate, ZnS, CuS, and PbS. Our results indicate that the synthesis of an exported rhodanese-like P21 protein was greatly induced when the microorganisms were grown in FeS<sub>2</sub> and other reduced inorganic sulfur forms. Although yet to be demonstrated, this protein may be an important part of the indirect thiosulfate mechanism of dissolution of minerals and/or sulfur metabolism in *A. ferrooxidans*.

#### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** *A. ferrooxidans* ATCC 19859 was grown in ferrous iron-containing modified 9K medium as described previously (2, 39), and growth on elemental sulfur was done with sulfur prills (3). Pyrite (40% [wt/wt] Fe, found to pass a 75- $\mu$ m-pore-size sieve) was kindly given to us by P. Norris. ZnS and CuS were purchased from Aldrich and contained 28 and 125 ppm of trace iron, respectively. Growth of cells in these substrates was done in modified 9K medium (pH 2.5), replacing ferrous iron with 1% (wt/vol) of the corresponding metal sulfide. Growth of *A. ferrooxidans* in thiosulfate was done in DSMZ medium 71 containing 20 mM thiosulfate and the following components (in g liter<sup>-1</sup>): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.0; and CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.25. The pH was kept at ca. 4.6 by addition of 1 M NaOH. Washed cells (10<sup>10</sup>) resuspended in 10 ml of the corresponding medium were labeled in the presence of 0.1 mCi of [<sup>35</sup>S]methionine (specific activity, 1,087 Ci/mmol) for 40 h. *Escherichia coli* BL21(DE3) containing plasmid pGZ105 with the *gfpE* insert coding for the *E. coli* rhodanese (26) was a kind gift of T. Larson. *E. coli* strains BL21(DE3) and derivatives were grown in Luria-Bertani medium (27).

**2-D NEPHGE, SDS-PAGE, and autoradiography.** Total cell proteins were separated by 2-D nonequilibrium pH PAGE (2-D NEPHGE) (21), and this was performed as described before for *A. ferrooxidans* (31) with ampholites (pH 3 to 10) from Bio-Rad. The cell samples (4 mg [wet weight] of unlabeled cells or 500,000 cpm contained in cells labeled by growth in [<sup>35</sup>S]methionine) were resuspended in 80  $\mu$ l of sonication buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50  $\mu$ g of pancreatic RNase per ml), sonicated, and treated with DNase (final concentration, 50  $\mu$ g/ml). The mixture was then lyophilized and dissolved in lysis buffer as described previously (2). Sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE (18) consisted of 12.5% or 5 to 20% polyacrylamide gradients that were stained with Coomassie blue. Autoradiography was done as described previously (2).

**Microsequencing of proteins extracted from 2-D gels.** Proteins of interest were recovered from Coomassie blue-stained and heat-dried 2-D gels by excising the protein spots. After rehydration and concentration of the spots by SDS-PAGE, the proteins were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (20) and subjected to microsequencing by the Laboratoire de Microséquence des Protéines of the Institut Pasteur.

**Primers and PCR conditions.** The oligonucleotide primers were purchased from Genset Corporation. *Taq* and *Pwo* polymerases were from Promega and Roche, respectively, and were used according to the manufacturer's recommendations. The oligonucleotide primer sequences were deduced from the open reading frames (ORFs) found in the available almost finished DNA genomic sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://www.tigr.org>). These primers were: P21NH2-*Nde*I (5'-GGAGAATCATATGTTCAAGCGCCTAGCA-3'), P21 M-*Nde*I (5'TGGCCTCCCATATGGACAGTGGTAACCAAG-3'), and P21CTER-*Xho*IHT (5'-TCCAAACCTCGAGGATGCGCCTGCGGTTGTGTC-3').

To amplify the *p21* gene, we used a two-step HotPCR protocol: 2 min at 95°C, followed by 25 cycles at 95°C for 30 s and 72°C for 1 min, and finally 4 min at 72°C.

**DNA manipulations.** Restriction enzyme digestions and T4 DNA ligase reactions were performed according to the manufacturer's recommendations. Recombinant DNA techniques were carried out according to standard laboratory procedures (27). The dideoxy chain termination method was employed to sequence DNA by using [<sup>32</sup>P]ATP and the dsDNA Cycle Sequencing System from Gibco-BRL. The DNA sequences were compiled and analyzed with the University of Wisconsin GCG Package (version 9.1; Genetics Computer Group, Madison, Wis.).

***p21* gene cloning and expression.** We used pGEM-T (Promega) and the pET System (Novagen). The *p21* gene with signal peptide was obtained by PCR with P21NH2-*Nde*I and P21CTER-*Xho*IHT primers corresponding to the N-terminal

and C-terminal end sequences of P21 and containing *Nde*I and *Xho*I restriction sites, respectively. The *p21* gene without leader peptide was cloned with the P21 M-*Nde*I and P21 *Xho*IHT primers. We used *Pwo* polymerase (Roche) and a low number of amplification cycles to decrease the number of sequence errors. The DNA fragments separated by electrophoresis in 1% agarose gels were recovered, purified with Wizard PCR Prep (Promega), and ligated to pGEM-T vector (Promega). The ligation products were used to transform *E. coli* JM109. The positive clones were analyzed by using colony PCR. Pure plasmids with inserts were obtained by using the Wizard Plus Minipreps DNA purification system (Promega). The DNA fragments were ligated to pET21b(+) vector (Novagen), both previously digested with *Nde*I and *Xho*I. The ligation products (pPR21H and pPR21MH vectors with or without the coding sequence for the leader peptide, respectively) were used to transform *E. coli* BL21(DE3). The recombinant clones were selected on Luria-Bertani solid medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/ml). The induction-expression analysis was done in the presence or absence of 1 mM IPTG, added when the cultures reached an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.6. Expression of the recombinant P21 (rP21) with or without signal peptide was analyzed by SDS-PAGE of total cell extracts.

**Purification of rP21.** rP21 was purified under denaturing conditions as follows. A 300-ml culture of BL21(DE3) transformed with pPR21H or pPR21MH vectors was grown to an OD<sub>600</sub> of 0.6 and induced with 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside). Cells were harvested by centrifugation, and the pellet was resuspended in 30 ml of 1 $\times$  binding buffer containing 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, and 20 mM Tris-HCl (pH 7.9). Cell disruption was performed by sonication (six times during 30 s). After centrifugation (at 20,000  $\times$  g for 15 min), the pellet was resuspended in 5 ml of 1 $\times$  binding buffer containing 6 M urea and incubated for 1 h in an ice bath. The sample was centrifuged (39,000  $\times$  g for 20 min), and the supernatant, previously filtered through a 0.45- $\mu$ m-pore-size Millipore filter, was applied to a column containing 1 ml of His-nitrilotriacetic acid resin. rP21 was eluted with 10 ml of Elute buffer containing 300 mM imidazole, 0.25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), and 6 M urea. The collected fractions (0.5 ml) were analyzed by SDS-PAGE. Finally, rP21 containing fractions, which were essentially free from other proteins, were pooled and renatured by removal of the urea in five sequential dialysis steps with 67 mM phosphate (pH 5) buffer containing 6, 2, 1, and 0.5 M urea and no urea. All dialyses were performed in the presence of 50 mM thiosulfate and 200 mM  $\beta$ -mercaptoethanol.

**Preparation of antibodies against rP21.** The antiserum against rP21 was made by immunizing intraperitoneally a BALB/c mouse with ca. 50  $\mu$ g of rP21 (this corresponded to one 2-D gel spot from the respective gel in each immunization). To prepare the samples for immunization, the gel piece containing the rP21 spot was loaded in one well of a slab gel prepared with a melttable synthetic electrophoresis matrix (ProtoPrep; National Diagnostics) and was allowed to rehydrate for 1 h in 1 $\times$  sample buffer diluted with 50 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-0.1% SDS (pH 8). After electrophoresis the gel was stained with Coomassie blue, and the concentrated rP21 band was excised and washed four times with distilled water. The slice containing rP21 was weighed, 1 volume (assuming 1 mg = 1  $\mu$ l) of ProtoPrep Dissolution Reagent was added, and the mixture was incubated for 1 h at 80°C in a water bath. The melted viscous ProtoPrep mixture was then directly mixed with 1 volume of Freund complete adjuvant (Gibco-BRL) and vortexed for 1 h to produce an injectable emulsion with a final volume of 800  $\mu$ l. Immunization was done four times at 1-week intervals. One week after the last injection, the blood was collected from the mouse, and the serum was obtained by centrifugation.

**Western immunoblotting.** The proteins synthesized by *A. ferrooxidans* when grown in different oxidizable substrates were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to a PVDF membrane as already described (13). For the antigen-antibody reaction, the membrane containing the transferred proteins was treated with the antiserum against rP21 as the primary antibody (1:2,500 dilution) and monoclonal anti-mouse antibodies conjugated with peroxidase (Amersham) as the secondary antibodies (1:5,000 dilution). The specificity of the mouse anti-rP21 serum was tested with both the preimmune and the immune sera (1:4,000 dilution) against pure rP21 and total proteins from *A. ferrooxidans* and *E. coli* BL21(DE3). No cross-reaction was observed with *E. coli* proteins (results not shown), while only one reacting band was detected in *A. ferrooxidans* samples and no band was observed with the preimmune serum, indicating that the serum was monospecific. A colorimetric method was used to develop Western blots as recommended by Promega. The relative intensities of the P21 protein bands in Western blots were determined by using a scanner and an image analysis program ([www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)).

**Immunocytochemistry with thin sections and cell fractionation.** Cells of *A. ferrooxidans* grown in sulfur and ferrous iron were harvested by centrifugation (10 min, 6,000  $\times$  g, 4°C) and washed in water (pH 1.9), and the pellets were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) for 2 h at 4°C.



After being washed, the cells were dehydrated with an ethanol series and then infiltrated with 1:1 Unicryl-ethanol and Unicryl pure (Energy Beam Sciences, Inc.) for 4 h and overnight, respectively. The samples were then placed in gelatin capsules and polymerized for 72 h at 45°C. Thin sections were cut with a Sorval MT-2B Ultramicrotome and collected onto nickel grids.

Ultrathin sections were blocked overnight with 1% bovine serum albumin (BSA) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6) containing 137 mM NaCl and 0.05% Tween 20 (TBST). Sections were washed five times with TBST and incubated with anti-rP21 antibody at a dilution of 1:50 in TBST-1% BSA for 2 h at room temperature. Sections were washed five times in a similar manner (10 min each time) and then incubated with goat anti-mouse immunoglobulin G conjugated with 10-nm gold particles (Sigma) at a dilution of 1:10 for 1 h in TBST-1% BSA to allow the detection of primary antibody binding. Thereafter, the sections were washed five times with TBST and three times with water. Finally, the sections were stained with uranyl acetate and viewed at 80 kV in a transmission electron microscope (Phillips Tecnai 12).

To locate P21, we fractionated the *A. ferrooxidans* cells into outer-membrane, soluble, and inner-membrane fractions. The outer membrane was obtained as described earlier (13). After this fractionation to obtain the outer membrane, we defined the soluble fraction as the supernatant obtained after the first centrifugation at 100,000 × g for 2 h to pellet the total membrane fraction. The inner-membrane fraction was considered to be the last supernatant obtained after treatment of the total membrane fraction in the presence of 2% sodium laurylsarcosinate and pelleting of the final outer-membrane preparation (13).

**Determination of rhodanese activity.** Rhodanese (thiosulfate-cyanide sulfurtransferase; EC 2.8.1.1) activity was assayed with crude enzyme extracts or with the purified recombinant protein rP21. As a comparison, we used the recombinant rhodanese GlpE from *E. coli* (26). The assay was done at pH 7.5 to 8.5 essentially as described by Singleton and Smith (34) and Gardner and Rawlings (11).

**Sequence analysis.** Identity-similarity searching in databases was done by using the BLASTP program (1) from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and from the unfinished *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome site (<http://www.tigr.org>). Multiple alignments were performed with CLUSTALW 1.8 (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) and edited by using BOXSHADE 3.21 ([http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/software/BOX\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch:8080/software/BOX_form.html)). Molecular masses and isoelectric points of ORFs were obtained by using ProtParam (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>). The possible presence of transmembrane domains in the analyzed ORFs was analyzed by using TMPRED (<http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED>). The putative functions and predicted subcellular locations of the proteins coded by the different ORFs analyzed were obtained by using BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of the *p21* gene is available in the EMBL database under accession no. AJ31223.

## RESULTS

**Pattern of global protein synthesis of *A. ferrooxidans* grown with different oxidizable substrates.** To characterize some of the proteins synthesized by *A. ferrooxidans* when grown in different oxidizable substrates, we employed 2-D NEPHGE analysis of the total cell proteins stained with Coomassie blue as shown in Fig. 1. We have previously observed that the general pattern of protein synthesis for ferrous-iron-grown *A. ferrooxidans* showed several differences compared with that observed for the sulfur-grown bacterium (23). The differences involved both the induction (or derepression) and the repression of the synthesis of numerous polypeptides. Based on this previous analysis, we have chosen to study in greater detail protein P21, indicated by the window in the gels of Fig. 1. It is clear that P21 was entirely absent when *A. ferrooxidans* was grown in ferrous iron (gel A) and was greatly induced when the cells grew in pyrite (gel B). Rusticyanin (Rus), a protein known to be induced by growth of the microorganism in ferrous iron, was present in both conditions, although in larger amounts in cells grown in ferrous iron.

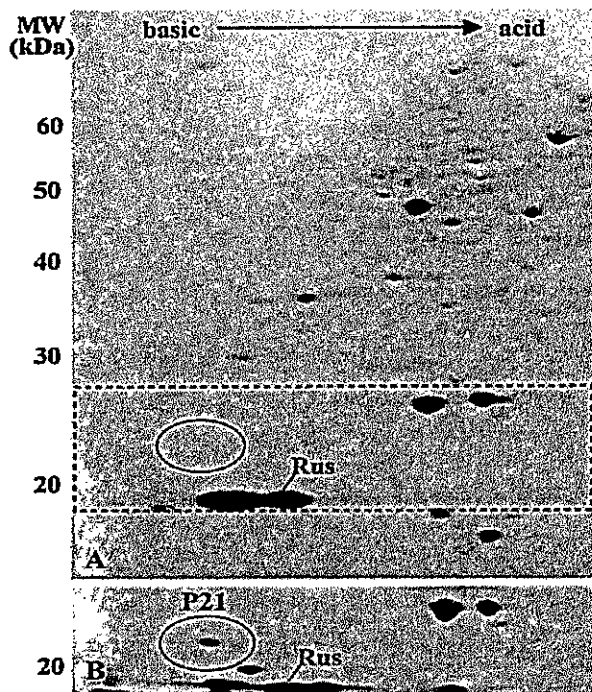
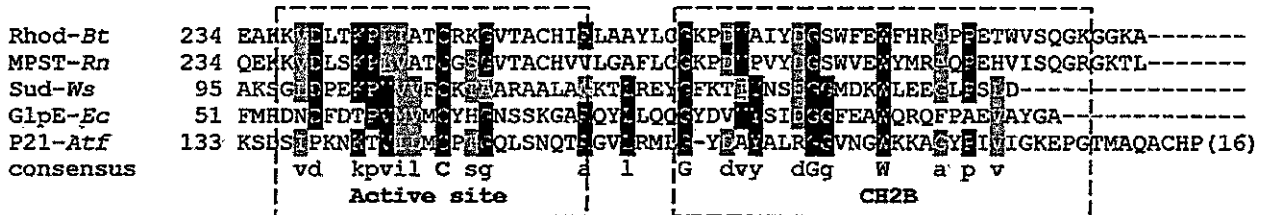
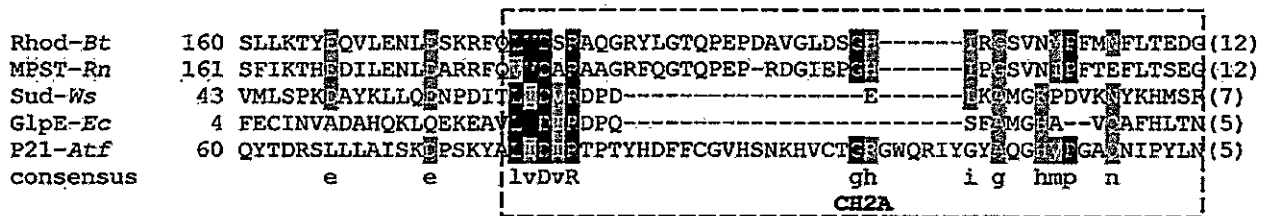


FIG. 1. Induction of the expression of protein P21 by growth of *A. ferrooxidans* on pyrite. Total proteins from cells grown in ferrous iron (A) or in pyrite (B) were separated by nonequilibrium pH 2-D PAGE with a pH gradient between 3.0 (right side of the gel) and 10.0 (left side of the gel), and the proteins were stained with Coomassie blue. In panel A, the window indicated by dotted lines contains an oval showing the region where P21 migrates. In panel B, only the portion of the gel where P21 migrates is shown. Numbers to the left of the gels indicate the molecular mass standards in kilodaltons. Rus, the migrating position of Rusticyanin.

**The isolated *p21* gene shows similarity to rhodanases.** Protein P21 was isolated from 2-D gels and subjected to Edman microsequencing, yielding the following amino acid sequence: DDSGNQAAQQVNLNARMEKFFADQKPYG. Using this sequence, we performed a tBLASTN analysis of the available preliminary genome sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://www.tigr.org>) and identified one ORF of 645 bp. On the basis of this information, we cloned and sequenced the *p21* gene from *A. ferrooxidans* ATCC 19859. The result of this sequence can be found in the database under accession no. AJ31223.

The BLASTP analysis of the amino acid sequence of P21 indicated that this protein had 27% identity and 42% similarity to the sulfurtransferase (rhodanese) from *Deinococcus radiodurans* and comparable values with those of many other rhodanases. The active site of the rhodanese and two characteristically conserved motifs (CH2A and CH2B) were also present in all of the proteins compared (Fig. 2A). Interestingly, most described bacterial rhodanases have an isoelectric point of 4 to 5 and various molecular masses (12,000 to 35,000 kDa). The *A. ferrooxidans* P21 rhodanese-like protein has an isoelectric point of 9.18 (without the signal peptide), which is similar to other very basic proteins present in the acidic periplasm of this bacterium, such as Rus. The *p21* gene encoded a polypeptide of 215 amino acids with a putative signal peptide (Fig. 2B), sug-

## A



## B

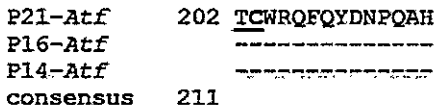
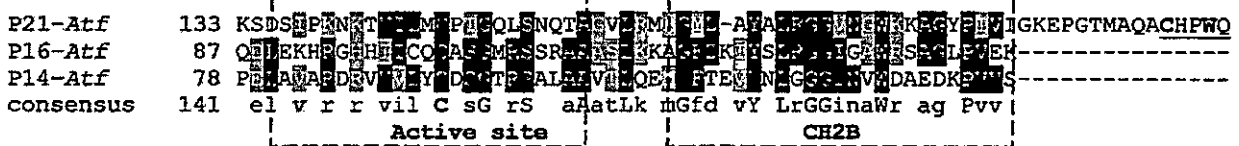
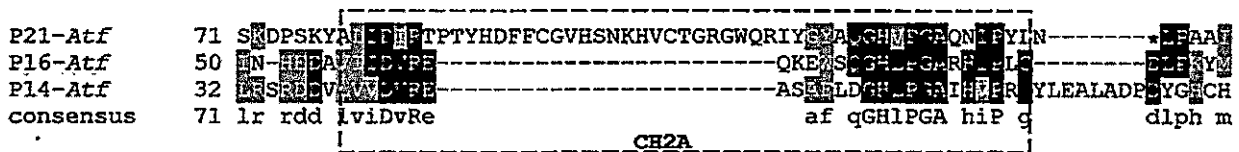
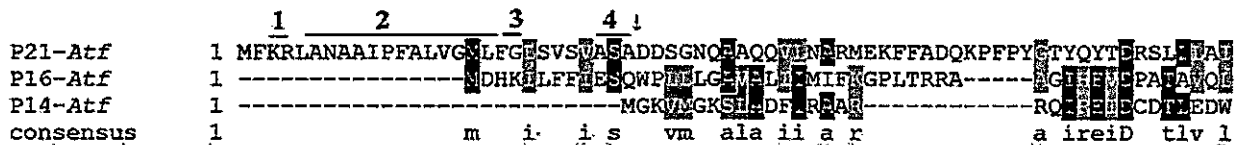


FIG. 2. (A) Partial sequence alignment of the P21 protein of *A. ferrooxidans* with those of representative sulfurtransferases. The active site and two conserved structural motifs, designated CH2A and CH2B, are labeled. A consensus is indicated in which the active site presents a cysteine conserved in all of the sequences shown. Rhod-*Bt*, bovine liver rhodanase; MPST-*Rn*, rat mercaptopyruvate sulfurtransferase; Sud-*Ws*, sulfide dehydrogenase from *W. succinogenes*; GlpE-*Ec*, *E. coli* rhodanase-like protein; P21-*Atf*, putative periplasmic rhodanase-like protein P21 from *A. ferrooxidans*. (B) Sequence alignment of *A. ferrooxidans* proteins with similarity to rhodanases. The P21 protein sequence contains a 28-amino-acid leader peptide. Within this leader peptide, indicated by the numbered lines above, are the following: the positively charged residues at the N terminus (line 1), a stretch of hydrophobic residues (line 2), a glycyl residue at the end of this stretch (line 3), and a consensus cleavage sequence (Ala/Gly/Ser)-X-(Ala/Gly/Ser) (line 4). The arrow indicates the site where the cleavage of the leader peptide would occur. P14-*Atf*, putative cytoplasmic rhodanase-like from *A. ferrooxidans*; P16-*Atf*, putative cytoplasmic rhodanase-like from *A. ferrooxidans*. The underlined sequence in P21-*Atf* indicates a putative cysteine motif known to bind iron-sulfur clusters. Accession numbers: Sud, X81642; Rhod-*Bt*, M58561; MPST-*Rn*, D50564; GlpE-*Ec*, M96795; P21-*Atf*, AJ312238; and P14-*Atf* and P16-*Atf*, derived from the genome sequence of *A. ferrooxidans* 23270.

gesting that P21 is exported, possibly to the periplasm of *A. ferrooxidans*. The amino-terminal sequence contains all of the features for the gram-negative signal peptide sequence: positively charged residues at the N terminus, a stretch of hydro-

phobic residues, a glycyl residue at the end of this stretch that would allow the formation of turns, and a consensus cleavage sequence (Ala/Gly/Ser)-X-(Ala/Gly/Ser), a motif characteristic of those proteins transported via the Sec system (25).

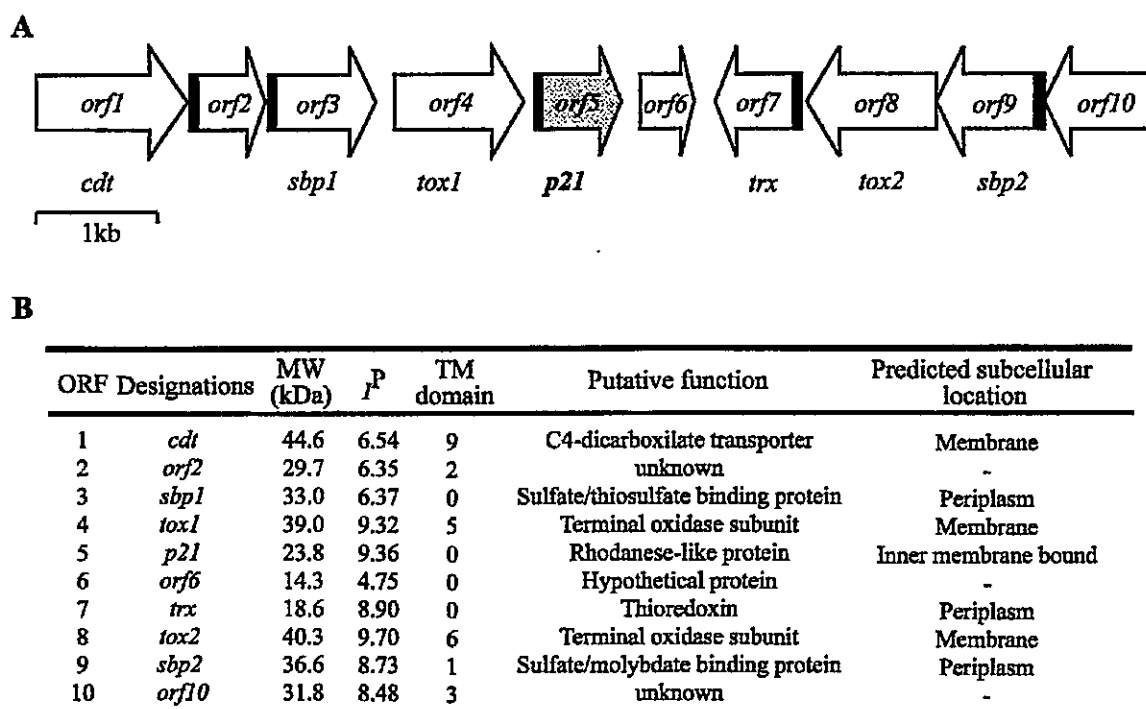


FIG. 3. (A) Schematic map of the contig region containing the putative gene cluster context around gene *p21* from *A. ferrooxidans*. Coding regions containing putative signal peptides for the Sec system are indicated in black. (B) Some properties of the putative ORFs present in this region. The programs used to determine the properties of the listed gene products are indicated in Materials and Methods.

Upon analyzing the unfinished *A. ferrooxidans* genome sequence, we found that not only was the *p21* gene present but so, too, were at least two other small sequences with rhodanese-like similarities: P14 and P16 (Fig. 2B). These two putative ORFs did not present signal peptides, and the corresponding putative proteins had isoelectric points of 4.8 (P14) and 9.3 (P16). It is also interesting that only P21 contained at its C-terminal end a cysteine motif, Cys-XX-Trp-XX-Cys (underlined in Fig. 2B), known to bind iron-sulfur clusters (4).

**Genomic analysis of the P21 region.** When the regions surrounding gene *p21* were analyzed on the incomplete genomic sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270, several putative ORFs related to sulfur metabolism were deduced. Upstream of P21 a terminal oxidase subunit (ORF4) and a sulfate-thiosulfate binding protein (ORF3) were located (Fig. 3A). These putative genes together with ORF1, ORF2, and ORF6 apparently form a cluster with the same orientation. On the other hand, a putative gene with high similarity to a periplasmic thioredoxin (ORF7), together with ORF8, ORF9, and ORF10, was oriented in a divergent way from the P21 cluster. The ORFs coding for P14 and P16 were located in different contigs of the incomplete genome from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (contigs 7920 and 7913, respectively) and with entirely different neighboring putative genes (not shown).

In a separate study, we also isolated a 2,991-bp chromosomal DNA fragment from *A. ferrooxidans* ATCC 19859 that was cloned and sequenced. The nucleotide sequences for the *p21* gene with its signal peptide and the ORFs corresponding to thioredoxin and the terminal oxidase subunit present downstream and upstream of it, respectively, were the same as those

obtained from the ATCC 23270 genomic data (results not shown), demonstrating the great similarity between these putative genes in the two *A. ferrooxidans* strains.

**Analysis of the expression of P21 in *A. ferrooxidans* grown under different conditions.** The synthesis of the rhodanese-like P21 appeared to be regulated by the presence of iron in the growth medium, with the synthesis being strongly inhibited by an increasing Fe(II) concentration. Table 1 shows the changes observed in proteins P21 and Rus when *A. ferrooxidans* grown in elemental sulfur was supplemented with increasing ferrous iron concentrations. A clear decrease in the levels of P21 synthesized and an increase in the levels of Rus synthesis were observed. This suggests a functional role for P21 in sulfur metabolism and the regulation of the expression of P21 by the

TABLE 1. Effect of ferrous iron concentration on the expression of protein P21<sup>a</sup>

Fe(II) (mM)	Relative level of protein (%)	
	P21	Rus
0.5	100.0	100.0
5	44.4	260.8
10	2.7	391.3

<sup>a</sup> *A. ferrooxidans* cells growing in sulfur medium to which the indicated ferrous iron concentrations and [<sup>35</sup>S]methionine were added. After 30 h of incubation under these conditions, total cell proteins were separated by 2-D PAGE and subjected to autoradiography, and the intensities of the spots corresponding to the rhodanese-like protein (P21) and Rus were determined by using an image analysis program. The positions of these two spots were identified previously by their coordinates in the gels and by N-terminal amino acid sequence analysis of the isolated spots (23).

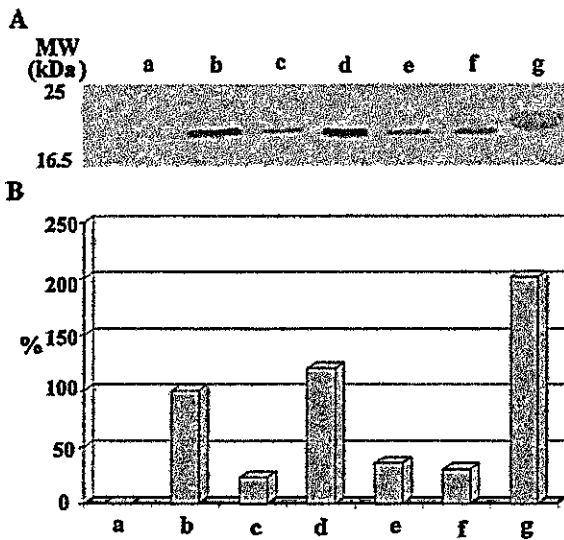


FIG. 4. Western blotting analysis of P21 in *A. ferrooxidans* grown under different conditions. (A) Equivalent amounts of total cell proteins from *A. ferrooxidans* grown in ferrous iron (lane a), elemental sulfur (lane b), thiosulfate (lane c), pyrite (lane d), copper sulfide (lane e), zinc sulfide (lane f), and a sample of pure recombinant P21 (2  $\mu$ g) (lane g) were separated by SDS-PAGE and were then transferred to a PVDF membrane, followed by reaction with antiserum against rP21 and colorimetric development as described in Materials and Methods. (B) Quantification of the bands in panel A by using the Scion image-processing program. The values shown are relative to those obtained in sulfur grown cells taken as 100%.

ferrous ion concentration present in the growth medium. When cells were grown in ferrous iron, elemental sulfur, thiosulfate, and different metal sulfides and their total cell proteins were separated by SDS-PAGE, followed by Western blotting with antiserum against rP21, the results shown in Fig. 4 were obtained. Clearly, there was a great induction of P21 in cells grown in pyrite (lanes d) and an almost entire lack of P21 in cells grown in ferrous iron (lanes a), in agreement with the results shown in Table 1. Cells grown in the presence of elemental sulfur (lanes b) showed lower induced levels of P21 compared with those of cells grown in  $\text{FeS}_2$  but greater levels compared with those of microorganisms grown in thiosulfate (lanes c),  $\text{CuS}$  (lanes e), or  $\text{ZnS}$  (lanes f) (Fig. 4).

**In vivo expression and processing of P21 from *A. ferrooxidans* in *E. coli*.** The expression vectors pPR21H and pPR21MH containing the ORF corresponding to P21, with or without leader peptide, respectively, were used to transform *E. coli* BL21(DE3), and the overexpression of the protein was studied in the presence or absence of IPTG as shown in Fig. 5. The start codon downstream from the T7 promoter is overlapped by an *NdeI* site (CATATG), and the genes to be cloned for overexpression in this system are usually amplified by PCR with a primer to introduce an *NdeI* site at the start of the coding sequence. The *p21* genes contained in the resulting plasmids pPR21H and pPR21MH were highly expressed. About 2 h after the addition of IPTG to a mid-log-phase culture of *E. coli* BL21(DE3) carrying pPR21H, the protein P21 synthesized represented ca. 40% of the total protein present in crude extracts (Fig. 5).

To obtain information about the processing of the rho-

danese-like P21 protein in *E. coli* BL21(DE3), total cell proteins from this strain were subjected to 2-D PAGE analysis. The overexpressed P21 from a plasmid containing the *p21* gene without signal peptide is seen in Fig. 6A. When the *p21* gene with signal peptide was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3), as shown in Fig. 6B, two spots with apparent masses of 23 and 21 kDa were obtained. The migrations of these spots were in agreement with the predicted sizes and isoelectric points obtained for each of these proteins before and after processing to remove the leader peptide of P23. This was confirmed by determining the N-terminal sequence of each of the spots being analyzed and suggests that the *E. coli* Sec machinery recognizes the *A. ferrooxidans* secretion signals.

**Measuring rhodanese activity of P21 and crude extracts from *A. ferrooxidans*.** The ability of rP21 to transfer sulfane sulfur from thiosulfate to cyanide was tested (11, 34) in crude extracts of *E. coli* overexpressing rP21 or with rP21 purified by affinity chromatography. However, no thiosulfate-cyanide sulfurtransferase activity was detected under these conditions (results not shown). This lack of activity could be due to the presence of a His tag in P21. However, this was not the case, since we detected no rhodanese activity in cell extracts from *E. coli* expressing P21 with no His tag (not shown). When we measured rhodanese activity in crude extracts from *A. ferrooxidans* ATCC 19859 grown in sulfur, ferrous iron, or pyrite, we obtained values in the range of those reported by Tabita et al. (0.250  $\mu\text{mol}$  of  $\text{SCN}^-/\text{min}/\text{mg}$  of protein), the differences between iron- and sulfur-grown cells being only ca. 25% (data not shown). This result is clearly different from that expected if the levels of P21 synthesized in ferrous iron- or sulfur-grown cells were responsible of the observed rhodanese activity.

**Localization of P21 in *A. ferrooxidans* by using immunocytochemistry and cell fractionation.** We used the monospecific antibodies recognizing P21 to localize this protein in *A. ferrooxidans* cells. Figure 7 shows electron micrographs of cells

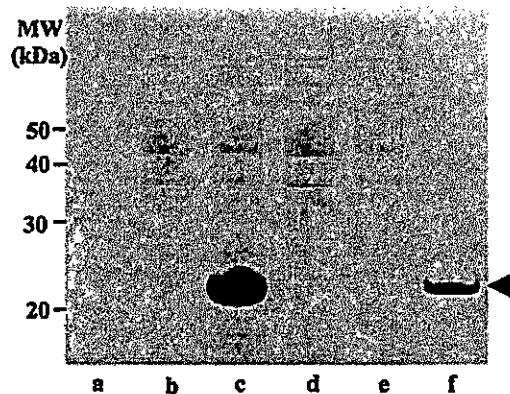


FIG. 5. In vivo overexpression of *A. ferrooxidans* *p21* gene in *E. coli*. The pET21b(+) plasmid containing the *p21* gene insert (lanes b and c) or the vector without the insert (lanes d and e) was used to transform *E. coli* BL21(DE3). All of the strains were grown for 2 h in the presence (lanes c and e) or in the absence (lanes b and d) of 1 mM IPTG added at the half-logarithmic phase of growth. The total cell proteins (lanes b, c, d, and e), molecular mass markers (lane a), and rP21 purified by affinity chromatography (lane f) were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. The arrowhead indicates the migrating position of protein P21.

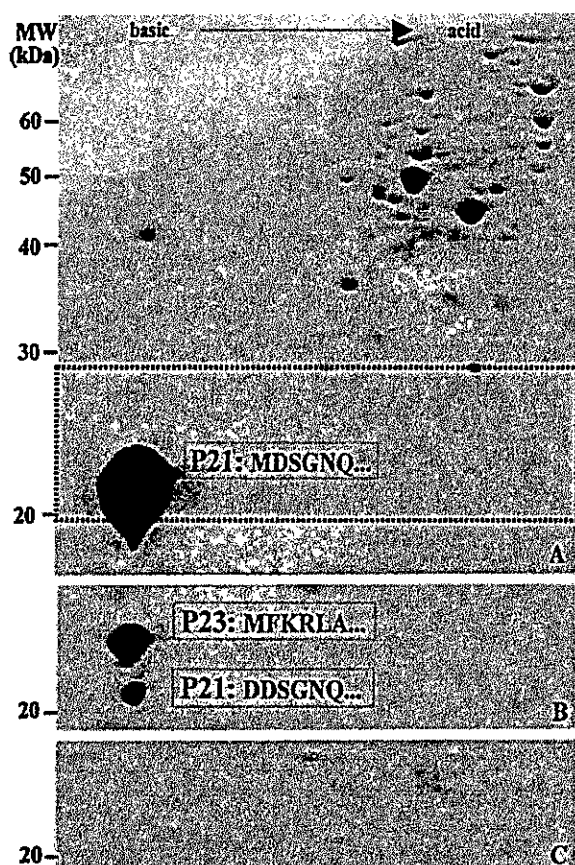


FIG. 6. The signal peptide of *A. ferrooxidans* P21 is processed when the *p21* gene is expressed in *E. coli*. The pET21b(+) plasmid containing the *p21* gene insert without the signal peptide (A), the vector with the signal peptide (B), or the same plasmid without the insert (C) was used to transform *E. coli* strain BL21(DE3). All of the strains were grown for 2 h in the presence of 1 mM IPTG added at the half-logarithmic phase of growth. The total cell proteins were then separated by 2-D NEPHGE and stained with Coomassie blue. Numbers to the left indicate molecular mass markers. In gel A, the dotted horizontal lines indicate the area where P21 migrates. Only this area is shown in gels B and C. The N-terminal amino acid sequences of the processed (P21) and nonprocessed (P23) forms of P21 are indicated. The sequence of P21 in gel A starts with a different amino acid due to a change of an aspartic acid residue for a methionine during the cloning procedure to eliminate the signal peptide sequence.

grown in sulfur and ferrous iron. Gold particles attached to the secondary antibodies recognizing the primary antibodies against P21 were concentrated at the cell periphery in sulfur-grown cells (Fig. 7A), suggesting that the protein is associated with the cell wall envelope of *A. ferrooxidans*. On the other hand, cells grown on ferrous iron (Fig. 7B) showed reduced affinity for the antibody, with low levels of randomly distributed colloidal gold particles. These results are in agreement with the expression of P21 under these two conditions (Fig. 4; Table 1). The antibodies against P21, being monospecific, did not recognize the putative proteins P14 and P16 encoded by the other *A. ferrooxidans* ORFs in spite of their similarity to rhodanese (results not shown). The presence of a signal peptide and the absence of transmembrane domains in P21 strongly suggest that this protein could be located in the

periplasmic space of *A. ferrooxidans*. By the use of osmotic shock of *A. ferrooxidans* we obtained a periplasmic fraction which gave no reaction with anti-P21 antibodies by Western analysis. On the other hand, we determined by cell fractionation that P21 was present in both soluble and inner-membrane fractions and not in the outer membrane (results not shown).

## DISCUSSION

The existence in *A. ferrooxidans* ATCC 19859 of an exported protein, P21, similar to a thiosulfate-sulfur transferase and which is regulated depending on the oxidizable substrate is very interesting considering the proposal that the oxidation of pyrite generates thiosulfate as one of the main intermediates (30). On the other hand, it has been shown that *A. ferrooxidans* generates thiosulfate when grown in a medium containing elemental sulfur (32). This could explain why P21 was induced when cells were grown in elemental sulfur. The soluble thiosulfate generated from sulfur would allow the growth of cells not attached to the sulfur particles. If P21 is involved in thiosulfate metabolism, one should expect an increased expression of the protein when the cells are grown in pyrite, thiosulfate, or sulfur, as we have observed. The lack of repression of P21 synthesis by growth in pyrite compared with that obtained by growth in ferrous iron was unexpected. However, during pyrite attack, much smaller amounts of free ferrous iron are probably present and, as we have shown, the levels of P21 drastically

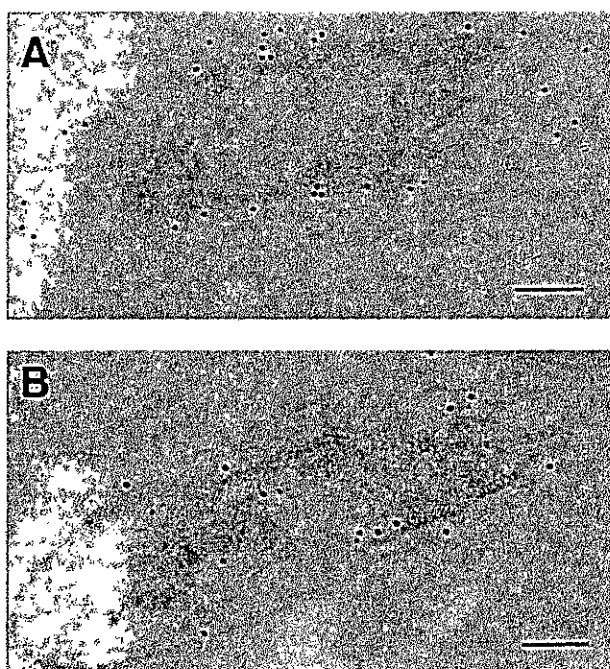


FIG. 7. Localization of P21 in *A. ferrooxidans* cells grown with different oxidizable substrates. Cells were grown in medium containing either elemental sulfur (A) or ferrous iron (B). Ultrathin sections of both kinds of cells were then subjected to immunocytochemistry with colloidal gold particles and were observed by electron microscopy. Bar, 100 nm.

decreased at higher concentrations of ferrous iron in the growth medium (Table 1).

Tabita et al. (36) reported the partial purification of a rhodanese from *A. ferrooxidans* having an optimal transferase activity in the 7.5 to 9.0 pH range. Recently, Gardner and Rawlings (11) detected thiosulfate-sulfur transferase activity in whole cells and crude extracts from *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, and *Acidithiobacillus caldus*, whereas this activity was absent from *Leptospirillum ferrooxidans*, since this microorganism is only capable of oxidizing ferrous iron or the iron contained in pyrite but not its sulfur moiety (29, 30). These results support the idea of rhodanese being involved during in vivo sulfur oxidation. Nevertheless, in the studies of Gardner and Rawlings (11), the rhodanese activity levels in *A. ferrooxidans* were the same when cells were grown either in ferrous iron or in sulfur. We also determined this activity in crude cell extracts from *A. ferrooxidans* ATCC 19859 grown in the two substrates and found similar results (data not shown). Therefore, this rhodanese activity does not behave like our reported P21, whose levels were clearly different under the aforementioned conditions. Rhodaneses have been reported as constitutive (6, 9). Therefore, the rhodanese activity measured by Gardner and Rawlings most likely corresponded to the cytoplasmic rhodanese. The regulated protein P21 that we describe here could be anchored on the periplasmic side of the cytoplasmic membrane of *A. ferrooxidans* and have a different role during sulfur metabolism.

The comparative analysis of the amino acid sequence of P21 with several known thiosulfate-sulfur transferases whose activity has been demonstrated in vitro showed a significant similarity (42%). P21 also contained the highly conserved structural domains CH2A, CH2B, and a catalytic site with a Cys-119, typical of thiosulfate-sulfur transferases (Fig. 2). The putative proteins P14 and P16 also showed rhodanese-like conserved regions, but they did not contain signal peptides on their ORFs, suggesting their cytoplasmic localization, and therefore may correspond to the previously described rhodanese activity from *A. ferrooxidans* (36). However, proteins P14 and P16 may also correspond to other bacterial proteins related to stress responses. The existence of an extensive family of such proteins containing rhodanese-like domains is well documented (16).

The lack of activity detection for P21 in vitro in our assays may be due to the need for an expected periplasmic acidic optimum pH for the protein. The pH (7.5 to 9.0) conditions for the standard rhodanese activity may not be appropriate to measure the putative rhodanese activity of P21. On the other hand, lowering the pH to 3.0 to 4.0 did not allow us to use cyanide as the sulfur acceptor. Alternatively, the lack of rhodanese activity of P21 may be due to the need for additional polypeptides required for it to be active, since it occurs with the thiosulfate-oxidizing complex from *P. versutus* (9) and the mitochondrial rhodanese (22).

The studies of a small rhodanese-like protein from *Wolinella succinogenes* showed that it acts as a periplasmic sulfide dehydrogenase and uses the same catalytic cysteine involved in anion transferase and hydrolase activity (17). This suggests a possible redox function for rhodanese-like proteins similar to that of the thioredoxin proteins. This idea is supported by the presence on the C-terminal end of P21 of a putative cysteine

motif involved in the binding of iron-sulfur clusters in electron transport complexes (4). It is also possible that P21 from *A. ferrooxidans* is a dithiol-disulfide redox activity analogous to the one in *W. succinogenes*. Nevertheless, it is known that rhodanese-like proteins could show several alternative catalytic activities, among them: (i) detoxification of toxic compounds, such as arsenate and cyanide, by either transferring anions or reducing them and (ii) a chaperone activity to allow efficient assembly of iron-sulfur complex-containing proteins (16).

Due to the lack of an appropriate workable genetic system to perform functional genomics with *A. ferrooxidans*, at this point it is not possible to assign a definitive role to P21 in sulfur metabolism in *A. ferrooxidans*. However, given its proximity to genes encoding the sulfate-thiosulfate transport system (Fig. 3), its specific and high level of accumulation in pyrite, sulfur, thiosulfate, and other sulfides, its possible localization bound to the inner membrane but facing the periplasmic space, and its similarity to rhodaneses, the protein is probably involved in the oxidation or in the acquisition of sulfur compounds.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from FONDECYT (1000967), ICGEB (project CRP/CHI00-04, contract 01/001) and ICM-P99-031-F.P.R. was the recipient of a DAAD Ph.D. scholarship.

We thank P. Varela for some initial experiments on this work. We acknowledge Maria-Rosa Bono for assistance with the preparation of the anti-P21 serum. Preliminary sequence data for the *A. ferrooxidans* strain 23270 was obtained from The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org>).

#### REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. L. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Amaro, A. M., D. Chamorro, M. Seeger, R. Arredondo, I. Peirano, and C. A. Jerez. 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173:910-915.
- Arredondo, R., A. García, and C. A. Jerez. 1994. The partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its attachment to solids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2846-2851.
- Berks, B. C., S. J. Ferguson, J. W. B. Moir, and D. J. Richardson. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta* 1232:97-173.
- Brierley, C. L. 1978. Bacterial leaching. *Crit. Rev. Microbiol.* 6:207-262.
- Chandra, T. S., and C. G. Friedrich. 1986. Tn5-induced mutations affecting sulfur-oxidizing ability (Sox) of *Thiosphaera pantotropha*. *J. Bacteriol.* 166:446-452.
- De Jong, G. A. H., W. Hazen, P. Bos, and G. Kuenen. 1997. Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* 143:499-504.
- Fowler, T. A., and F. K. Crundwell. 1998. Leaching of zinc sulfide by *Thiobacillus ferrooxidans*: experiments with a controlled redox potential indicate no direct bacterial mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3570-3575.
- Friedrich, C. G. 1998. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 39:235-289.
- Friedrich, C. G., D. Rother, F. Bardischewsky, A. Quentmeier, and J. Fischer. 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2873-2882.
- Gardner, M. N., and D. E. Rawlings. 2000. Production of rhodanese by bacteria present in bio-oxidation plants to recover gold from arsenopyrite concentrates. *J. Appl. Microbiol.* 89:185-190.
- Gulliani, N., and C. A. Jerez. 1999. Protein genes from *Thiobacillus ferrooxidans* that change their expression by growth under different energy sources, p. 79-87. In R. Amils and A. Ballester (ed.), *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century*, part B. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Gulliani, N., and C. A. Jerez. 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2318-2324.

14. Harrison, A. P., Jr. 1984. The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* 38:265-292.
15. Kelly, D. P., J. K. Shergill, W.-P. Lu, and A. P. Wood. 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Leeuwenhoek* 71:95-107.
16. Koonin, E. V., I. Aravind, and M. Y. Galperin. 2000. A comparative-genomic view of the microbial stress response, p. 417-444. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, D.C.
17. Kreis-Kleinschmidt, V., F. Fahrenholz, E. Kojro, and A. Kröger. 1995. Periplasmic sulphide dehydrogenase (Sud) from *Wolinetella succinogenes*: isolation, nucleotide sequence of the *sud* gene and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 227:137-142.
18. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
19. Lundgren, D. G. 1980. Ore leaching by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34:263-283.
20. Matsudaira, P. T. 1989. A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
21. O'Farrell, P. Z., H. M. Goodman, and P. H. O'Farrell. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12:1133-1141.
22. Ogata, K., and M. Vollini. 1990. Mitochondrial rhodanese: membrane bound and complexed activity. *J. Biol. Chem.* 265:8087-8093.
23. Osorio, G., P. Varela, R. Arredondo, M. Seeger, A. M. Amaro, and C. A. Jerez. 1993. Changes in global expression of *Thiobacillus ferrooxidans* when grown on elementary sulphur, p. 565-575. In A. E. Torma, M. L. Apel, and C. L. Brierley (ed.), *Biohydrometallurgical technologies*, vol. 2. TMS Press, Warrendale, Pa.
24. Pronk, J. T., R. Meulenbergh, W. Hazen, P. Bos, and J. G. Kuenen. 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:293-306.
25. Pugsley, A. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
26. Ray, W. K., G. Zeng, M. B. Potters, A. M. Mansuri, and T. J. Larson. 2000. Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* 182:2277-2284.
27. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.
28. Sand, W., T. Gehrke, R. Hallmann, and A. Schippers. 1995. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism—a critical evaluation of bacterial leaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:961-966.
29. Sand, W., T. Gehrke, P. G. Jozsa, and A. Schippers. 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching—direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59:159-175.
30. Schippers, A., and W. Sand. 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:319-321.
31. Seeger, M., G. Osorio, and C. A. Jerez. 1996. Phosphorylation of GroEL, DnaK, and other proteins from *Thiobacillus ferrooxidans* grown under different conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* 138:129-134.
32. Shihari, S. R., Bhavaraju, J. M. Modak, R. Kumar, and K. S. Gandhi. 1993. Dissolution of sulfur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. *Biotechnol. Bioeng.* 41:612-616.
33. Silver, M., and D. G. Lundgren. 1968. The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* 46:1215-1220.
34. Singleton, D. R., and D. W. Smith. 1988. Improved assay for rhodanese in *Thiobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2866-2867.
35. Suzuki, I. 1999. Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45:97-105.
36. Tabita, R., M. Silver, and D. G. Lundgren. 1969. The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* 47:1141-1145.
37. Tributsch, H. 1999. Direct versus indirect bioleaching, p. 51-60. In R. Amils and A. Ballester (ed.), *Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century*, part A. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
38. Tuovinen, O. 1990. Biological fundamentals of mineral leaching processes, p. 55-77. In H. L. Ehrlich and C. L. Brierley (ed.), *Microbial mineral recovery*. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y.
39. Varela, P., G. Levican, F. Rivera, and C. A. Jerez. 1998. An immunological strategy to monitor in situ the phosphate starvation state in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4990-4993.