



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Estudio de expresión a nivel transcripcional de genes
codificantes para proteínas tipo rodanasa en *Acidithiobacillus
ferrooxidans* ATCC 23270”**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular



por

Simón Rodrigo Beard Bórquez

Noviembre, 2008
Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Carlos A. Jerez

UCH-FC
Biotecnología
D 368
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“Estudio de expresión a nivel transcripcional de genes codificantes para proteínas tipo rodanasa en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

SIMON RODRIGO BEARD BÓRQUEZ

Dr. Carlos Jerez Guevara
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Presidente Comisión

Dr. Mauricio González Canales
Corrector

Mauricio González



Santiago de Chile, _____ 2008

Biografía

Nací en Temuco el día 10 de Noviembre del año 1980 pero luego de un corto tiempo nos cambiamos a Santiago, ciudad donde hasta el momento vivo. Mi educación básica la cursé en la Escuela Básica E-246 “Educadora Adela Edwards Salas” y la educación media en el colegio “Antártica Chilena”.



En 1998 obtuve la Licencia de Educación Media y en el año 1999 ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Si bien cuando ingresé a la carrera no tenía muy claro de que se trataba, o si la ciencia “sería lo mío”, al poco andar me fascinó el mundo de la Facultad, las materias vistas en los diferentes cursos y la investigación en ciencia básica.

En el año 2001 me contacté con el Dr. Carlos Jerez para participar en el programa de pasantías para estudiantes de Pregrado en Centros Internacionales de Alta Tecnología de la Fundación Andes y, concomitantemente, empecé a trabajar en su Laboratorio. Ganamos la pasantía con un proyecto de colaboración con el Dr. Víctor de Lorenzo del Centro Nacional de Biotecnología (CNB) de la Universidad Autónoma de Madrid, para generar “metagenotecas” de los microorganismos que habitan en el río Tinto, río ubicado en la región de Huelva, España, y caracterizado por sus condiciones de pH ácido, su alta concentración de metales pesados y poseer una microbiota compuesta principalmente por bacterias quimiolitotróficas (las mismas encontradas en las faenas de biolixiviación). Esta estadia la realicé en el recién inaugurado “Centro de Astrobiología” (CAB).

Cuando regresé al laboratorio, comencé a trabajar guiado por Mario Vera en el montaje de la técnica de macroarreglos de DNA, con el fin de determinar la expresión diferencial de genes en la bacteria biolixivante *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Este trabajo que realizamos en conjunto cuajó en una metodología que actualmente es de uso rutinario en el laboratorio y ha sido utilizada para cuantificar la expresión de varios grupos de genes en diversas condiciones de crecimiento. Parte de dicho trabajo es presentado en esta Memoria de Título.



Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi madre, mi padre y a mi hermana, que siempre me apoyaron en esto de “estudiar ciencias” y posibilitaron mis estudios. A mi abuelo, quién me inculcó el gusto por las ciencias desde niño.

A Stephanie y Laura, mi familia, quienes fueron fuente de la motivación y apoyo fundamentales durante el término, correcciones y entrega de la tesis.

A Carlos, el “profe”, mi tutor y guía durante estos años, por la confianza depositada en mi y por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo en su laboratorio.

A todos los integrantes del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, que durante estos años han aportado con importantes discusiones y críticas y contribuyen a crear un muy buen ambiente de trabajo. En especial a Mario Vera por guiarme en el primer tiempo y darme el ánimo y la fuerza necesaria para continuar cuando los resultados se veían lejanos y a Don Juan, que gracias a su importantísima labor diaria permite el trabajo de todos en el laboratorio.

A Ailen, Juanu y Gaby, por su amistad, noches de estudio (y de las otras), por su ánimo y comprensión constante durante estos años, y por sobre todo la gran diligencia y proactividad mostrada en momentos que el sarcasmo y la ironía parecían ganar la batalla.



Indice de contenidos

Portada	i
Informe de aprobación	
Biografía	
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Indice de contenidos	iv
Indice de tablas	vii
Indice de figuras	viii
Lista de abreviaturas utilizadas	ix
Resumen	x
Abstract	xii
I Introducción	1
I.1 Biolixiviación de sulfuros metálicos	1
I.2 Química de sulfuros metálicos	1
I.2.1 Oxidación de sulfuros metálicos por la vía del tiosulfato	2
I.2.2 Oxidación de sulfuros metálicos por la vía de los polisulfuros	3
I.3 Microbiología del proceso de biolixiviación	3
I.4 Oxidación biológica de compuestos reducidos de azufre	4
I.4.1 Oxidación de azufre en bacterias	4
I.4.2 Oxidación del azufre en arqueas	5
I.4.3 Oxidación del azufre en <i>A. ferrooxidans</i>	5
I.4.4 Metabolismo del tiosulfato en <i>A. ferrooxidans</i>	6
I.3.4 Metabolismo del tiosulfato en <i>A. ferrooxidans</i>	6
I.5 Estudios proteómicos en <i>A. ferrooxidans</i>	7
I.6 Proteínas tipo rodanasa de <i>A. ferrooxidans</i>	9
I.6.1 Análisis de la TST putativa P21 de <i>A. ferrooxidans</i>	9
I.6.2 Búsqueda de otras proteínas tipo rodanasa en el genoma disponible de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	10
I.6.3 Análisis de los contextos genéticos de las proteínas tipo rodanasa de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	10

I.7 Genómica funcional	13
I.7.1 Genómica funcional en microorganismos biolixiviantes	13
I.8 Hipótesis de Trabajo	15
I.9 Objetivos	
I.9.1 Objetivo General	15
I.9.2 Objetivos Específicos	15
II. Materiales y Métodos	16
II.1 Materiales	16
II.1.1 Reactivos químicos	16
II.1.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	17
II.2 Métodos	17
II.2.1.1 Análisis bioinformáticos de la secuencia no anotada de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	17
II.2.1.2 Actualización: secuencia anotada de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	18
II.2.2 Extracción del DNA genómico de <i>A. ferrooxidans</i>	19
II.2.3 Extracción del RNA de <i>A. ferrooxidans</i>	19
II.2.3.1 Extracción del RNA total de <i>A. ferrooxidans</i>	19
II.2.3.2 Protocolos de enriquecimiento del RNA total en mRNA	20
II.2.4 Electroforesis en geles de agarosa	21
II.2.5 Construcción del macroarreglo de DNA	21
II.2.5.1 Diseño de oligonucleótidos	21
II.2.5.2 Obtención de los amplicones sembrados en las membranas de nylon	22
II.2.5.3 Sembrado de las membranas de nylon	23
II.2.6 Marcaje de sondas de cDNA	23
II.2.7 Hibridización, lavado y exposición de las membranas	24
II.2.8 Normalización y tratamiento de los datos de intensidad de los macroarreglos de DNA	25
III. Resultados	26
III.1 Selección de los ORF de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 analizados en esta tesis y diseño de oligonucleótidos	26

III.2 Extracción del DNA genómico de <i>A. ferrooxidans</i>	26
III.3 Extracción del RNA total de <i>A. ferrooxidans</i>	28
III.4 Construcción de los macroarreglos de DNA	29
III.4.1 Amplificación de los fragmentos para sembrar en las membranas de nylon	29
III.4.2 Sembrado de las membranas de nylon	30
III.5 Estandarización de las condiciones de marcaje e hibridización de las membranas	31
III.5.1 Comparación marcaje utilizando oligonucleótidos al azar y específicos	31
III.5.2 Protocolos de enriquecimiento en mRNA de muestras de RNA total	33
III.6 Evaluación de la reproducibilidad del sistema de macroarreglos de DNA	34
III.6.1 Determinación del límite de detección del sistema de macroarreglos de DNA	35
III.7 Análisis de expresión diferencial de los ORF codificantes para proteínas tipo rodanasa de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y sus contextos génicos	37
IV. Discusión	42
V. Conclusiones	53
VI. Referencias	54
VII. Anexo	61
VII.1 Oligonucleótidos utilizados	61

Indice de tablas

Tabla 1. Características de las proteínas tipo rodanasa identificadas en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	10
Tabla 2. ORF correspondientes a proteínas tipo rodanasa y de sus contextos génicos sembrados en el macroarreglo de DNA	27
Tabla 3. Disposición de los amplicones en la placa "5S"	31
Tabla 4. Resultados análisis de expresión diferencial de ORF codificantes para proteínas tipo rodanasa y sus contextos génicos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 en distintos sustratos oxidables	40

Indice de figuras

Figura 1. Esquema simplificado de las vías indirectas de biolixiviación de sulfuros metálicos	2
Figura 2. Esquema de los contextos genéticos de las proteínas tipo rodanasa de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	11
Figura 3. Análisis del DNA genómico de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 mediante electroforesis en geles de agarosa	28
Figura 4. Análisis del RNA total de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	29
Figura 5. Resultado representativo de la amplificación de fragmentos para la siembra en membranas de nylon	30
Figura 6. Determinación de condiciones óptimas para el marcaje de RNA total de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	32
Figura 7. Resultado de las hibridizaciones del macroarreglo de DNA 5S de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	34
Figura 8. Variabilidad del sistema de macroarreglos de DNA de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	35
Figura 9. Determinación del límite de detección del sistema de macroarreglos de DNA de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	37
Figura 10. Análisis de expresión diferencial en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 utilizando el sistema de macroarreglos de DNA	38

Lista de abreviaturas utilizadas

2D-PAGE	Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
AMV	Virus de la Mieloblastosis Aviar
BLAST	Herramienta de Búsqueda por Alineamientos Básicos Locales
cDNA	DNA de copia
CV	Coefficiente de variación
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
DEPC	Di-etil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxirribonucleotidos trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzima
EMBL	El laboratorio Europeo de biología molecular
GSH	Glutación reducido
IC	Intensidad cruda
IFX	Intensidad del fondo promedio
IN	Intensidad neta
INR	Intensidad neta relativa
INRX	Intensidad neta relativa promedio
M-MLV	Virus Molony de la leucemia de Murino
MOCO	Cofactor de molibdeno
MPT	Molibdopterina
msDNA	DNA multicopia de simple hebra
MST	Mercaptopiruvato azufre transferasa
ND	No determinado
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pI	Punto isoeléctrico
Qsr	Relación señal-ruido
RPM	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción Reversa
RT-PCR	PCR acoplado a transcripción reversa
SBP	Proteína de unión a sulfato/tiosulfato
SDO	Azufre dioxigenasa
SOR	Azufre Oxigenasa Reductasa
TAE	Tris-acetato EDTA
TQO	Tiosulfato-quinona oxidoreductasa
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
TST	Tiosulfato azufre transferasa
UV	Ultra Violeta

Resumen

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria quimiolitotrófica Gram negativa capaz de obtener su energía a partir de la oxidación de ión ferroso o compuestos reducidos de azufre. Las vías de oxidación de compuestos de azufre en bacterias acidófilas aún no están completamente determinadas y en *A. ferrooxidans* no se han identificado los genes que codifican para todas las proteínas involucradas en el proceso. En nuestro laboratorio, utilizando técnicas de proteómica, hemos identificado una proteína denominada P21 periplásmica que presenta un dominio rodanasa. Los niveles de abundancia relativa de la proteína P21 son mayores durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en compuestos de azufre, respecto a células crecidas en ión ferroso. Las proteínas pertenecientes a la familia de las rodanasas son proteínas con actividad tiosulfato-azufre transferasa y utilizan cianuro como aceptor artificial del átomo de azufre. Debido al papel central que juega el tiosulfato en el proceso de biolixiviación de sulfuros metálicos se decidió profundizar el estudio de las proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans*. Nuestros análisis bioinformáticos de la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mostraron la presencia de otros 7 marcos abiertos de lectura (ORFs) codificantes para proteínas con dominios tipo rodanasa, los cuales se denominaron de acuerdo a sus pesos moleculares en kDa deducidos de las secuencias como *p11*, *p14*, *p14.3*, *p15*, *p16*, *p16.2* y *p28*. Los contextos genéticos de estos ORFs, sugieren que los productos que codifican podrían estar involucrados en diversos procesos celulares. Para establecer la relación de los ORFs codificantes para proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* con el metabolismo de compuestos de azufre, en esta tesis se determinaron los niveles de abundancia relativa de transcritos para estos ORFs utilizando un macroarreglo de DNA. Se construyó el sistema de macroarreglos de DNA, sembrando productos de PCR específicos para los ORFs codificantes para

proteínas tipo rodanasa y para algunos miembros de sus respectivos contextos genéticos en membranas de nylon. Se estandarizaron las condiciones de marcaje, lavado, exposición de las membranas y se determinó el límite de detección del sistema. Se analizó el patrón de expresión de los ORFs sembrados en el macroarreglo de DNA utilizando sondas de cDNA sintetizadas a partir del RNA total obtenido de células crecidas en tiosulfato, azufre elemental o ión ferroso. Se determinó que los niveles de transcritos correspondientes a los ORFs *p11*, *p14*, *p16.2* y *p21* son mayores en tiosulfato y azufre elemental que en ión ferroso, mientras que para los genes codificantes para *p15*, *p16* y *p28* no varían de acuerdo a la fuente energética utilizada por el microorganismo. El montaje exitoso de esta técnica de análisis de expresión génica en *A. ferrooxidans* permitirá su uso en el estudio de otras vías metabólicas de este microorganismo o para análisis de composición, diversidad y expresión génica de comunidades presentes en faenas de biolixiviación.

Abstract

Acidithiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative chemolithoautotrophic bacterium that uses ferrous iron or reduced sulfur compounds as energy source. The pathways for sulfur compounds oxidation are not yet completely determined in acidophilic bacteria. The genes coding for the *A. ferrooxidans* proteins involved in sulfur compounds oxidation are currently unknown. Using proteomics techniques we have identified a periplasmic protein called P21 with a rhodanese-like domain. The relative levels of P21 are higher in *A. ferrooxidans* cells grown in sulfur compounds compared to those grown in ferrous iron. Proteins from the rhodanese family have thiosulfate-sulfur transferase activity and use cyanide as an artificial sulfur-acceptor. Due to the central role of thiosulfate during bioleaching of sulfide ores we have further studied the rhodanese-like proteins from *A. ferrooxidans*. Our bioinformatic analysis of the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome sequence show other 7 open reading frames (ORFs) coding for rhodanese-like proteins. These ORFs were called according to their deduced molecular weights (in kDa) as *p11*, *p14*, *p14.3*, *p15*, *p16*, *p16.2* and *p28*. The genetic contexts around these ORFs suggests that the protein coded by them could be involved in several cellular processes. To find out the links between rhodanese-like proteins coded in the *A. ferrooxidans* genome and sulfur compounds metabolism, the relative transcription level of these genes have been determined in this thesis by using a DNA-microarray system. The DNA microarray membranes were spotted with specific PCR products for the ORFs coding rhodanese-like proteins and for members of their genetic contexts. The labeling, washing and exposing conditions were standardized. The detection limit of the system was also determined. The expression patterns for the spotted ORFs with the cDNA probes synthesized from total RNA obtained from cells grown in thiosulfate, elemental sulfur or ferrous iron were determined. They showed that the transcript levels

for the genes *p11*, *p14*, *p16.2* and *p21* were higher in thiosulfate and elemental sulfur than in ferrous iron. The expression levels for *p15*, *p16* and *p28* did not change with the different energy sources used by the microorganism. The successful set-up of this gene expression analysis system in *A. ferrooxidans* will allow the study of other metabolic pathways in this microorganism. The composition and expression profiles of specific bioleaching communities can be also analyzed using this system.

I. Introducción

I.1 Biolixiviación de sulfuros metálicos

En la corteza terrestre los metales se encuentran generalmente asociados a elementos no metálicos formando cristales insolubles denominados minerales. Por ejemplo, las formas más abundantes en las cuales se encuentra el cobre son los sulfuros y óxidos insolubles. Para la recuperación del cobre la industria minera utiliza principalmente el proceso de pirometalurgia. El alto costo de implementación y manutención, la baja recuperación obtenida desde minerales de baja ley y los problemas medioambientales asociados a la pirometalurgia han impulsado la investigación y el desarrollo de metodologías alternativas para la extracción de metales, siendo la biolixiviación una alternativa factible de aplicar en procesos industriales (<http://www.codelco.cl>). La biolixiviación se define como la movilización de cationes metálicos desde minerales insolubles a la solución acuosa por procesos de oxidación biológica. También es conocida como biooxidación, pero este último término se utiliza principalmente para referirse al proceso de recuperación de oro o plata en el cual la descomposición bacteriana del mineral es usada sólo para facilitar la posterior extracción del metal con cianuro. "Biominería" es el término más general usado para la descripción del proceso (Rawlings, 2002, Rohwerder y cols., 2003). Actualmente se acepta que la biolixiviación de sulfuros metálicos es un proceso resultante de la oxidación química del mineral, siendo el rol de los microorganismos la producción y regeneración de los agentes oxidantes.

I.2 Química de sulfuros metálicos

En sus estados reducidos (-2 y -1) el azufre puede formar compuestos con una gran variedad de metales y metaloides denominados sulfuros metálicos. La pirita (FeS_2) el sulfuro metálico más abundante en la corteza terrestre (Middelburg, 2000).

Dependiendo del tipo de estructura cristalina y de los orbitales de valencia involucrados en los enlaces del sulfuro metálico, estos pueden ser solubilizados con ácidos y/o por oxidantes fuertes como el ión férrico (Fe^{3+}). Se ha propuesto que la oxidación de sulfuros metálicos ocurre principalmente por dos vías: la vía del tiosulfato (para sulfuros insolubles en ácido) y la vía de los polisulfuros y azufre elemental (para los sulfuros solubles en ácido) (Figura 1) (Schippers y Sand, 1999).

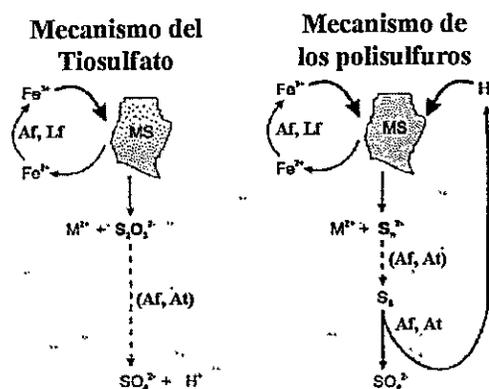
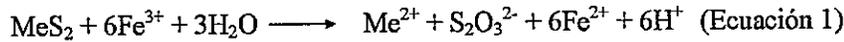


Figura 1. Esquema simplificado de las vías indirectas de biolixiviación de sulfuros metálicos. MS, sulfuro metálico; M^{2+} , ión metálico; $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, tiosulfato; S_n^{2-} , polisulfuro; S_8 , azufre elemental; Af, Lf, Ti, reacciones enzimáticas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* o *Acidithiobacillus thiooxidans* respectivamente; entre paréntesis, reacciones posiblemente catalizadas por dichas bacterias (adaptado de Schippers y Sand, 1999).

I.2.1 Oxidación de sulfuros metálicos por la vía del tiosulfato

Los sulfuros metálicos como la pirita, molibdenita y tungstenita (FeS_2 , MoS_2 y WS_2 respectivamente) pueden ser solubilizados exclusivamente por la oxidación sucesiva con iones Fe^{3+} , en los cuales se retiran un total de 6 electrones para romper el enlace entre el motivo azufrado y el metal (Ecuación 1). En base a los productos detectados durante la oxidación de la pirita (tiosulfato en forma momentánea, politionatos, azufre elemental y sulfato) se propone un modelo de oxidación cíclica del sulfuro metálico (MS_2), donde el

tiosulfato sería el primer intermediario formado y cumpliría un papel central (ver el “mecanismo del tiosulfato” en la Figura 1) (Schippers y cols., 1996)



I.2.2 Oxidación de sulfuros metálicos por la vía de los polisulfuros

Los sulfuros metálicos como la esfalerita, galena, arsenopirita y calcopirita (ZnS, PbS, FeAsS y CuFeS₂ respectivamente) pueden ser solubilizados en presencia de ácidos generando principalmente azufre elemental. Esto puede explicarse mediante un ataque combinado de protones e iones Fe³⁺, en el que la unión de 2 protones al motivo azufrado del sulfuro metálico (MS) dan paso al rompimiento del enlace con el metal liberando H₂S. Este puede ser posteriormente oxidado por iones Fe³⁺ generando el radical H₂S^{•+} el cual puede dimerizar y reoxidarse sucesivamente formando polisulfuros de diferentes largos de cadena (S_n²⁻), los cuales a pH ácido pasan a azufre elemental (ver el “mecanismo de los polisulfuros” en la Fig. 1) (Schippers y Sand, 1999).

I.3 Microbiología del proceso de biolixiviación.

A temperatura ambiente la biolixiviación de minerales se lleva a cabo por consorcios de microorganismos en los cuales se encuentran varias especies de bacterias Gram negativas acidófilas y quimiolitioautotróficas, entre las que se encuentran *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Leptospirillum ferriphilum*; microorganismos heterotróficos del género *Acidiphilum* y arqueas como *Ferroplasma* (Rawlings, 2005); la abundancia relativa de cada especie es dependiente del tipo de mineral y de las condiciones de temperatura, pH y concentración de ión férrico encontradas en cada lugar. Dado que gran parte de los microorganismos que participan en el proceso se encuentran adheridos en la superficie del

mineral, se emplean los términos de mecanismos de “contacto” para describir los mecanismos de oxidación que ocurren en la interfase entre la pared de la bacteria, embebida en exolipopolisacáridos, y la superficie del mineral, y de “no contacto” para referirse al poder oxidante generado por las bacterias de vida libre o planctónicas (Rohwerder y cols., 2003).

A. ferrooxidans es una γ -proteobacteria quimiolitotrófica Gram negativa capaz de obtener su energía a partir de la oxidación del ión ferroso, azufre elemental, tiosulfato y otros compuestos reducidos de azufre (Pronk y cols., 1990; Rohwerder y cols., 2003; Rawlings, 2005). El genoma de la cepa ATCC 23270 se encuentra completamente secuenciado y anotado (J. Craig Venter Institute, <http://www.tigr.org>), siendo uno de los microorganismos usados como modelo para el estudio de los mecanismos de oxidación de ión ferroso, compuestos reducidos de azufre y del proceso de biolixiviación de minerales.

I.4 Oxidación biológica de compuestos reducidos de azufre

I.4.1 Oxidación de azufre en bacterias

La oxidación de compuestos de azufre se ha caracterizado ampliamente en la bacteria neutrófila Gram negativa quimiolitotrófica *Parococcus pantotrophus*. En esta bacteria la oxidación del azufre está determinada por el locus Sox (de “Sulfur oxidation”) consistente en 15 genes, de los cuales 7 (*soxXYZABCD*) son esenciales para la oxidación del azufre *in vitro* (Friederich y cols., 2005). El complejo multienzimático codificado en el locus *sox* estaría ubicado en el periplasma de la bacteria y sería responsable de la oxidación de azufre a sulfato sin la producción de intermediarios solubles. Se han encontrado proteínas homólogas a todos los componentes del complejo Sox de *P. pantotrophus* en las α -proteobacterias; en las β y γ -proteobacterias neutrófilas y las bacterias fototróficas de azufre se encuentran homólogos solo para algunos componentes de este complejo (Friederich y cols., 2005). Análisis de las secuencias de los genomas parciales de los

genomas de *A. thiooxidans* y *A. caldus* muestran que estos microorganismos también tendrían genes homólogos a componentes del sistema Sox de *P. pantotrophus* (Valdés y cols., 2008).

I.4.2 Oxidación del azufre en arqueas

En las arqueas la oxidación del azufre está restringida a los miembros termoacidófilos del grupo de los Sulfolobales. En *Acidianus ambivalens* se ha descrito una azufre oxigenasa reductasa (SOR), la que desproporcionaría el azufre elemental en presencia de oxígeno a ácido sulfhídrico y sulfito. La reacción abiótica entre estos compuestos genera tiosulfato y estaría favorecida por las altas temperaturas del ambiente en el que se encuentra este microorganismo. El acoplamiento entre la oxidación del azufre y la reducción del oxígeno molecular estaría dada por la oxidación del tiosulfato por parte de una tiosulfato:quinona oxidoreductasa (TQO) asociada a membrana, que transferiría los electrones desde el tiosulfato al pool de quinonas, siendo finalmente reducido el oxígeno molecular por una quinol:oxígeno oxidoreductasa terminal (Müller y cols., 2004). La TQO de *A. ambivalens* consta de dos subunidades y está codificada por los genes *doxD* y *doxA* (Müller y cols., 2004).

I.4.3 Oxidación del azufre en *A. ferrooxidans*

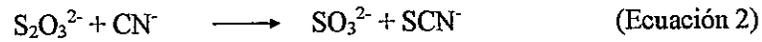
A. ferrooxidans es capaz de utilizar sulfuro, azufre elemental, tiosulfato, tetracionato y sulfito como únicas fuentes de energía (Pronk y cols., 1990). Rohwerder y Sand (2003) caracterizaron la actividad oxidadora de azufre en extractos crudos de *Acidithiobacillus* y *Acidiphillum spp.* e identificaron el sustrato utilizado *in vitro* por la enzima como un persulfuro de glutatión. La actividad se caracterizó como una azufre dioxigenasa (SDO) y se postuló que la oxidación del azufre involucraría una reducción espontánea del S⁰ en presencia de GSH para generar derivados persulfurados de largo de cadena variables

(GSSH) que serían oxidados por una SDO en presencia de oxígeno molecular a sulfito. El sulfito generado sería oxidado a sulfato por una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SOR) entregando los electrones a un citocromo *c* para culminar con la reducción del oxígeno molecular mediante una citocromo oxidasa (Rohwerder y Sand, 2003). Sin embargo los genes codificantes para la SDO y SOR no han sido clonados ni se dispone de secuencias aminoacídicas de estas enzimas.

1.4.4 Metabolismo del tiosulfato en *A. ferrooxidans*

Como se ha mencionado arriba, *A. ferrooxidans* es capaz de crecer utilizando tiosulfato como única fuente de energía. El tiosulfato es inestable a pH < 4,5 descomponiéndose a sulfito y azufre elemental, lo que hace difícil el estudio de intermediarios metabólicos en cultivos en batch. A diferencia de lo observado en bacterias neutrófilas como *P. pantotrophus*, donde durante la oxidación del tiosulfato a sulfato no se detectan intermediarios solubles, durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en condiciones limitantes de tiosulfato se observa la acumulación momentánea de tetrionato concomitantemente a la desaparición del tiosulfato, indicando que el primer intermediario de la oxidación del tiosulfato sería el tetrionato, reacción catalizada por una enzima con actividad tiosulfato deshidrogenasa (TD) (Pronk y cols., 1990). Por otro lado tampoco se han encontrado homólogos a los componentes del complejo Sox en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 ni en arqueas acidófilas, lo que sugiere la existencia de una vía distinta para la oxidación de tiosulfato en estos microorganismos (Ramírez y cols., 2004; Friederich y cols. 2005; Valenzuela y cols., 2006 y 2007). El tetrionato generado durante la oxidación de tiosulfato es oxidado en un proceso cíclico vía politionatos a sulfato (Pronk y cols., 1990). En extractos crudos de *A. ferrooxidans* se reportó la actividad rodanasa (Tabita y cols., 1969; Ramírez y cols., 2002). Las rodanasas pertenecen a la superfamilia de las rodanasas/Cdc25 fosfatasas, siendo ubicuas en todos los dominios de la vida. Son enzimas

con actividad tiosulfato:aceptor azufre transferasas (TST; E.C. 2.8.1.1) cuya actividad se ensaya *in vitro* por la transferencia del azufre sulfano del tiosulfato al cianuro, formando tiocianato (Ecuación 2). Si el dador de azufre es 3-mercaptopiruvato se denominan mercaptopiruvato:azufre transferasas (MST; E.C. 2.8.1.2) (Bordo y Bork, 2002)



Además de las vías de oxidación del tiosulfato mediadas por el complejo Sox y por la TD, se ha descrito una tercera vía en el cual el tiosulfato es clivado por una enzima con actividad tiosulfato-azufre transferasa (TST) generando azufre y sulfito, pudiendo ser este último oxidado por una sulfito oxidoreductasa disimilatoria o por la vía de la adenil fosfo-sulfato (APS) reductasa para generar ATP (Brüser y col., 2000).

I.5 Estudios proteómicos en *A. ferrooxidans*

Dada la importancia y el escaso conocimiento que se tiene de los sistemas involucrados en el metabolismo de *A. ferrooxidans* y a la solo reciente disponibilidad de la secuencia anotada del genoma de la cepa ATCC 23270, en nuestro laboratorio se han tomado aproximaciones proteómicas para la identificación de proteínas importantes en la oxidación de compuestos reducidos de azufre en *A. ferrooxidans*. Al comparar el patrón global de de proteínas presentes en extractos totales de *A. ferrooxidans* obtenidos en diferentes condiciones de crecimiento, mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE), pueden identificarse y secuenciarse las proteínas aumentadas o presentes solamente en la condición de interés. De esta manera en nuestro laboratorio se ha logrado la identificación de proteínas expresadas diferencialmente durante cambios en el pH externo, shock térmico, carencia de fosfato y el uso de diferentes sustratos como fuentes energéticas (Amaro y cols., 1991; Varela y Jerez, 1992; Seeger y Jerez, 1993; Vera, y cols., 2003; Ramírez y cols., 2002 y 2004). Dentro de las proteínas identificadas mediante 2D-PAGE cuyos niveles aumentan al utilizar compuestos de azufre como fuente de energía se encuentran una proteína de membrana externa (OMP44), una putativa TST exportada (P21), una proteína de unión molibdato/tiosulfato/sulfato (SBP; ModA en Acosta y cols., 2005), una proteína putativa de exporte de polisacarido capsular (WcbC) y una proteína de 16 kDa de función desconocida (Ramírez y cols., 2002 y 2004). Los altos niveles de la TST putativa P21 en los extractos obtenidos de cultivos crecidos en compuestos reducidos de azufre, así como el rol central que tendría el tiosulfato en el mecanismo de oxidación de la pirita y otros sulfuros metálicos hicieron profundizar el estudio de la proteína P21 y de la actividad rodanasa de *A. ferrooxidans*.

I.6 Proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans*

I.6.1 Análisis de la TST putativa de *A. ferrooxidans* P21

Por análisis de 2D-PAGE de extractos de proteínas totales en *A. ferrooxidans* ATCC 19859 se identificó una proteína de 21 KDa cuyos niveles son muy abundantes cuando la bacteria utiliza azufre elemental, tiosulfato, esfalerita (ZnS), Sulfuro de cobre (CuS) y pirita (FeS₂) y casi ausente en los extractos obtenidos de bacterias utilizando ión ferroso como sustrato oxidable. Con la secuencia del amino terminal de la proteína se localizó en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 un ORF codificante para una proteína de 23,8 KDa y con un pI de 9,18, el cual fue clonado y expresado en *Escherichia coli*; este ORF es homólogo a una TST de *Deinococcus radiodurans* y a otras proteínas pertenecientes a la superfamilia de las rodanasas. Además presenta los dominios característicos CH2A y CH2B así como el “loop” con la cisteína característica del sitio activo de las proteínas pertenecientes a la familia de las rodanasas (Ramírez y cols., 2002; Acosta y cols., 2005). La diferencia en los pesos moleculares se debe a la presencia de un péptido señal tipo Sec, el cual sería procesado correctamente en *E. coli*. Mediante ensayos de inmunoelectromicroscopía electrónica utilizando anticuerpos anti-P21 conjugados con partículas de oro se mostró que la proteína P21 se localizaría principalmente en la periferia de *A. ferrooxidans*. Sin embargo, no se encontró en extractos periplásmicos obtenidos por shock osmótico, lo que sugiere que P21 estaría asociada a la membrana interna, orientada hacia el periplasma (Ramírez y cols., 2002). La P21 recombinante expresada en *E. coli* no mostró actividad rodanasa *in vitro*, por lo tanto P21 no daría cuenta de la actividad rodanasa de extractos crudos de *A. ferrooxidans* reportada por Tabita y cols. (1969) y Ramírez y cols. (2002).

1.6.2 Búsqueda de otras proteínas tipo rodanasa en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Basándose en la secuencia de P21 y otras proteínas pertenecientes a la superfamilia de las rodanasas realizamos una búsqueda bioinformática en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, encontrándose siete ORFs codificantes para proteínas que contienen un dominio tipo rodanasa, denominados de acuerdo al peso molecular (en KDa) deducido de las secuencias como *p11*, *p14*, *p14.3*, *p15*, *p16*, *p16.2* y *p28* (Ramírez y cols., 2002; Acosta y cols., 2005). Todas las proteínas tipo rodanasa identificadas poseen los dominios CH2A, CH2B y el sitio activo característico para las proteínas tipo TST o MST (Acosta y cols., 2005). En la tabla 1 se resumen algunas características de las proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y en la Figura 2 se esquematizan sus respectivos contextos génicos.

Tabla 1. Características de las proteínas tipo rodanasa identificadas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Adaptada de Acosta y cols., 2005).

Proteína	PM ^a (kDa)	pI ^b	DTM ^c	Localización Predicha	Actividad TST ^d
P11	11,7	9,10	NO	Citoplasma	ND ^e
P14	14,5	4,84	NO	Citoplasma	0,43 ± 0,134
P14.3	14,3	4,75	NO	Citoplasma	ND
P15	15,2	6,18	NO	Citoplasma	1,45 ± 0,072
P16	15,6	9,26	SI	membrana interna	0,57 ± 0,184
P16.2	16,3	6,49	NO	Citoplasma	3,03 ± 0,185
P21	23,8	9,36	SI	periplasma/ membrana interna	ND
P28	28,6	5,80	NO	Citoplasma	ND

^a PM, peso molecular

^b pI, punto isoeléctrico

^c DTM, dominios de transmembrana

^d Actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa, en U mg⁻¹ proteína

^e ND, no determinada

1.6.3 Análisis de los contextos genéticos de las proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Los sustratos fisiológicos de las proteínas tipo rodanasa aún no se conocen, pero se ha demostrado que participarían en múltiples procesos de transferencia de azufre en procesos tanto regulatorios como metabólicos (Bordo y Bork, 2002). Los contextos genéticos de las

Sud (de Sulfide dehydrogenase) de *Wolinella succinogenes*, que presenta actividad polisulfuro azufre transferasa (Klimmek y cols., 1999). Río abajo de *p15* se encuentran *speE* y *bro*, codificantes para una putativa espermidina/espermina sintasa (relacionada con el transporte y metabolismo de aminoácidos) y una proteína putativa de unión a DNA de la familia BRO, respectivamente. Río arriba de *p15* se encuentran 2 ORFs codificantes para proteínas integrales de membrana putativas denominadas *impl1* e *impl2* (Acosta y cols., 2005). *p16* se encuentra río abajo de un regulador transcripcional de la familia ArsR (*arsR*) y del grupo *tolC-acrAB*, el cual codificaría para un sistema de eflujo de cationes/multi-drogas del tipo RND y de un pequeño ORF (*hyp3*) codificante para una proteína putativa de función desconocida. Río abajo de *p16* se encuentran ORF codificantes para una glutarredoxina (*grx*), una tiorredoxina (*thi*) y para una N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (*amiC*). En la cercanía del ORF *p16.2* solo se encuentra *nei*, el cual codificaría para una putativa formamidopirimidina-DNA glicosilasa posiblemente involucrada en la replicación, recombinación y reparación del DNA (Acosta y cols., 2005). Los ORF codificantes para las rodanasas P14.3 y P21 se encuentran contiguos en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Río arriba de estos se encuentra *doxDA1*, codificante para una subunidad de una quinol oxidasa terminal homóloga a la TQO de *A. ambivalens* (Müller y cols., 2004); *modA1*, codificante para el componente periplásmico de un transportador ABC de molibdato/tiosulfato/sulfato anteriormente descrita como una proteína de unión a sulfato (SBP) (Ramírez, 2002 y 2004); *hyp4*, una proteína hipotética y *tehA*, codificante para un transportador de C-4 dicarboxilato (*cdt* en Ramírez y cols., 2002 y 2004) relacionado con la resistencia a telurito (Acosta y cols., 2005); en la hebra contraria a *p14.3* se encuentra *ahpC*, codificante para una proteína de la familia AhpC-TSA, relacionada con las hidroxiperóxido reductasas y antioxidantes tiol-específicos. Río arriba de *ahpC* se encuentran dos ORFs productos aparentemente duplicados de *modA1* y *doxDA1*, denominados *modA2* y *doxDA2* (no mostrados en la Figura 2). Finalmente *p28* se encuentra río abajo de un grupo genético

relacionado con el ensamblaje de centros hierro-azufre (*hesB*, *nifU*, *nifS*, *nifW*), *leuA*, *cysE* e *hyp5* codifican para una isopropilmalato/homocitrato/citramalato sintasa, una serina acetiltransferasa y para una proteína hipotética, respectivamente (Acosta y cols., 2005).

I.7 Genómica funcional

La determinación de los niveles de RNA mensajero (mRNA) para un gen en dos condiciones determinadas puede dar cuenta de la relación de dicho gen con el proceso estudiado (Butte, 2002). Para la detección y cuantificación de mRNA se han desarrollado numerosas técnicas, entre las que se encuentran Northern Blots, RT-PCR competitivo semi-cuantitativo, PCR cuantitativo en tiempo real, etc. La creciente disponibilidad de secuencias de genomas completos han permitido cuantificar variaciones en los niveles de mRNA para cada ORF presente en un genoma bajo diferentes condiciones utilizando sistemas de microarreglos de DNA (Butte, 2002), siendo utilizados exitosamente en sistemas bacterianos como *E. coli* (Richmond y cols., 1999; Tao y cols., 1999; Arfin y cols., 2000). Es de especial interés la posibilidad de analizar el perfil de expresión de un subgrupo de genes (de una vía metabólica particular o de marcadores de diversas patologías o condiciones fisiológicas) utilizando sistemas de macroarreglos de DNA en membranas de nylon (Schlaak y cols., 2002; Weber y Jung, 2002; Haveman y cols., 2003). Dada la relativa sencillez en el análisis de los resultados, su adaptabilidad a las necesidades de cada laboratorio y la economía en el montaje, esta técnica es una buena elección para estudios de expresión génica a escala no global.

I.7.1 Genómica funcional en microorganismos biolixiviantes

Recientemente se completó y anotó la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (J. Craig Venter Institute, <http://www.tigr.org>), siendo junto con el arqueón *Metallosphaera sedula* DSM 5348 los únicos microorganismos relacionados con procesos

de biolixiviación cuyo genoma se encuentra disponible. En base a la secuencia de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, recientemente se diseñó un microarreglo de DNA con el cual se analizaron los patrones de expresión de genes relacionados con el metabolismo energético y de las vías de utilización de carbono en este microorganismo al utilizar Fe^{2+} o S^0 como fuente de energía (Appia-Ayme y cols., 2006; Quatrini y cols., 2006). Una aproximación para estudios de expresión global en un microorganismo biolixivante no secuenciado fue la utilizada por Parro y Moreno-Paz (2003). Los autores desarrollaron un microarreglo de DNA construido con una genoteca al azar del *L. ferrooxidans* L3.2, el cual les permitió identificar y secuenciar los clones de la genoteca que contenían fragmentos con secuencias inducidas durante la carencia de nitrógeno, identificando así operones codificantes para la Fe-Mo Nitrogenasa (*nifHDKENX*), para proteínas encargadas del ensamblaje de centros hierro-azufre (*nifSU-hesB-hscBA-fdx*), transporte de compuestos nitrogenados (*amtB* y *modA*) y para proteínas regulatorias (*ntrC*, *nifA* y *glnB*) (Parro y Moreno-Paz, 2003).

Dado el desconocimiento de las funciones y sustratos fisiológicos de las proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* y el papel central que tendría el metabolismo del tiosulfato durante la biolixiviación de sulfuros metálicos oxidados por la “vía del tiosulfato”, se propone para esta tesis el construir un sistema de macroarreglos de DNA para el estudio a nivel transcripcional de los ORFs codificantes para proteína tipo rodanasa encontrados en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

I.8 Hipótesis de trabajo

Los genes codificantes para proteínas tipo rodanasa se expresan diferencialmente en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 cuando crece utilizando azufre elemental, tiosulfato o ión ferroso como fuente de energía.

I.9.1 Objetivo general

Determinar los niveles relativos de mRNA de los ORFs codificantes para proteínas tipo rodanasa y sus contextos en cultivos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en ión ferroso, azufre elemental o tiosulfato como sustratos oxidables utilizando un sistema de macroarreglos de DNA.

I.9.2 Objetivos específicos

1. Análisis bioinformático de los ORFs codificantes para proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y sus contextos génicos y diseño de partidores para amplificar fragmentos de los ORFs seleccionados.
2. Construir un sistema de macroarreglos de DNA en membranas de nylon y determinar las condiciones de marcaje de las sondas de cDNA e hibridización de las membranas.
3. Determinar la variabilidad y límite de detección del sistema de macroarreglos de DNA.
4. Determinar los niveles relativos de transcrito para los genes seleccionados durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en diferentes sustratos oxidables.

II. Materiales y Métodos

II.1 Materiales

II.1.1 Reactivos químicos

Azufre elemental en polvo, de Acros Organics; kit de enriquecimiento de mRNA bacteriano MICROBExpress™, de Ambion; columnas de filtración en geles microspin S-200 HR, de Amersham; dodecil sulfato de sodio (SDS), tris(hidroximetil) aminometano (Tris), agarosa, película protectora "Screen Guard", de Bio Rad; HEPES libre de ácido, de Calbiochem; Kit de purificación de RNA, de E.Z.N.A.; Tiosulfato de sodio pentahidratado, de Fischer Scientific; DNaseI libre de RNasa (126 U/μL), RNaseH (10 U/μL), Marcadores de peso molecular de DNA 1Kb y 1Kb Plus, de Invitrogen; sulfato de magnesio, sulfato de amonio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, etanol, extracto de levadura, fosfato ácido de potasio, fosfato monobásico de potasio, isopropanol, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, acetato de sodio, ácido acético glacial, de Merck; Kit extracción DNA desde geles de agarosa Ultrafree-DA®, Membrana de nylon Immobilon-NY+, de Millipore; [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol; 10 mCi/mL), de Perkin Elmer; Kit extracción DNA genómico Wizard®, cloruro de magnesio (25 mM) Amortiguador Termofílico *Taq* 5X, *Taq* DNA Polimerasa (5 U/μL), dNTPs (100 mM cada uno), transcriptasas reversas ImPromII (100 μL) y M-MLV (200 U/μL), amortiguador de carga para electroforesis de DNA Blue/Orange (6X), inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin® (40 U/μL), oligonucleótidos al azar (20 μg), Transcriptasa reversa AMV (25 U/μL), de Promega; Ácido etilendiamino tetracético (EDTA), solución de fenol saturado ácido pH 4,3, Di-etil pirocarbonato (DEPC), de Sigma-Aldrich; solución de limpieza "multi blot replicator" (VP110), de V&P Scientific; Agua libre de nucleasas, DNA de esperma de

salmón denaturado y fragmentado (10 mg/mL), solución de Dendharts 50X, fenol ácido/cloroformo, cloroformo, de Winkler.

II.1.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

La cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 se creció aeróbicamente con agitación a 30 °C en medio 9K modificado (en g/L: 0,1 (NH₄)₂SO₄; 0,4 MgSO₄·7H₂O; 0,04 K₂HPO₄·3H₂O), suplementado con 33,3 g/L FeSO₄·7H₂O o 50 g/L de azufre elemental en perlas. La bacteria se creció en tiosulfato en el medio DSMZ 71 (en g/L: 3,0 (NH₄)₂SO₄; 0,5 MgSO₄·7H₂O; 0,25 CaCl₂·2H₂O; 3,0 KH₂PO₄) suplementado con 5,0 g/L de Na₂S₂O₃·5H₂O.

II.2 Métodos

II.2.1.1 Análisis bioinformático de la secuencia no anotada de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Los ORFs analizados en esta tesis se escogieron durante el análisis de las proteínas tipo rodanasa presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y de sus respectivos contextos génicos identificados previamente en nuestro laboratorio (Ramírez y cols., 2002; Acosta y cols., 2005) utilizando la secuencia del genoma no terminado disponible de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (J. Craig Venter institute, <http://www.tigr.org>) mediante los algoritmos de tBLASTn en los sitios del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) y/o del J. Craig Venter Institute (<http://tigrblast.tigr.org/ufmg/>). Los ORFs pertenecientes al contexto génico de cada proteína tipo rodanasa se determinaron y visualizaron con el programa ARTEMIS versión 7 (The Sanger Centre, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>), utilizando un tamaño mínimo de ORF de 100 pb, siendo identificados por su similitud con

proteínas encontradas en las bases de datos utilizando BLASTp en los sitios del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y/o de ExPASy (<http://au.expasy.org/tools/blast/>). El peso molecular y el punto isoeléctrico teórico se obtuvieron con la herramienta "Compute pI/Mw" de ExPASy tools (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html). La búsqueda de péptidos señal Sec y TAT se realizó con las herramientas SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y TatP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP-1.0/>), respectivamente. La presencia de módulos y dominios funcionales se buscaron en PROSITE, de ExPASy (<http://bo.expasy.org/prosite/>) y CDD. Los posibles dominios de transmembrana fueron predichos con la herramienta TMPred del EMBL (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). Los promotores se identificaron con la herramienta de predicción de promotores por redes neuronales del Berkeley Drosophila Genome Project (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

II.2.1.2 Actualización: secuencia anotada de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Durante la escritura de esta tesis se terminó y se hizo pública la anotación de la secuencia del genoma completo de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 por el J. Craig Venter Institute (http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/GenomePage.cgi?org_search=&org=gtf). Sin embargo, en esta tesis se mantuvo la anotación manual y nomenclatura utilizada previamente en Acosta y cols. (2005). En la Tabla 2 (ver en resultados) se muestran el "Locus Name" correspondientes a la anotación del J. Craig Venter Institute para cada ORF analizado en esta tesis.

II.2.2 Extracción del DNA genómico de *A. ferrooxidans*

El DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se obtuvo a partir de células crecidas en tiosulfato hasta fase de crecimiento exponencial tardía utilizando el kit de extracción de DNA genómico Wizard® (Promega). Las células se colectaron por centrifugación 5223 x g por 20 min y se lavaron tres veces con el medio de sales 9K. Una vez lavadas las células se procedió con la extracción de DNA genómico según las instrucciones del fabricante, el cual se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas. La cuantificación del DNA genómico se realizó por su absorbancia a 260 nm de una dilución de DNA 1/800. La concentración de DNA se calculó usando la relación $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg DNA/mL}$.

II.2.3 Extracción del RNA de *A. ferrooxidans*

II.2.3.1 Extracción del RNA total de *A. ferrooxidans*

El RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se extrajo de células en la fase de crecimiento exponencial tardía ($1 - 2 \times 10^8$ cél/mL) mediante una extracción con fenol caliente, esencialmente según lo descrito por Guiliani y cols. (1997). Las células se colectaron por centrifugación a 5223 x g por 20 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con el medio de sales 9K (o dos veces con agua acidificada con H₂SO₄ a pH 1,7 y una vez con 10 mM citrato de sodio pH 7,0 para las células crecidas en ión ferroso). El RNA se obtuvo a partir de fracciones de 10 mg (peso húmedo) de pellet de células resuspendidas en 300 µL de solución de lisis (0,02 M acetato de sodio pH 5,5; 0,5 % SDS; 1 mM EDTA) con 600 µL de fenol saturado ácido a 60 °C, incubando por 7 min a 60°C y agitando por inversión cada 45 s. La fase acuosa se re-extrajo con fenol ácido por 7 min a 60 °C y luego 1 o 2 veces con fenol ácido/cloroformo y 2 veces con cloroformo. El RNA obtenido se precipitó con 1/10

volumen de 3 M acetato de sodio pH 5,2 y 2 – 3 volúmenes de etanol al 100% a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. El RNA se precipitó por centrifugación a $13800 \times g$ por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavó 2 veces con etanol al 70% y resuspendió en agua libre de nucleasas. El RNA obtenido se trató con DNasaI libre de RNasa en una reacción con un volumen final de $200\text{ }\mu\text{L}$ conteniendo: acetato de sodio, 150 mM pH 5,2 y MgCl_2 , 5 mM por 30 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se agregó 5 mM EDTA y la enzima se inactivó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min, se extrajo con fenol/cloroformo ácido y cloroformo, se precipitó el RNA y se resuspendió en $15\text{ }\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. El RNA se cuantificó por la absorbancia a 260 nm de una dilución $1/500$, se determinó su pureza por la relación de absorbancias a $260/280\text{ nm}$ y su estado físico se revisó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La concentración de RNA se calculó utilizando la relación $1\text{ OD}_{260} = 40\text{ }\mu\text{g RNA/mL}$.

II.2.3.2 Protocolos de enriquecimiento del RNA total en mRNA

Para enriquecer las muestras de RNA total de *A. ferrooxidans* en RNA mensajeros se utilizó el kit comercial MICROBExpress™ y un protocolo adaptado de Rosenow y cols. (2003). Para el protocolo de Rosenow, $25\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total se hibridizaron con una mezcla de oligonucleótidos complementarios a zonas de los RNA 16S y 23S (anexo 1; $1,75\text{ }\mu\text{M}$ cada uno) en un volumen final de $40\text{ }\mu\text{L}$ a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, luego fueron puestos en hielo. Este RNA fue transcrito reversamente a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 25 min y a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min en una mezcla que contenía 1X amortiguador M-MLV; $0,5\text{ mM}$ dNTPs; 80 U RNAsin, y 500 U M-MLV-RT. La mezcla se incubó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min y luego la enzima se inactivó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Se agregaron 80 U más de RNAsin y el RNA de los híbridos RNA/cDNA sintetizados durante la transcripción reversa se digirieron con 40 U de RNasaH a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 25 min. Los cDNAs sintetizados se digirieron agregando

20 U de DNasaI e incubando por 20 min a 37 °C, deteniendo la reacción con 10 mM EDTA. El RNA enriquecido se purificó utilizando el kit de purificación de RNA E.Z.N.A.® según las instrucciones del fabricante.

II.2.4 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis de DNA y RNA se realizó en geles de agarosa al 1% p/v en amortiguador TAE 0,5X (TAE 1X, 40 mM Tris-Acetato pH 8,0; 1 mM EDTA) en condiciones no desnaturantes. En los geles se cargaron 1 o 2 µL de DNA o 5 µL de los productos de PCR en buffer de carga 1X (40% p/v sucrosa; 0,25% p/v azul de bromofenol). 1 µL de RNA se cargó en una proporción 1:1 con amortiguador de carga para electroforesis de DNA Blue/Orange. Los geles se corrieron a 50 o 100 V hasta que el frente de migración se encontrara a ~2 cm del final del gel.

II.2.5 Construcción del macroarreglo de DNA

II.2.5.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR fragmentos de cada ORF a analizar en el macroarreglo de DNA (Tabla N°2) y para los genes utilizados como controles internos de expresión (rDNA 16S, *dnaK*, *GroEL*, *rus*) y para el DNA heterólogo utilizado como control de marcaje e hibridización (*exp-1* de *Prunus persica*). Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de la secuencia de los ORFs identificados considerando, en general, como codón de inicio la primera metionina codificada en el extremo 5' del ORF. En casos excepcionales donde se observó una sobreposición con el ORF precedente o por la presencia clara de promotores y/o secuencias de unión a ribosoma se consideró como codón de inicio la metionina más próxima a éstas secuencias. Para cada ORF se diseñó un partidor directo (oligonucleótidos "N") y uno

reverso (oligonucleótidos “R” o “C”) para amplificar fragmentos de aproximadamente 600 pb o el ORF completo cuando su tamaño es menor a este valor. Los parámetros generales considerados en el diseño fueron un largo de 18 pb, un contenido de G+C de 50 a 55 % y el extremo 3' terminado en G o C. Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se muestran en la tabla del anexo 1.

II.2.5.2 Obtención de los amplicones sembrados en las membranas de nylon

Para disminuir la contaminación con el DNA genómico presente en la reacción de PCR en los amplicones sembrados en la membrana, se realizaron dos rondas de amplificación por PCR y se purificaron los amplicones a partir de la banda obtenida luego de una electroforesis en un gel de agarosa. En la primera ronda de PCR se amplificó a partir del DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (100 ng DNA genómico; 100 μ M dNTPs; 5 % v/v DMSO; 250 ng cada oligonucleótido; 2,5 mM MgCl₂; 1X amortiguador termofilico *Taq* y 1 U *Taq* DNA Polimerasa) en una reacción en un volumen final de 50 μ L. Se utilizó un protocolo de “Hot-Start” PCR consistente en una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, treinta ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, “annealing” por 30 s a “T” °C y extensión por 45 s a 72 °C, seguidos de una extensión final de 3 min a 72 °C. La temperatura de “annealing” (T) para la primera ronda de PCR fue en general de 50 °C, en algunos casos se subió a 52 o 54 °C para eliminar productos de amplificación que no correspondieran a los 600 pb esperados. La segunda ronda se realizó en similares condiciones, salvo que el DNA genómico se reemplazó por 0,5 μ L de la primera reacción de PCR y la temperatura de “annealing” se aumentó a T + 2 °C. Todos los amplicones se revisaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en 0,5X TAE. Los amplicones obtenidos de la segunda ronda de PCR se purificaron a partir de la banda obtenida luego de la electroforesis en geles de agarosa al 1% en 0,5X

TAE utilizando el kit UltraFree-DA, según las instrucciones del fabricante, se cuantificaron por su absorbancia a 260 nm y se diluyeron a 5 ng/ μ L en 40 % v/v DMSO; 100 μ L de cada dilución se colocaron en una placa para cultivos celulares de 96 pocillos para su posterior siembra. En la placa se incluyeron diluciones a 5 ng/ μ L en 40% v/v DMSO de un fragmento del gen de la expansina-1 de *Prunus persica* (*exp-1*; donado por Verónica Cambiazo, Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA) y un fragmento del gen codificante para la isoforma fetal de la proteína tau de *Homo sapiens* (*tau*; donado por Ricardo Maccioni, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de ciencias, Universidad de Chile) y DMSO al 40% v/v.

II.2.5.3 Sembrado las membranas de nylon

El DNA se sembró manualmente desde la placa de ELISA utilizando el "Multi Blot Replicator" en membranas de nylon Immobilon-Ny+. Cada dilución se sembró 3 veces (~ 1,5 ng de DNA por mancha) y en cuadruplicado. Las membranas se secaron al aire y luego se trataron con solución de desnaturación (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl) por 7 min sin agitación, luego de lo cual se incubaron 2 veces por 3 min en solución de neutralización (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 1,5 M NaCl; 1 mM EDTA) con agitación y se secaron al aire. Finalmente, el DNA fue entrecruzado a la membrana por irradiación con luz UV (254 nm) a 0,12 J/cm² en un Hibrilinker HL-200 (UVP Laboratory Products).

II.2.6 Marcaje de las sondas de cDNA

La sonda marcada se obtuvo por incorporación de [α -³²P]dCTP en el cDNA sintetizado a partir de 10 μ g de RNA total utilizando oligonucleótidos reversos específicos para cada fragmento impreso en la membrana (oligos R o C tabla anexo 1) utilizando la

transcriptasa reversa ImPromII en un volumen final de 50 μ L (10 μ g RNA total; 1,5 ng RNA *exp-1*; 10 pmol de cada oligonucleótido específico; 800 μ M dNTPs sin dCTP; 3,5 mM MgCl₂; 50 μ Ci [α -³²P]dCTP o [α -³³P]dCTP; 40 U RNAsin.; 2 μ L ImProm II) por 2 h a 42 °C. La mezcla de RNA total y de *exp-1* se hibridizó con la mezcla de oligonucleótidos previo a la transcripción reversa a 70 °C por 5 min. Luego de la reacción, la enzima se inactivó a 65 °C por 15 min y el RNA se degradó por tratamiento con 0,2 M NaOH a 37 °C por 15 min, siendo neutralizado con 0,25 M amortiguador HEPES. Las sondas de cDNA marcado se purificaron utilizando las columnas S-200 HR (Amersham) según las instrucciones del fabricante. La radioactividad incorporada en 1 μ L se cuantificó en un contador de centelleo. Al utilizar oligonucleótidos al azar en la reacción de marcaje se aplicaron 25 μ g de RNA total, se reemplazó la mezcla de oligonucleótidos específicos por 40 ng de oligonucleótidos hexaméricos al azar y se utilizó la AMV RT en vez de ImPromII, según lo descrito en Arfin y cols. (2000). El RNA de *exp-1* transcrito in-vitro fue gentilmente donado por Verónica Cambiazo, Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica, INTA.

II.2.7 Hibridización, lavado y exposición de las membranas

Por cada sonda obtenida se hibridizaron dos membranas. Estas fueron previamente humedecidas en 2X SSPE (10X SSPE: 1,8 M NaCl; 100 mM fosfato de sodio pH 7,7; 10 mM EDTA) por 5 min a temperatura ambiente. Luego se pre-hibridizaron en 7,5 mL de solución de hibridación (5X SSPE; 2% p/v SDS; 1X solución de Dendharts; 100 μ g/mL DNA de esperma de salmón) a 65 °C por 2 – 4 h. Las membranas se hibridizaron en 5 mL solución de hibridación “fresca” a 65 °C con la sonda de cDNA obtenida ($>1,5 \times 10^6$ cpm/mL solución de hibridación), desnaturalada en agua hirviendo por 5 min, durante toda la noche. Las membranas se lavaron con 25 mL de solución de

lavado (0,5X SSPE; 0,2% p/v SDS) 2 veces a temperatura ambiente por 5 min seguidos por 2 lavados a 65 °C por 15 min. Las membranas se envolvieron en película plástica ("saram film") y se expusieron en una pantalla K-Screen (Kodak) por 1 – 2 días y se escanearon en un PhosphorImager (Molecular Imager FX system, Bio-Rad) utilizando el programa Quantity One 1.0 (Bio-Rad). La cuantificación y análisis de las manchas obtenidas se realizó con el programa VersArray (Bio-Rad) y Excel (Microsoft Office).

II.2.8 Normalización y tratamiento de los datos de intensidad de las membranas con los macroarreglos de DNA

Las intensidades netas (IN), correspondientes a la intensidad cruda promedio de la señal (IC) menos el valor de su fondo local promedio (IFX), obtenidas para cada mancha se normalizaron por la intensidad neta promedio de las 8 manchas de *exp-1* (RNA exógeno agregado a la reacción de marcaje) presentes en cada membrana, el que fue utilizado como control de marcaje y de hibridación, obteniendo la intensidad neta relativa (INR). La relación señal ruido (Qsr) se determinó a partir de la IC y la IFX según la relación $Qsr = [IC/(IC + IFX)]$ (Wang y cols., 2001). Las INR con una $Qsr > 0,51$ de las diferentes réplicas para cada mancha en cada condición se promediaron obteniendo la intensidad neta relativa promedio (INRX). Para cada condición las INRX se calcularon con al menos 3 datos de intensidad para cada mancha.

III. Resultados

III.1 Selección de los ORF de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 analizados en esta tesis y diseño de oligonucleótidos

En esta tesis se analizaron los niveles de los transcritos presentes en *A. ferrooxidans* para el grupo de ORFs codificantes para las proteínas tipo rodanasas identificados en el genoma de la cepa ATCC 23270 y de algunos ORFs encontrados en sus contextos génicos detallados en la Tabla 2. Los ORFs analizados pertenecientes al contexto genético de cada rodanasa se escogieron de acuerdo a la posibilidad que formaran parte de una misma unidad transcripcional con ésta, lo cual se evaluó según los siguientes criterios: la hebra de DNA en que se encontraraban los ORFs, distancia adecuada entre el codón de inicio de cada ORF y el codón de término del precedente, identificación de una posible secuencia de unión a ribosomas y la presencia de al menos una secuencia promotora predicha río arriba del primer ORF considerado (resultados no mostrados). Sólo los ORFs correspondientes a *p15* y *p28* se sembraron sin los ORFs pertenecientes a un posible operón. Los oligonucleótidos específicos para amplificar cada uno de los ORF analizados se diseñaron manualmente a partir de las secuencias nucleotódicas según se detalla en Materiales y Métodos y se muestran en la Tabla del anexo I.

III.2 Extracción del DNA genómico de *A. ferrooxidans*

Se extrajo el DNA genómico a partir de 100 mL de un cultivo de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en ión ferroso o tiosulfato hasta 1×10^8 cél/mL (fase de crecimiento exponencial tardía) utilizando el kit de purificación de DNA genómico Wizard® (Promega). El estado físico del DNA se chequeó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Fig. 3), se cuantificó por su absorbancia a 260 nm y se alicuotó en diluciones a 40 ng/ μ L y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Tabla 2. ORFs correspondientes a proteínas tipo rodanasa y de sus contextos génicos sembrados en el macroarreglo de DNA.

ORF	Dominios Conservados	MW ^a	pI ^b	PS ^c	DTM ^d	Locus Name ^e
P11						
<i>moaA</i>	COG2896, MoaA, Enzima de la síntesis del cofactor de molibdeno	37,70	8,79	NO	0	AFE_0543
<i>p11</i>	cd00158, RHOD, Dominio homólogo a Rodanasa	11,70	9,10	NO	0	AFE_0544
<i>sirA</i>	COG0425, SirA, Proteína redox predicha, regulador de la formación de enlaces disulfuro	7,50	5,28	NO	0	AFE_0545
<i>hyp1</i>	COG2210, Proteína conservada no caracterizada	17,00	4,58	SI	1	AFE_0546
P14						
<i>hyp2</i>	COG5622, Proteína requerida para la unión a la célula hospedera	16,50	6,05	NO	0	AFE_2510
<i>p14</i>	cd01447, Polisulfuro-ST, Polisulfuro-azufre transferasa	14,50	4,84	NO	0	AFE_2509
P15						
<i>p15</i>	cd01522, RHOD_1, Superfamilia Dominio homólogo a Rodanasa, subgrupo 1	15,20	6,18	NO	0	AFE_2875
P16						
<i>oep</i>	pfam02321, OEP, Proteína de flujo de membrana externa	50,80	9,29	SI	1	AFE_0735
<i>acrA</i>	COG0845, AcrA, Proteína de fusión de membrana	37,70	9,04	SI	1	AFE_0736
<i>acrB</i>	pfam00873, ACR_tran, Familia AcrB/AcrD/AcrF	118,6	6,96	SI	1	AFE_0737
<i>hyp3</i>	No se detectaron dominios conservados	6,70	5,93	SI	1	AFE_0738
<i>p16</i>	cd00158, RHOD, Dominio homólogo a Rodanasa	15,60	9,26	NO	1	AFE_0739
<i>grx</i>	pfam00462, Glutarredoxina	10,20	7,86	NO	0	AFE_0740
<i>thi</i>	pfam00085, Tiorredoxina	15,90	9,24	SI	0	AFE_0741
P16.2						
<i>P16.2</i>	cd01522, RHOD_1, Superfamilia Dominio homólogo a Rodanasa, subgrupo 1	16,30	6,49	NO	0	NA ^f
P14.3/P21						
<i>modA2</i>	COG0725, Componente periplásmico de sistema transportador de sulfato tipo ABC	36,60	8,73	SI	2	AFE_2975
<i>doxDA2</i>	pfam04173, Quinol oxidasa terminal, subunidad, predicha (tipo doxD)	40,30	9,75	NO	5	AFE_2976
<i>ahpC</i>	pfam00578, AhpC-TSA, Familia AhpC/TSA	18,70	8,97	NO	1	AFE_2977
<i>P14.3</i>	cd00158, RHOD, Dominio homólogo a Rodanasa	14,30	4,75	NO	0	AFE_2978
<i>p21</i>	cd00158, RHOD, Dominio homólogo a Rodanasa	23,80	9,36	SI	1	AFE_2979
<i>doxDA1</i>	pfam04173, DoxD, Familia tipo DoxD	38,90	9,32	SI	5	AFE_2980
<i>modA1</i>	COG0725, ModA, Componente periplásmico sistema de transporte de molibdato tipo ABC	36,70	9,10	SI	1	AFE_2981
<i>hyp4</i>	No se detectaron dominios conservados	31,00	6,36	NO	1 o 2	AFE_2982
<i>tehA</i>	pfam03595, C4dic_mal_tran, Proteína transportadora de compuestos C4-dicarboxilato /proteína transportadora de ácido málico	44,70	6,54	NO	6 o 9	AFE_2983
P28						
<i>p28</i>	cd01444, GlpE-ST, Rhod, Superfamilia Dominio homólogo a Rodanasa; cd00204, ANK, repetidos de ankirina.	28,60	5,80	NO	0	AFE_1582

^a MW, Peso molecular predicho, en KDa

^b pI, Punto isoeléctrico predicho

^c PS, péptido señal

^d DTM, Dominios de transmembrana

^e Locus Name asignado en la anotación del J. Craig Venter Institute

^f NA, No Anotado por el J. Craig Venter Institute

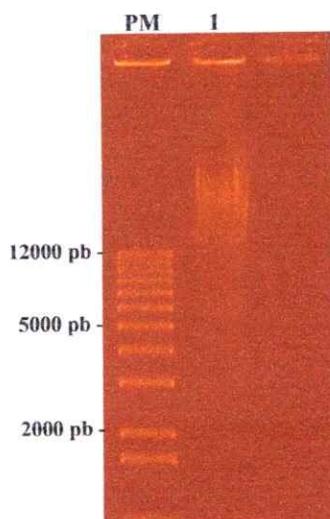


Figura 3. Análisis del DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mediante electroforesis en geles de agarosa. Carriles: PM, Peso Molecular 1 Kb Plus; 1, DNA genómico *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

III.3 Extracción de RNA total de *A. ferrooxidans*

El RNA total se extrajo rutinariamente utilizando fenol ácido en caliente siguiendo un método adaptado de Guiliani y cols. (1997) a partir de 10 mg de peso húmedo de pellet de células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, obteniéndose entre 0,5 y 1,0 μg RNA/mg de peso húmedo de pellet. El estado físico del RNA se revisó por electroforesis en geles de agarosa en condiciones no desnaturalantes y se cuantificó y se determinó su pureza por la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm como se ejemplifica en la Figura 4. Los parámetros de calidad utilizados fue el observar las bandas correspondientes a los rRNA de 23S, 16S y 5S en el gel de agarosa y tener una relación de $\text{Abs } 260/280 \geq 1,6$. Los RNA obtenidos de células crecidas en ión ferroso no difieren en concentración o calidad de los mostrados en la Figura 4.

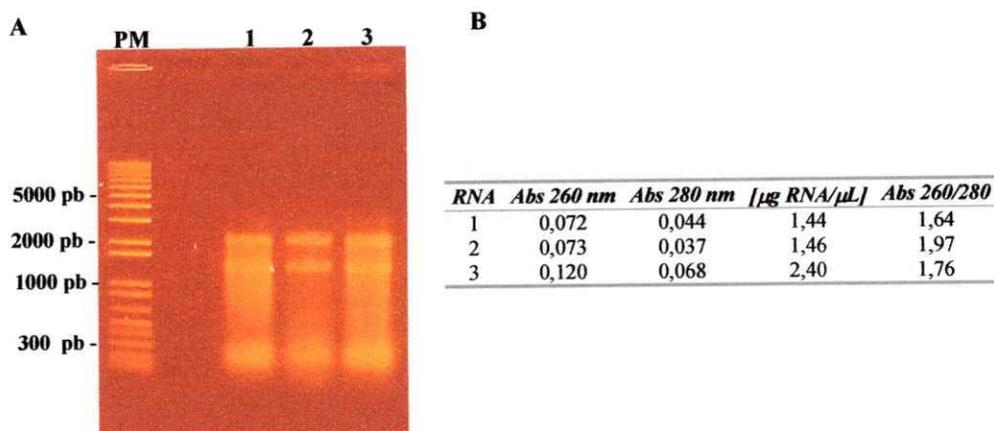


Figura 4. Análisis del RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 0,5X de muestras de RNA total de *A. ferrooxidans* luego del tratamiento con DNAsaI. Carriles: PM, Peso Molecular 1 Kb Plus; 1, RNA total obtenido de células crecidas en tiosulfato; 2 y 3, RNA total obtenido de células crecidas en azufre elemental. (B) Cuantificación y determinación de la pureza por determinación de las absorbancias a 260 y 280 nm de diluciones 1/500 de los RNA mostrados en (A).

III.4 Construcción de los macroarreglos de DNA

III.4.1 Amplificación de los fragmentos para sembrar en las membranas de nylon

Mediante PCR se amplificaron fragmentos con tamaños desde 230 a 600 pb correspondientes a los ORFs de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mostrados en la tabla 3 y para los correspondientes controles negativos (*tau*), positivos (*rus*, *dnaK* y *groEL*) y de marcaje e hibridación (*exp-1*). Se utilizaron las correspondientes parejas de oligonucleótidos indicados en la tabla del anexo 1. Todos los fragmentos se revisaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% previo a su purificación. En la Figura 5 se muestra un resultado representativo de una electroforesis en gel de agarosa de fragmentos amplificados para la siembra en las membranas de nylon. En el caso de los fragmentos que no dieron amplificación positiva o específica con las condiciones estándares utilizadas (ver por ejemplo carriles 6 y 8 de la Figura 5) las condiciones particulares de temperatura de apareamiento y tiempo de extensión fueron optimizadas

hasta obtener una sola banda del tamaño esperado. Todos los fragmentos se re-amplificaron por PCR y purificaron desde los geles de agarosa.

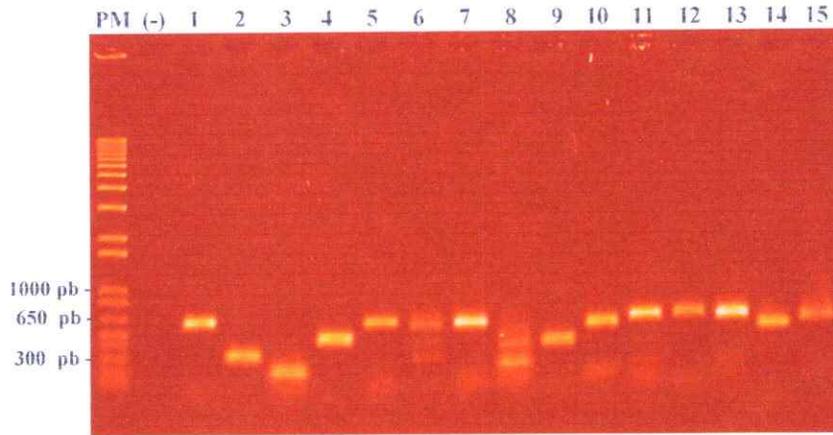


Figura 5. Resultado representativo de la amplificación de fragmentos de DNA para la siembra en el macroarreglo de DNA. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en 0,5X TAE de los fragmentos de DNA amplificados por PCR. Carriles: PM, marcador de peso molecular 1 Kb Plus; (-), control negativo (sin DNA templado) de PCR; 1 – 15, fragmentos amplificados por PCR.

II.4.2 Sembrado de las membranas de nylon

Para la siembra de las membranas amplicones se cuantificaron por su absorbancia a 260 nm, se diluyeron a 5 ng/ μ L en 40 % DMSO siendo dispensados en alícuotas de 100 μ L para cada fragmento en una placa para cultivo celular de 96 pocillos. A partir de esta placa, se sembró 3 veces 0,1 μ L de cada amplicon (~1,5 ng de DNA total) en cuadruplicado, obteniendo así las membranas con los macroarreglos de DNA. En los experimentos de esta tesis se utilizaron placas con diferentes grupos de genes y arreglos. La estandarización de las condiciones de marcaje e hibridación se realizó con 3 placas diferentes, denominadas MV1, MV2 y MV3 y se realizó en conjunto con Mario Vera (Mario Vera, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). Las placas utilizadas contenían amplicones relacionados con las proteínas tipo rodanasas,

relacionados con el metabolismo del fosfato y para un fragmento del rDNA de 16S de *A. ferrooxidans*; la placa MV3 no contenía el fragmento correspondiente al rDNA de 16S. La placa con los amplicones correspondientes a los ORFs analizados en esta tesis se denominó placa "5S". El arreglo de los 93 amplicones presentes en la placa 5S se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Disposición de los amplicones en la placa "5S"

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		<i>cysQ</i>	<i>hypA</i>	<i>wcbC</i>	<i>wcbB</i>	<i>GMD</i>	<i>SMT-1</i>	<i>MT-1</i>	<i>dnaK</i>	<i>groEL</i>	<i>rus</i>	
B	<i>trbB</i>	<i>wcbR</i>	<i>wcbR</i>	<i>wcbT</i>	<i>wcbA</i>	<i>wcbO</i>	<i>wcbP</i>	<i>wcbQ</i>	<i>afeI</i>	<i>afeR</i>	<i>tau</i>	<i>hds</i>
C	<i>trbB</i>	<i>wcbD</i>	<i>wzm</i>	<i>ctrD</i>	<i>SHT</i>	<i>hypI</i>	<i>wcbH</i>	<i>hypJ</i>	<i>ubiK</i>	<i>orfB</i>	<i>H2O</i>	<i>npo</i>
D	<i>modA</i>	<i>fehA</i>	<i>hypB</i>	<i>modA-1</i>	<i>daxDA-1</i>	<i>p21</i>	<i>p14.3</i>	<i>modA-2</i>	<i>daxDA-2</i>	<i>ahpC</i>	<i>exp-1</i>	<i>cydA</i>
E	<i>p20</i>	<i>tolC</i>	<i>acrA</i>	<i>acrB</i>	<i>hyp3</i>	<i>p16</i>	<i>grx</i>	<i>ihf</i>	<i>amiC</i>	<i>fehA-1</i>	<i>fehD-1</i>	<i>p15</i>
F	<i>exp-1</i>	<i>modA</i>	<i>p11</i>	<i>sirA</i>	<i>hypD</i>	<i>hdrC-1</i>	<i>hdrB-1</i>	<i>hdrA-1</i>	<i>hypE</i>	<i>fehA-2</i>	<i>fehD-2</i>	<i>p16.2</i>
G	<i>cyoB</i>	<i>hyaS</i>	<i>isp1</i>	<i>isp2</i>	<i>hyaL</i>	<i>hdrC-2</i>	<i>hdrB-2</i>	<i>gcsH-1</i>	<i>hypF</i>	<i>hyp2</i>	<i>p14</i>	<i>p28</i>
H	<i>shyB</i>	<i>shyD</i>	<i>shyA</i>	<i>VHTD</i>	<i>hypG</i>	<i>psrA</i>	<i>psrB</i>	<i>psrC</i>	<i>psrC</i>	<i>psrD</i>	<i>hypH</i>	

III.5 Estandarización de las condiciones de marcaje de las sondas de cDNA e hibridización de las membranas

III.5.1 Comparación del marcaje utilizando oligonucleótidos al azar y específicos

La primera variable que se estandarizó para la obtención de las sondas marcadas, fue el utilizar oligonucleótidos ORF-específicos sembrados en cada membrana u oligonucleótidos al azar como partidores para la incorporación de [α -³³P]dCTP en el cDNA. En este experimento se utilizó la transcriptasa reversa AMV. Al hibridizar las membranas sembradas a partir de la placa MV1 con las sondas obtenidas con oligonucleótidos al azar sólo se obtuvieron señales para los genes *rus*, *dnaK*, *groEL*, rDNA 16S y solo algunos otros ORFs sembrados, indicando que la actividad específica de los cDNAs sintetizados a partir de mRNA para la mayoría de los ORF es muy baja como para ser detectada. Al utilizar una sonda obtenida en iguales condiciones utilizando oligonucleótidos específicos se obtienen señales para una mayor cantidad de ORFs (Figura 6A).

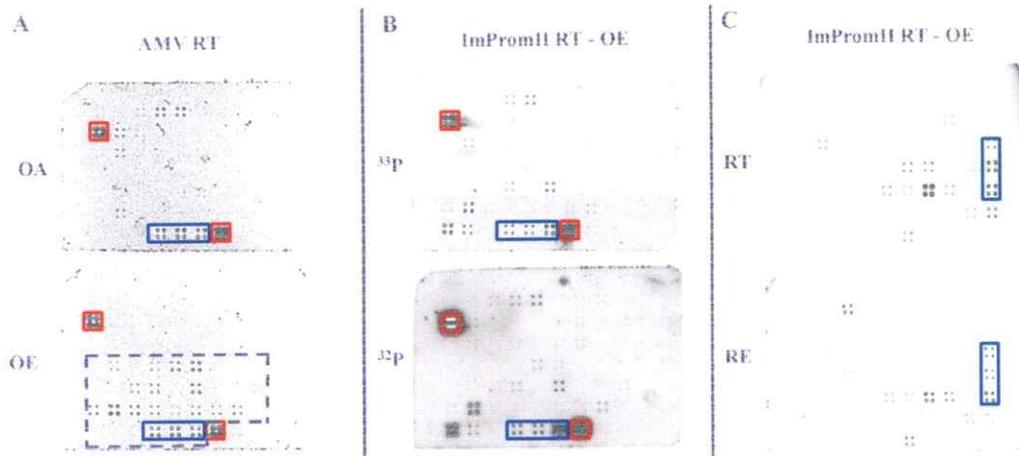


Figura 6. Determinación de las condiciones óptimas para el marcaje del RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. **(A)** Hibridización de membranas MV1 con una sonda obtenida de 25 μ g de RNA total marcadas por incorporación de [α -³³P]dCTP utilizando oligonucleótidos al azar (OA) u oligonucleótidos específicos para los ORFs sembrados en el rectángulo indicado en la membrana (OE). **(B)** Hibridización de membranas MV2 con una sonda obtenida de 25 μ g de RNA total por incorporación de [α -³³P]dCTP (³³P) o [α -³²P]dCTP (³²P) utilizando oligonucleótidos específicos para todos los ORFs sembrados en la membrana. **(C)** Hibridización de membranas MV3 con sonda obtenida a partir de 20 μ g de RNA total (RT) o enriquecido en mRNA (RE) utilizando el protocolo adaptado de Rosenow y cols. (2003) por incorporación de [α -³²P]dCTP utilizando oligos específicos y la enzima ImPromII RT. En (A) y en (B) el RNA se obtuvo de células crecidas en Fe(II); en (C) de células crecidas en tiosulfato. Se muestran en rojo las señales correspondientes al gen del rDNA 16S y en azul los controles *rus*, *dnaK* y *groEL*.

Para definir el radioisótopo más apropiado, se realizaron reacciones de marcaje utilizando [α -³³P]dCTP o [α -³²P]dCTP durante la síntesis del cDNA a partir de oligonucleótidos específicos utilizando la enzima ImPromII RT, obteniéndose señales mucho más definidas e intensas para una mayor cantidad de ORFs al utilizar el radioisótopo ³²P (Figura 6B). De acuerdo con estos resultados las reacciones de marcaje posteriores se realizaron utilizando [α -³²P]dCTP, oligonucleótidos específicos y la enzima ImPromII.

III.5.2 Protocolos de enriquecimiento en mRNA de muestras de RNA total

En la Figura 6A y 6B puede observarse una clara señal correspondiente a los rDNA de 16S (marcados en rojo) en las membrans hibridizadas con sondas obtenidas tanto con oligonucleótidos al azar como específicos, aún cuando entre estos últimos no se incorporó uno específico para este rRNA. Debido a que esta incorporación de dCTP marcado en el rRNA podría estar compitiendo y por lo tanto disminuyendo la cantidad de cDNAs sintetizados a partir del mRNA se probó el enriquecimiento de mRNA en las muestras de RNA total utilizando el kit comercial *MICROBExpress*TM y un protocolo adaptado de Rosenow y cols. (2003).

Al utilizar el kit *MICROBExpress*TM no se consiguió una disminución en las cantidades de rRNA juzgado por la intensidad relativa de las bandas características observadas luego de la electroforesis en geles de agarosa (resultados no mostrados), por lo que se utilizó una modificación del protocolo descrito por Rosenow y cols. (2003) (ver Materiales y Métodos). Al marcar el RNA “enriquecido” obtenido y comparar las señales obtenidas con las de una muestra de RNA total no se observa un aumento cualitativo en la intensidad o calidad de las señales obtenidas (Figura 6C) por lo que se optó por no realizar este procedimiento en las reacciones de marcaje subsiguientes. Por otro lado, no se incluyó el fragmento de rDNA 16S en la placa 5S para que la mancha sobresaturada no interfiriera con la cuantificación de las manchas cercanas en la membrana. La cantidad de RNA total en la reacción de marcaje se disminuyó hasta 10 µg de RNA obteniendo los mismos resultados que utilizando 25 µg (resultados no mostrados), por lo que se optó por utilizar esta cantidad en las reacciones sucesivas.

En la Figura 7 se muestran membranas representativas obtenidas de la placa 5S con las condiciones optimizadas de marcaje de RNA total obtenido desde ión ferroso, azufre elemental y tiosulfato.

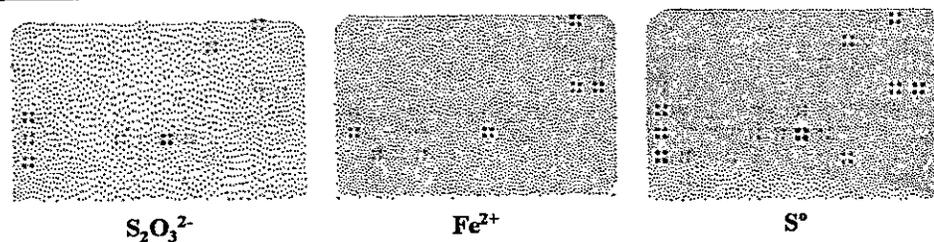


Figura 7. Membranas obtenidas con la placa 5S hibridizadas con sondas obtenidas de 10 μ g de RNA total obtenido de células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$), ión ferroso (Fe^{2+}) o azufre elemental (S^0) como sustratos oxidables y utilizando las condiciones de marcaje e hibridización estandarizadas.

III.6 Evaluación de la reproducibilidad del sistema de macroarreglos de DNA

Para evaluar la variabilidad intrínseca del sistema de macroarreglos de DNA utilizado, se hibridizaron 2 membranas (réplicas técnicas; A y B en la Figura 8A) con sondas obtenidas de dos cultivos independientes de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato (réplicas biológicas; T1 y T2 en la Figura 8A). Como puede observarse en las Figuras 8B y 8C, la variación de los valores de intensidad de las manchas entre las réplicas es un su mayoría de ± 5 veces, no siendo nunca mayor a las ± 10 veces y se concentra principalmente en las señales de alta intensidad al comparar las ICRX (Figura 8B) o de bajas intensidades al comparar las INRX (Figura 8C).

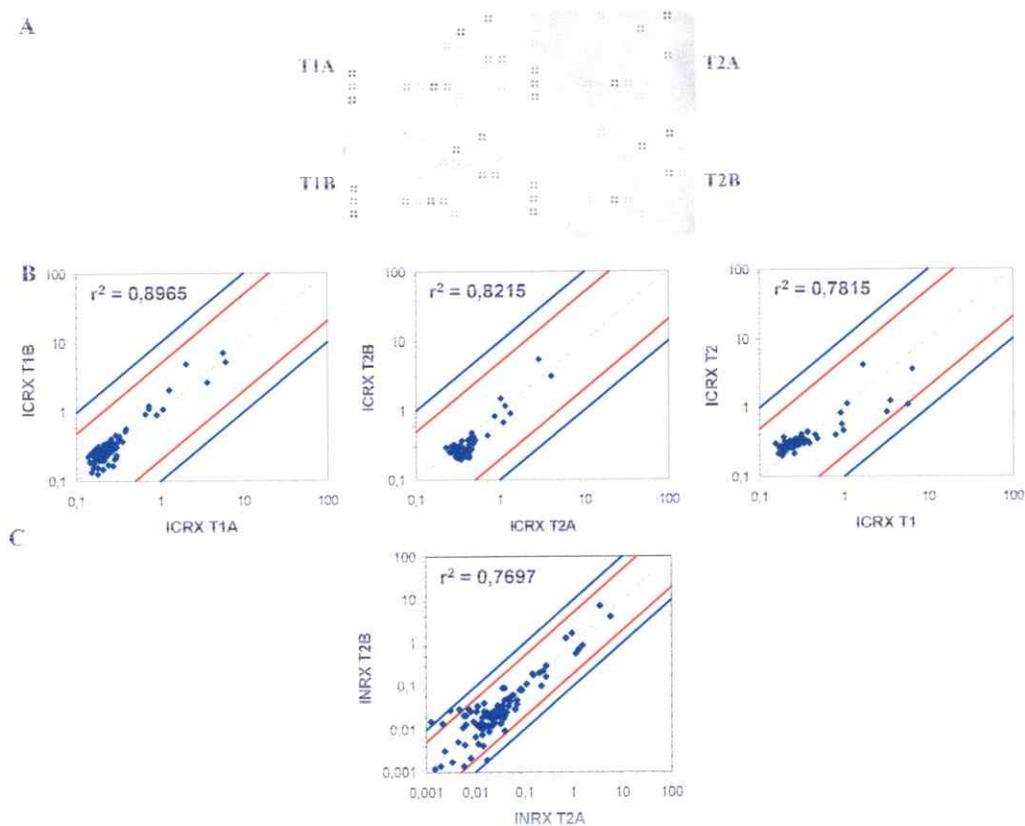


Figura 8. Variabilidad del sistema de macroarreglos de DNA de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. (A) Membranas obtenidas al hibridar 2 membrabas (réplicas técnicas A y B) con sondas obtenidas a partir de 10 μg de RNA total de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato en 2 cultivos independientes (réplicas biológicas T1 y T2). (B) Gráficos de dispersión de los valores de intensidad cruda relativa promedio (ICRX) entre las réplicas técnicas y biológicas mostradas en (A). (C) Gráficos de dispersión de la intensidad neta relativa promedio (INRX) entre las señales de las réplicas técnicas y biológicas mostradas en (A). En (B) y (C) las líneas azules indican una variación de +/- 10 veces, las líneas rojas +/- 5 veces.

III.6.1 Determinación del límite de detección del sistema de macroarreglos de DNA

Para eliminar del análisis diferencial las señales de muy baja intensidad, se eliminaron las señales con valores de IC muy cercanos al valor de intensidad de su fondo local previo al cálculo de las INRX. Para esto se determinó el límite de detección del macroarreglo de DNA para definir si una determinada señal es considerada como

detectada o no detectada. Este límite de detección se determinó de acuerdo a la relación entre la IC y la IFX dada por la relación señal-ruido (Q_{sr} ; $Q_{sr} = [IC/(IC + IFX)]$) para cada mancha obtenida (Figura 9A). De la definición de Q_{sr} puede deducirse que una $Q_{sr} = 0,5$ implica que la $IC = IFX$. El valor de Q_{sr} promedio para los controles negativos (DNA heterólogo *tau*, 40 % v/v DMSO y las zonas de la membrana sin material sembrado) es de 0,50 siendo siempre menores a 0,51 (no mostrado).

Se definieron las señales con una $Q_{sr} > 0,51$ como detectadas y con $Q_{sr} < 0,51$ como no detectadas. Al filtrar las señales con $Q_{sr} < 0,51$ se eliminan en promedio el 37 % de las señales obtenidas en las membranas hibridizadas con sondas sintetizadas con RNA total obtenidas de células crecidas en tiosulfato, lo que corresponde aproximadamente a 35 ORFs no detectados (Figura 9B). Al utilizar solo las señales con $Q_{sr} > 0,51$ para el cálculo de las INRX los índices de correlación aumentan tanto para las réplicas técnicas como biológicas, siendo las variaciones de intensidad menores a ± 5 veces en todos los casos (Figura 9C).

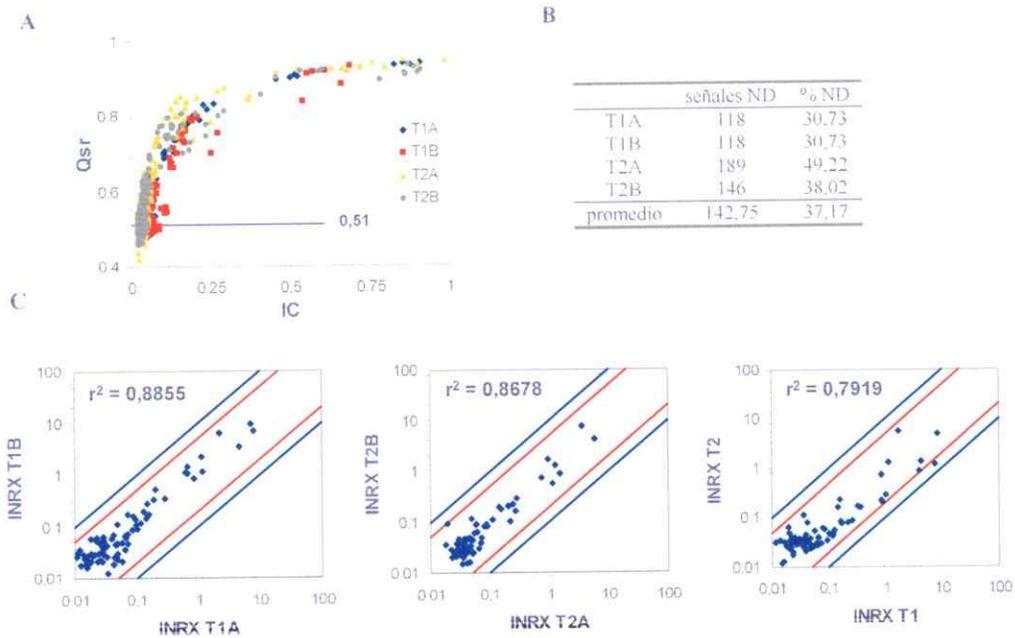


Figura 9. Determinación del límite de detección del sistema de macroarreglos de DNA de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. **(A)** Relación señal-ruido (Qsr) en función de la intensidad cruda de las señales obtenidas de las membranas de la Figura 10A. Se señala la recta Qsr = 0.51. **(B)** Cantidad de señales no detectadas (ND) obtenidas en (A). **(C)** Gráficos de dispersión de la intensidad neta relativa promedio (INRX) entre las señales de las réplicas técnicas y biológicas mostradas en la figura 10A con Qsr > 0.51. En (C) las líneas azules indican una variación de +/- 10 veces, las líneas rojas +/- 5 veces.

III.7 Análisis de expresión diferencial de los ORF codificantes para proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y sus contextos génicos

Para estudiar el efecto del uso de diferentes sustratos oxidables como fuente de energía en los niveles de transcrito para las proteínas tipo rodanasa se extrajo RNA de células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en ión ferroso, azufre elemental o tiosulfato hasta fase exponencial tardía y las sondas de cDNA sintetizadas a partir de esos RNAs se hibridaron con membranas obtenidas de la placa 5S. Para el cálculo de las INRX se utilizaron solo los promedios de datos de IC con una Qsr > 0,51 obtenidos de 3 réplicas

biológicas de RNA obtenidos en tiosulfato, 2 en azufre elemental y una en ión ferroso, todas con sus respectivas réplicas técnicas. En la Figura 10 se muestran los gráficos de dispersión obtenidos con las INRX utilizando sólo las señales con $Qsr > 0.51$ obtenidas en los 3 sustratos oxidables. En la Tabla 4 se muestra el resultado de la cuantificación de las intensidades INRX obtenidos para los ORF analizados en esta tesis.

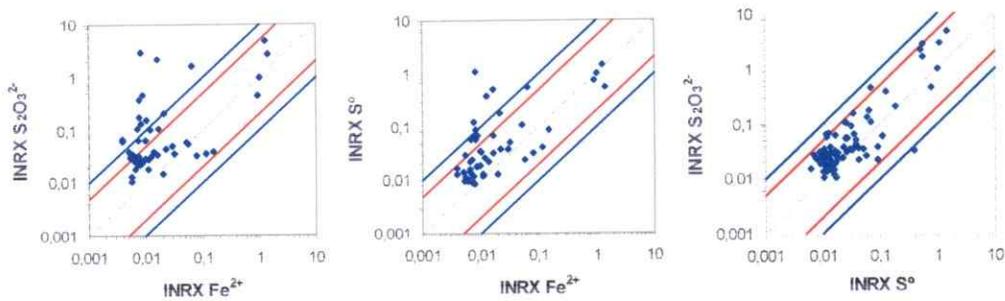


Figura 10. Análisis de expresión diferencial en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 utilizando el sistema de macroarreglos de DNA. Se muestran los gráficos de dispersión de la intensidad neta relativa promedio (INRX) entre las señales de las réplicas técnicas y biológicas obtenidas de la hibridación de membranas 5S con sondas sintetizadas a partir de 10 μg de RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), ión ferroso (Fe^{2+}) o azufre elemental (S^0). Las líneas azules indican una variación de +/- 10 veces, las líneas rojas +/- 5 veces.

En los gráficos de dispersión de la Figura 10 se observa un patrón diferente de la distribución de las INRX entre las sondas sintetizadas a partir de RNA obtenido en ión ferroso comparado con tiosulfato y azufre elemental. La diferencia observada entre azufre y tiosulfato es menor. La cuantificación de estos resultados obtenidos y el cálculo de las razones de las INRX para los ORFs codificantes para proteínas tipo rodanasa y sus respectivos contextos génicos (Tabla 4) muestra un patrón general de aumento de los niveles de transcritos para estos ORFs en células crecidas en tiosulfato y

azufre elemental comparado con ión ferroso, siendo muchos de los ORFs analizados considerados como no detectados ($Qsr < 0,51$) en este último sustrato oxidable.

En particular se observa un patrón consistente de aumento para los ORFs pertenecientes al contexto de *p21* y el contexto de *p11*. Los ORFs *modA2*, *doxDA2* y *ahpC* ubicados contiguos y convergentes al grupo alrededor de *p21* (Figura 3), muestran valores de INRX más bajos en azufre y tiosulfato que los ORFs *modA1*, *doxDA1* y *p21*, sin embargo, a excepción de *ahpC*, los CV obtenidos son menores a 0,5 lo que indica que a pesar de las bajas INRX existe una buena reproducibilidad de los valores obtenidos. Esto permite concluir que *modA2* y *doxDA2* se estarían expresando en estas condiciones de crecimiento. Los ORFs *p21*, *doxDA1*, *modA1*, *hyp4* y *tehA* se detectan tanto en tiosulfato como en azufre elemental, no así en ión ferroso donde sus INRX se consideraron como no detectadas. Por su parte, *p14.3* presenta niveles muy bajos de INRX comparado con los otros miembros de su contexto y se detecta en los 3 sustratos de crecimiento. Esto sugiere que su expresión no estaría regulada en conjunto con los otros ORFs pertenecientes al contexto. Todos los ORFs analizados pertenecientes al contexto de *p11* presentan INRX mayores en azufre elemental y tiosulfato, no detectándose *moaA* y *sirA* en ión ferroso. Las razones de aumento de *hyp1* en tiosulfato y azufre elemental respecto a ión ferroso (50,36 y 16,35 veces respectivamente) y de *p11* en tiosulfato respecto a ión ferroso (7,63 veces) muestran que los niveles de transcritos para estos ORFs estarían aumentados durante la oxidación de compuestos parcialmente reducidos de azufre. Interesantemente, los niveles de *p14* se ven aumentados sólo en azufre elemental y no en tiosulfato o ión ferroso sugiriendo un posible rol para este ORF en la oxidación del azufre elemental en *A. ferrooxidans*; *hyp2* presenta niveles mucho más bajos que *p14* tanto en tiosulfato como azufre elemental, siendo no detectado en ión ferroso.

RESULTADOS

Tabla 4. Análisis de expresión diferencial de los ORFs codificantes para las proteínas tipo rodanasa y sus contextos génicos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en distintos sustratos oxidables.

ORF ^a	Señal ^b			INRX x 10 ⁻² (CV) ^c						Razón ^d		
	T	S	Fe ²⁺	T		S ^o		Fe ²⁺		T/Fe ²⁺	S ^o /Fe ²⁺	S ^o /T
	P11											
<i>moaA</i>				3,13	(0,44)	1,00	(0,35)	ND ^e	-	↑∞	↑∞	-3,13
<i>p11</i>				3,86	(0,73)	1,37	(0,41)	0,51	(0,23)	7,63	2,72	-2,78
<i>sirA</i>				1,49	(0,24)	1,60	(0,32)	ND	-	↑∞	↑∞	1,07
<i>hyp1</i>				38,20	(0,99)	12,41	(0,35)	0,76	(0,37)	50,36	16,35	-3,13
<i>hyp2</i>				1,85	(0,59)	0,89	(0,32)	ND	-	↑∞	↑∞	-2,08
<i>p14</i>				3,17	(0,81)	38,22	(1,55)	1,25	(0,39)	2,53	30,49	12,07
<i>p15</i>				2,24	(0,89)	0,87	(0,32)	0,73	(0,14)	3,07	1,20	-2,56
<i>tolC</i>				1,03	(0,65)	1,68	(0,53)	ND	-	↑∞	↑∞	1,63
<i>acrA</i>				1,77	(0,82)	1,02	(0,29)	ND	-	↑∞	↑∞	-1,72
<i>acrB</i>				2,97	(0,34)	1,12	(0,49)	0,55	(0,27)	5,43	2,05	-2,63
<i>hyp3</i>				1,83	(0,67)	1,31	(0,48)	1,11	(0,28)	1,65	1,18	-1,39
<i>p16</i>				1,47	(0,80)	1,30	(0,54)	2,00	(1,01)	0,74	0,65	-1,14
<i>Grx</i>				6,00	(0,73)	10,77	(0,34)	5,11	(0,22)	1,17	2,11	1,79
<i>Thi</i>				3,49	(0,82)	3,29	(0,37)	1,62	(0,37)	2,16	2,04	-1,06
<i>p16.2</i>				10,16	(0,63)	2,58	(0,43)	1,18	(0,28)	8,59	2,18	-4,00
<i>modA2</i>				2,79	(0,40)	1,36	(0,41)	ND	-	↑∞	↑∞	-2,04
<i>doxDA2</i>				2,69	(0,19)	0,68	(0,31)	ND	-	↑∞	↑∞	-4,00
<i>ahpC</i>				1,53	(0,88)	1,11	(0,15)	ND	-	↑∞	↑∞	-1,39
<i>p14.3</i>				1,06	(0,64)	1,02	(0,25)	0,57	(0,11)	1,85	1,79	-1,03
<i>p21</i>				8,96	(0,81)	3,11	(0,52)	ND	-	↑∞	↑∞	-2,86
<i>doxDA1</i>				1,99	(0,67)	1,60	(0,49)	ND	-	↑∞	↑∞	-1,23
<i>modA1</i>				3,01	(0,68)	1,55	(0,49)	ND	-	↑∞	↑∞	-1,96
<i>Hyp4</i>				5,46	(0,64)	2,53	(0,43)	ND	-	↑∞	↑∞	-2,17
<i>tehA</i>				5,50	(0,76)	2,66	(0,41)	ND	-	↑∞	↑∞	-2,08
<i>p28</i>				2,26	(0,62)	1,05	(0,46)	ND	-	↑∞	↑∞	-2,17
<i>exp-1</i>				100,00	(0,23)	100,00	(0,18)	100,00	(0,27)	1,00	1,00	1,00

^a Nombres de los ORF según Figura 2 y Tabla 2.

^b Señal representativa obtenida en la zona de las membranas donde se sembró el fragmento indicado en cada sustrato oxidable utilizado. T, tiosulfato; S^o, azufre elemental; Fe²⁺, ión ferroso.

^c CV, coeficiente de variación.

^d Razón de cambio, en veces. Valores negativos corresponden a las veces de disminución de los niveles

^e ND, no detectado, Qsr < 0,51

En estos experimentos se detectó además una señal correspondiente a *p16.2* en los tres sustratos oxidables utilizados, siendo su intensidad 8,59 veces mayor en tiosulfato y 2,18 veces mayor en azufre elemental respecto a su intensidad en ión ferroso. Esto sugiere que este ORF se estaría expresando en las condiciones de crecimiento usadas en este estudio y correspondería a un gen funcional, lo que contrastaría con la anotación hecha por The J. Craig Venter Institute, en la cual no se incluyó este ORF. Por su parte *p15* se detectó en bajos niveles en azufre elemental e ión ferroso. En tiosulfato su nivel detectado es mayor pero el CV de su INRX es alto (lo que indica una alta variación y por ende poca confiabilidad). De los ORFs pertenecientes al contexto de *p16* los ORFs *grx* y *thi* se detectaron en los tres sustratos oxidables utilizados sin existir variaciones de los niveles de transcritos detectados entre estos. Los ORFs *tolC*, *acrA*, *acrB*, *hyp3*, y *p16* presentan unas INRX más bajas que para *grx* y *thi* en tiosulfato y azufre elemental, siendo *tolC* y *acrA* considerados como no detectados en ión ferroso. Salvo para el caso de los ORFs no detectados en ión ferroso, las razones de aumento o decrecimiento son pequeñas y no muestran un comportamiento coordinado de relación de intensidades, lo que sugiere que *p16* y los miembros de su contexto genético no estarían siendo regulados por el sustrato energético utilizado por la bacteria. *p28* se consideró como indetectable en ión ferroso, siendo sus intensidades similares entre azufre y tiosulfato.

IV. Discusión

Si bien el agente oxidante directo del sulfuro metálico durante el proceso de biolixiviación sería el ión férrico generado por los microorganismos oxidadores de ión ferroso, el papel central que tendría el tiosulfato en el ciclo oxidativo de la pirita (Figura 1) y la baja en la tasa de lixiviación debida a la acumulación de compuestos reducidos de azufre en la superficie del mineral en ausencia de organismos oxidadores de azufre (Schippers y cols., 1996) recalcan la importancia que podría tener el metabolismo del tiosulfato y otros compuestos reducidos de azufre en el proceso. Utilizando aproximaciones proteómicas se han identificado proteínas cuyos niveles aumentan durante la oxidación de compuestos parcialmente reducidos de azufre en *A. ferrooxidans* (por ejemplo ver Ramírez y cols., 2002 y 2004). La secuencia del genoma de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 fue recientemente terminada y anotada por el J. Craig Venter Institute (<http://www.tigr.org>), lo que abrió la posibilidad de estudios globales de expresión génica en esta bacteria. A la fecha existen dos reportes de análisis transcripcionales globales en *A. ferrooxidans*, centrados en el comportamiento de genes relacionados con el metabolismo energético y de compuestos de carbono en esta bacteria al crecer en ión ferrosos o azufre elemental (Appia-Ayme y cols., 2006; Quatrini y cols., 2006).

Sólo *p28* y *p15* se sembraron sin los ORFs correspondientes a sus contextos génicos. En el caso de *p28*, los ORFs río abajo de éste gen están claramente relacionados con la fijación del nitrógeno y el papel de *p28* estaría en la maduración y/o reparación de centros hierro-azufre presentes en el complejo nitrogenasa y eventualmente de otras proteínas con estos centros redox (Acosta y cols., 2005). La fijación de nitrógeno molecular se ha reportado en *A. ferrooxidans* sólo en condiciones de microaerofilia (Mackintosh, 1978). Por su parte *p15* se encuentra entre el gen codificante para una

proteína putativa de membrana (*imp2*) y otro para un transportador relacionado con el metabolismo de aminoácidos (*speE*).

Las amplificaciones por PCR de los fragmentos a sembrar en el macroarreglo de DNA fueron exitosas y solo ajustando la temperatura de "annealing" del PCR se consiguió obtener una banda discreta del tamaño esperado (Figura 5), la cual fue purificada. No fueron secuenciados los fragmentos amplificados para demostrar su identidad previo al sembrado de las membranas, pero a juzgar por la no aparición de bandas correspondientes a amplificación inespecífica y la purificación de cada fragmento a partir de una banda discreta del tamaño esperado luego de una electroforesis en gel de agarosa, hace poco probable que el producto de PCR sembrado en el macroarreglo de DNA no corresponda a lo esperado.

Una observación surgida durante las reacciones de marcaje e hibridización fue la incorporación de dCTP marcado en los rRNA de 16S en ausencia de un oligonucleótido específico para iniciar la reacción de RT durante la reacción de síntesis de cDNA (ver Figuras 7A y 7B), esto podría deberse a la presencia de DNA contaminante complementario a zonas del rDNA de 16S en la preparación de RNA que sirva de iniciador para la reacción de RT. Sin embargo, esto sería poco probable debido a que la presencia de DNA genómico en las extracciones de RNA es indetectable incluso en los geles de agarosa previo al tratamiento con DNasaI. Además las muestras son tratadas con DNasaI siguiendo un protocolo con el cual no son detectados fragmentos de 600 pb aún luego de 40 ciclos de PCR (resultados no mostrados). Durante la síntesis de DNA multicopias de simple hebra (msDNA) mediada por retroelementos de *E. coli* se han reportado fenómenos de "self-priming", en donde son utilizadas estructuras secundarias formadas en el mismo transcrito como iniciador de la reacción de RT, formando un particular enlace 2' - 5' fosfodiester (Shimamoto y cols., 1998). Si bien no ha sido

descrita la capacidad de las transcriptasas reversas ImPromII o AMV de utilizar estructuras secundarias en el RNA para iniciar la síntesis de cDNA, dado el alto nivel de estructuración secundaria de los rRNA y su gran abundancia, podría ser factible que ocurran este tipo de reacciones. En *A. ferrooxidans* se han descrito “artefactos” en reacciones de RT-PCR de los operones *pet* y *res* al obtener amplificaciones por PCR utilizando las reacciones de RT sin oligonucleótidos específicos para iniciar la reacción de RT (Guacucano y cols., 2000). Para disminuir el posible efecto de la presencia de los rRNA en la reacción de síntesis de cDNA marcado se intentó enriquecer las muestras de RNA total de *A. ferrooxidans* en mRNA utilizando el Kit MICROBExpress™, sin embargo estos fueron infructuosos. Una posible causa de esto podría ser que las secuencias rRNA de *A. ferrooxidans* no son lo suficientemente complementarias con secuencias “consenso” del oligonucleótido usado para hibridización “sándwich” de los rRNA a las perlas magnéticas para su separación de los mRNA. Para utilizar el protocolo de enriquecimiento descrito por Rosenow y cols. (2001) se sintetizaron oligonucleótidos específicos complementarios a los rRNA de 16S y 23S de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Los resultados obtenidos con el mRNA “enriquecido” no muestran diferencias cualitativas respecto a las obtenidas con el RNA total (Figura 8C), por lo que optó por el uso de el RNA total en experimentos sucesivos. Las reacciones de marcaje se hicieron con las transcriptasas reversas AMV e ImPromII. A diferencia de la AMV RT, la ImPromII RT no posee actividad ribonucleasa H, que degrada el RNA de los híbridos RNA/DNA a medida que sintetiza el cDNA. Como se optó por esta última enzima, una vez obtenidas las sondas es necesario hidrolizar el RNA por tratamiento con NaOH, para asegurar la hibridización entre las sondas marcadas y el DNA inmovilizado en las membranas, las sondas se desnaturaron en un baño con agua hirviendo previo a la hibridización.

Si bien se ha mostrado en estudios previos que el uso de oligonucleótidos al azar daría resultados más precisos que los oligonucleótidos específicos para la cuantificación de RNAs en microarreglos en *E. coli*, (por ejemplo ver Arfin y cols., 2000), en las condiciones de marcaje e hibridización utilizadas en esta tesis no se obtuvieron resultados positivos al utilizar oligonucleótidos al azar (ver Figura 6A) por lo que se optó por utilizar una mezcla de oligonucleótidos específicos para los ORF sembrados en cada membrana.

La normalización de los datos de intensidad obtenidos se realizó respecto a un RNA exógeno transcrito in vitro (*exp-1*) agregado a la reacción de marcaje. En todos los experimentos se mantuvo constante la relación entre el RNA total de *A. ferrooxidans* y el de *exp-1*, por lo tanto la intensidad obtenida para este RNA exógeno dará cuenta de la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA y de variaciones en la hibridización de las membranas. Además el normalizar los datos de intensidad obtenidos para cada ORF respecto a *exp-1* permite comparar los niveles relativos de cada transcrito presentes en distintas muestras de RNA total de *A. ferrooxidans*. Otras alternativas de normalización son el uso de un gen “house-keeping” cuyos niveles de expresión no varíen y la normalización respecto a la proporción de la intensidad de cada ORF respecto a la sumatoria de la intensidad de todos los ORF presentes en la membrana (Tao y cols., 1999). El uso de genes “house-keeping” para la normalización requiere el conocimiento previo de genes cuyos niveles no varíen entre las condiciones experimentales utilizadas. A la fecha no se conocen este tipo de genes en *A. ferrooxidans* y las condiciones de pH, y solubilidad del sustrato entre los diferentes sustratos oxidables utilizados son bastante diferentes, lo que hace aún menos confiable el uso de genes “house-keeping” identificados en otros microorganismos. La normalización respecto a la relación de la intensidad de cada ORF respecto a la suma de las intensidades obtenidas en la

membrana supone que la cantidad de transcritos totales (“intensidad total”) es constante entre las condiciones experimentales utilizadas y que solo varía la cantidad relativa de los transcritos. Este supuesto requiere: (i) una gran cantidad de ORFs a analizar y (ii) que no exista un sesgo previo en la selección de los ORFs analizados. Los ORF estudiados en esta tesis (i) representan una proporción bastante pequeña de los ORF codificados en el genoma (0,78 %) y (ii) fueron seleccionados con el sesgo de estar relacionados con proteínas tipo rodanasa, lo que no hace apropiado el uso de esta aproximación para la normalización de los datos obtenidos.

Para la determinación de la variabilidad del sistema se compararon 2 réplicas biológicas (con 2 réplicas técnicas de cada una) del RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 obtenido luego de crecer el microorganismo en tiosulfato. Si bien la comparación de las ICRX de las señales da mejores índices de correlación entre las réplicas técnicas y biológicas que las INRX (Figura 9B y 9C), los valores altos de ICRN muestran una variabilidad mayor que los de INRX. Esto indica que los valores de fondo local de las señales intensas son más sensibles a las variaciones experimentales, lo que hace necesario sustraer su aporte para estudios diferenciales. Por otro lado la mayor variabilidad entre las INRX se observa en las señales de baja intensidad, por lo que se determinó un umbral de relación señal-ruido mínimo para el sistema de macroarreglo de DNA basado en la relación Qsr promedio obtenida para los controles negativos sembrados en las membranas ($Qsr = 0,50$). Luego de “filtrar” los datos con $Qsr < 0,51$ se obtiene un aumento en los índices de correlación tanto para las réplicas técnicas como biológicas (Figura 9C). Aumentando la estrictez del filtro utilizado, es decir considerando las señales con mayores valores de Qsr o utilizando una combinación de filtros (ver Wang y cols, 2001), mejorará la correlación entre las réplicas, pero a su vez se descartarán del análisis un mayor número de datos (Figura 8A). Sin embargo la

utilidad de los filtros de datos no está muy clara y aún no hay consenso de su utilidad en el análisis de datos obtenidos de microarreglos de DNA, siendo el análisis de la mayor cantidad de réplicas la única forma de aumentar el poder y la significancia de los resultados obtenidos (Allison y cols., 2005). Debido al número relativamente bajo de ORFs analizados en este estudio en comparación con un análisis estándar con microarreglos de DNA y a la disponibilidad limitada de réplicas biológicas, se decidió el utilizar únicamente un filtro para los datos obtenidos dado por la relación señal-ruido (Qsr), eliminando la menor cantidad de datos del análisis. Sin embargo esto implica un aumento en la probabilidad de falsos positivos por lo que los resultados obtenidos para los ORF con bajas INRX (y por lo tanto Qsr cercanos a 0,51) deben ser analizados con precaución, analizando conjuntamente los CV obtenidos al promediar las diferentes réplicas y el comportamiento de ORF contiguos en busca de posibles patrones de expresión coordinada.

Puede observarse en la Tabla 4 que en las membranas hibridizadas con sondas obtenidas en ión ferroso el número de ORF considerados no detectados es mayor que en tiosulfato o azufre elemental. Esto es esperable dado que la selección de los ORFs analizados tiene el sesgo de haber sido hecha en función a la presencia de un dominio tipo rodanasa o estar en el contexto genético de los ORFs codificantes para éstas, lo que sugiere que los ORFs analizados están relacionados con procesos de transferencia de átomos de azufre y, por lo tanto, podrían ser regulados por la presencia de compuestos parcialmente reducidos de azufre presentes en el medio de cultivo.

Al comparar los patrones diferenciales obtenidos con los diferentes sustratos oxidables puede observarse que las INRX obtenidas en azufre elemental y tiosulfato son similares (Figura 11), lo cual había sido observado previamente en los patrones de expresión global de proteínas de *A. ferrooxidans* analizados por 2D-PAGE (Ramírez y cols., 2002

y 2004; Lissette Valenzuela, resultados no publicados). Este fenómeno podría ser explicado por el equilibrio entre la formación de azufre elemental durante la oxidación de tiosulfato y la formación de tiosulfato a partir de sulfito y azufre elemental durante la oxidación del azufre y/o por la presencia de intermediarios comunes entre ambas vías oxidativas. El pH del medio de cultivo se acidifica concomitantemente a la oxidación de los compuestos de azufre, lo que estaría desplazado el equilibrio a la formación de azufre elemental en fases tardías del crecimiento en ambos sustratos. La excepción a este comportamiento es *p14*, que muestra un aumento de 12,07 veces en las células crecidas en azufre elemental comparadas con las crecidas en tiosulfato (Tabla 4) lo que sugeriría que P14 podría cumplir un rol específico durante la oxidación del azufre. P14 muestra un 27% de identidad con la proteína Sud de *W. succinogenes*, la cual posee una actividad polisulfuro azufre transferasa y se ha propuesto que participaría en la respiración de polisulfuros o azufre elemental transfiriendo los átomos de azufre desde la cadena persulfurada hacia el sitio activo de la polisulfuro reductasa (Klimmek y cols., 1999). P14 podría tener un rol similar en el modelo propuesto por Rohwerder y Sand (2003) para la oxidación del azufre, transfiriendo los átomos de azufre desde el intermediario persulfurado al sitio activo de la SDO. Sin embargo a diferencia de Sud, P14 no posee una señal de exportación Sec o TAT y no ha sido encontrada en extractos periplásmicos de *A. ferrooxidans* (Lissette Valenzuela, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile), sin embargo no puede descartarse que no pueda ser exportada por otra señal o formando parte de un complejo.

Los ORF pertenecientes al contexto de *p21* son detectados solo en tiosulfato y azufre elemental y muestran, a excepción de *p14.3*, un comportamiento coordinado en los diferentes sustratos oxidables. Las razones de aumento para todos los ORF pertenecientes al contexto de *p21* se consideraron como infinitas debido a que no fueron

consideradas como detectados en ión ferroso. Esto concuerda con los resultados obtenidos por 2D-PAGE en donde se demostró la presencia de P21 en extractos totales de proteínas de *A. ferrooxidans* obtenidos en compuestos reducidos de azufre y no en ión ferroso (Ramírez y cols., 2002 y 2004) y con resultados obtenidos con microarreglos de DNA, donde se mostró el aumento estadísticamente significativo de la expresión de *p21 (rhod)* (Quatrini y cols., 2006). Por otro lado la presencia y comportamiento coordinado con *modA1*, *doxDA1*, *hyp4* y *tehA*, sugieren que éstas serían reguladas conjuntamente con *p21*; más aún, experimentos de RT-PCR muestran que *modA1/doxDA1/p21* forman parte de una misma unidad transcripcional (Ramírez y cols., 2004). Es muy interesante destacar que P21 posee en su extremo carboxilo terminal un motivo de cisteínas [C-XX-W-XX-C] conocido por estar presente en proteínas que unen centros de hierro-azufre, generalmente involucradas en oxidaciones biológicas (Ramírez y cols., 2002). Por otra parte *p21* se encuentra río abajo de *doxDA1*, el cual codificaría para una subunidad de una oxidasa terminal homólogo a los genes *doxD* y *doxA* de *A. ambivalens*, que se encontrarían fusionados en *A. ferrooxidans* (Müller y cols., 2004), y de *modA1*, codificante para una proteína periplásmica de unión de molibdato/tiosulfato/sulfato (Acosta y cols., 2005). Todas estas evidencias apuntan hacia que P21 tendría un papel en la oxidación de tiosulfato en *A. ferrooxidans*.

En el modelo para la oxidación del azufre elemental en *A. ferrooxidans* propuesto por Rohwerder y Sand (2003) el sulfito producido por la SDO es oxidado a sulfato por una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SOR). En *A. ferrooxidans* la actividad sulfito oxidasa ha sido localizada en el periplasma habiéndose identificado al menos dos tipos: una que utilizaría citocromo *c* y otra que utilizaría Fe^{+3} como aceptores de electrones (Sugio y cols., 1988). Las SOR pertenecen a la familia de las molibdoenzimas, la de *Thiobacillus novellus* ha sido caracterizada como un heterodimero localizado en el

periplasma que contiene un cofactor de molibdeno (MOCO) y un citocromo *c* monohemo (Kappler et al., 2000). Debido a que la SOR sería indispensable para la oxidación de compuestos reducidos de azufre y no de ión ferroso, la síntesis de este cofactor debería estar aumentada en dichos sustratos. El aumento en los niveles de transcrito observado para *moaA*, *p11*, *sirA* e *hyp1* sólo en azufre elemental y tiosulfato apoyan la hipótesis de que *p11* podría participar en la síntesis del MOCO en *A. ferrooxidans* (Acosta y cols., 2005), dándole a P11 una participación indirecta en la oxidación de compuestos de azufre.

Los ORFs correspondientes a *p15* y *p16.2* se clonaron y expresaron en *E. coli*, siendo las dos proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 con actividades TST *in vitro* más altas (1, 45 y 3,03 U mg proteína⁻¹ respectivamente; Acosta y cols., 2005). En esta tesis se detectó un transcrito correspondiente a *p16.2* en los RNA provenientes de células crecidas en tiosulfato y azufre elemental, estando aumentado 8,59 veces en tiosulfato y 2,18 veces en azufre elemental respecto a ión ferroso; por otro lado *p15* está muy cerca del límite de detección de la técnica en los tres sustratos energéticos utilizados y su expresión no estaría regulada por éste. Cabe destacar que *p16.2* no se encuentra en la anotación realizada por el J. Craig Venter Institute, siendo que los resultados de expresión de este ORF sumado a la actividad *in vitro* reportada demostrarían que *p16.2* corresponde a un gen funcional de *A. ferrooxidans*. Esto hace hincapié en la necesidad del soporte y validación experimental de la anotación de genomas completos.

Los niveles detectados en los tres sustratos oxidables para *tolC*, *acrA*, *acrB*, *hyp3*, *p16*, *grx* y *thi* sugieren que estos ORFs no estarían siendo inducidos en las condiciones de crecimiento utilizadas y que por lo tanto no se relacionarían con el metabolismo energético de la bacteria. Los ORF *grx* y *thi* son detectados en los tres sustratos en

niveles más altos que los otros ORF del contexto analizados. El comportamiento regular o coordinado de estos dos grupos podría sugerir que posiblemente *grx/thi* forman una unidad transcripcional con regulación independiente de *tolC/acrA/acrB/hyp3/p16*. El comportamiento coordinado e independiente del sustrato energético de este grupo de genes sumado a la presencia de los ORF *tolC* y *acrAB*, codificantes para proteínas relacionadas con transportadores de eflujo de cationes o drogas y, río arriba de estas de *arsR*, codificante para un regulador transcripcional (Acosta y cols., 2005), sugieren la participación de P16 en un sistema de resistencia o de defensa frente a condiciones de estrés ambiental mediada por el transportador TolC-AcrAB.

Puede observarse en la Tabla 3 que los valores de INRX y las razones de inducción para ORF encontrados en una misma unidad transcripcional no son idénticos como podría esperarse (ver caso de *modA-1/doxDA-1/p21*). Además de poder indicar la presencia de promotores “internos” o la presencia de secuencias terminadoras, este fenómeno puede deberse a la degradación preferencial de ciertas zonas del mRNA o a diferencias en la eficiencia de hibridización de los oligonucleótidos específicos utilizados para la síntesis del cDNA durante la reacción de marcaje (Arfin y cols., 2000). Debido a este fenómeno, para la inferencia de posibles unidades transcripcionales entre grupos de genes en base a los resultados obtenidos con los macroarreglos de DNA debe tomarse en cuenta el perfil de expresión coordinada más que los valores netos de INRX o razones de inducción.

El sistema de macroarreglos de DNA de *A. ferrooxidans* diseñado y estandarizado en esta tesis permite el análisis simultáneo de casi 100 genes. Cambiando la configuración de sembrado puede aumentarse la densidad de fragmentos en las membranas al doble o triple de los analizados en esta tesis. Por otra parte la relativa sencillez y bajo costo de

construcción y análisis, en comparación con los sistemas de microarreglos de DNA, hacen de esta técnica muy interesante para futuros estudios de otros grupos genéticos o vías metabólicas en *A. ferrooxidans*, así como también para posibles aplicaciones biotecnológicas. Dentro de las posibles aplicaciones biotecnológicas de este sistema se encuentra el diseño y montaje de macroarreglos especializados para la cuantificación y tipificación de las especies presentes en faenas de biominería o la evaluación del funcionamiento de dichas comunidades analizando los niveles de expresión de genes metabólicos “marcadores” de las diversas vías oxidativas, en miras de la optimización del proceso de biolixiviación.

V. Conclusiones

Se diseñó y estandarizó un sistema de macroarreglos de DNA para la cuantificación simultánea y paralela entre distintas condiciones de ORFs relacionados con las proteínas tipo rodanasa identificadas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, siendo el primer reporte de este tipo de aproximación para el análisis de expresión diferencial en *A. ferrooxidans* (Acosta y cols., 2005).

Se determinó que algunos de los ORFs codificantes para proteínas tipo rodanasa expresan diferencialmente cuando la bacteria crece en azufre elemental, tiosulfato o ión ferroso como sustratos oxidables:

Los niveles de transcritos correspondientes a los ORFs *p11*, *p14*, *p16.2* y *p21* estarían aumentados en *A. ferrooxidans* al utilizar como fuente de energía compuestos de azufre parcialmente reducidos respecto a ión ferroso.

Entre tiosulfato y azufre elemental solo se encuentran aumentados los niveles de *p14* en este último sustrato, sugiriendo un rol específico para P14 durante el crecimiento en azufre elemental de *A. ferrooxidans*.

Los niveles de *p15*, *p16* y *p28* no varían de acuerdo al sustrato energético utilizado por *A. ferrooxidans*.

El comportamiento de aumento/disminución coordinado en los niveles de transcritos mostrados por otros genes pertenecientes a los contextos genéticos de las rodanasas estudiadas sugieren que *p11*, *p14*, *p16* y *p21* son transcritos como operones y que *grx* y *thi* se regularían independientemente de los otros miembros del contexto de *p16*, no siendo ninguno de ellos dependientes del sustrato oxidable utilizado.

Los resultados obtenidos sugieren la participación de P11, P14, P16.2 y P21 en el metabolismo y/o la oxidación de compuestos parcialmente reducidos de azufre en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

VI. REFERENCIAS

- Acosta, M., Beard, S., Ponce, J., Vera, M., Mobarec, J. C., Jerez, C. A. 2005. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS* 9:13-29
- Allison, D. B., Cui, X., Page, G. P., Sabripour, M. 2005. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nat rev Gen.* 7:55-65
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25:3389-3402
- Amaro, A., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I., Jerez, C.A. 1991. Effect external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Bacteriol.* 173:910-915
- Appia-Ayme, C., Quatrini, R., Denis, Y., Denizot, F., Silver, S., Roberto, F., Veloso, F., Valdes, J., Pablo Cardenas, J., Esparza, M. 2006. Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* 83:273-280
- Arfin, S. M., Long, A. D., Ito, E. T., Toller, L., Riehle, M. M., Paegle, E. S., Hatfield, G. W. 2000. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. *J. Biol. Chem.* 275:29672-29684
- Barreto, M., Jedlicki, E., Holmes, D. S. 2005. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* 71:2902-2909
- Bordo, D. y Bork, P. 2002. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* 3:741-746

- Brüser, T., Lens, P., Trüper, H. G. 2000. The biological sulfur cycle, en Environmental technologies to treat sulphur pollution. Lens, P., Hulshoff, L. Eds. pp 47-85, IWA Publishing, First Edition.
- Butte, A. 2002. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov.* 1:951-960
- Friedrich, C. G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A., Fischer, J. 2005. Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol.* 8:253-259
- Guacucano, M., Levican, G., Holmes, D. s., Jedlicki, E. 2000. An RT-PCR artifact in the characterization of bacterial operons. *Electron J Biotechnol.* 3:213-216
- Guiliani, N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M., Bonnefoy, V. 1997. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* 143:2179-2187
- Haveman, S. A., Brunelle, V., Voordouw, J. K., Voordouw, G., Heidelberg, J. F., Rabus, R. 2003. Gene expression analysis of energy metabolism mutants of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough indicates an important role for alcohol dehydrogenase. *J Bacteriol.* 185:4345-4353
- Hedderich, R., Klimmek, O., Kröger, A., Dirmeier, R., Keller, M., Stetter, K. O. 1999. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:353-381 (1999)
- Kappler, U., Bennett, B., Rethmeier, J., Schwarz, G., Deutzmann, R., McEwan, A. G., Dahl, C. 2000. Sulfite:cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus novellus*. Purification, characterization, and molecular biology of a heterodimeric member of the sulfite oxidase family. *J Biol Chem.* 275:13202-13212

- Klimmek, O., Stein, T., Pisa, R., Simon, J., Kröger, A. 1999. The single cysteine residue of the Sud protein is required for its function as a polysulfide-sulfur transferase in *Wolinella succinogenes*. *Eur J Biochem.* 263:79-84
- Mackintosh, M. E. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Gen Microbiol.* 105:215-218
- Matthies, A., Rajagopalan, K. V., Mendel, R.R., Leimkuhler, S. 2004. Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:5946-5951
- Middelburg, J. J. 2000. The geochemical sulphur cycle. En Environmental technologies to treat sulphur pollution. Lens, P., Hulshoff, L. (eds.). pp 33-46, IWA Publishing, First Edition.
- Müller, F.H., Bandejas, T.M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M., Kletzin, A. 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol Microbiol.* 53:1147-1160
- Parro, V., Moreno-Paz, M. 2003. Gene function analysis in environmental isolates: the *nif* regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:7883-7888
- Pronk, J. T., Meulenberg, R. Hazeu, Z., Bos, P., Kuenen, J. G. 1990. Oxidation of inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:293-306
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Ratouchniak, J., Veloso, F., Valdes, J., Lefimil, C., Silver, S., Roberto, F., Orellana, O. 2006. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy.* 83:263-272

- Ramírez, P., Guiliani, N., Valenzuela, L., Beard, S., Jerez, C. A. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4491-4498
- Ramírez, P., Toledo, H., Guiliani, N., Jerez, C. A. 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1837-1845
- Rawlings, D. E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:65-91
- Rawlings, D. E. 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates, *Microb Cell Fact.* 4:13
- Richmond, C. S., Glasner, J. D., Mau, R., Jin, H., Blattner, F. R. 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27:3821-3835
- Rohwerder, T. y Sand, W. 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium spp.* *Microbiology.* 149:1699-1709
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W. 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:239-248
- Rosenow, C., Saxena, R. M., Durst, M., Gingeras, T. R. 2001. Prokaryotic RNA preparation methods useful for high density array analysis: comparison of two approaches. *Nucleic Acids Res.* 29:E112.

- Schippers, A. y Sand, W. 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., Jozsa, P., Sand, W. 1996. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3424-3431
- Schlaak, J. F., Hilkens, C.M., Costa-Pereira, A. P., Strobl, B., Aberger, F., Frischauf, A. M., Kerr, I.M. 2002. Cell-type and donor-specific transcriptional responses to interferon-alpha; Use of customized gene arrays. *J Biol Chem.* 277:49428-49437
- Seeger M. y Jerez, C.A. 1993. Phosphate-starvation induced changes in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett.* 108:35-41.
- Shimamoto, T., Kawanishi, H., Tsuchiya, T., Inouye, S., Inouye, M. 1998. In vitro synthesis of multicopy single-stranded DNA, using separate primer and template RNAs, by *Escherichia coli* reverse transcriptase. *J Bacteriol.* 180:2999-3002
- Stuedel, R. 2000. The chemical sulfur cycle. En Environmental technologies to treat sulphur pollution. Lens, P., Hulshoff, L. (eds.). pp 1-31, IWA Publishing, First Edition.
- Sugio, T., Katagiri, T., Moriyama, M., Zhen, Y. L., Inagaki, K., Tano, T. 1988. Existence of a new type of sulfite oxidase which utilizes ferric ions as an electron acceptor in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* 1988 54:153-157
- Sugio, T., Mizunashi, W., Inagaki, K., Tano, T. 1987. Purification and some properties of sulfur:ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol.* 169:4916-4922
- Tabita, Silver, M., Lundgren, D. G. 1969. The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can J Biochem.* 47:1141-1145

- Tao, H., Bausch, C., Richmond, C., Blattner, F. R., Conway, T. 1999. Functional genomics: expression analysis of *Escherichia coli* growing on minimal and rich media. *J. Bacteriol.* 181:6425-6440
- Valdés, J., Veloso, F., Jedlicki, E., Holmes, D. 2003. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics* 4:51
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Holmes, D. 2008. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 94:180-184.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Jerez, C. A. 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol Adv.* 24:197-211
- Valenzuela L, Chi A, Beard S, Shabanowitz J, Hunt DF and Jerez CA. 2007. Differential expression proteomics for the study of sulfur metabolism in the chemolithoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En *Microbial Sulfur Metabolism*. C. Friedrich y C. Dahl. (eds.), Springer, *En prensa*.
- Varela, P. y Jerez, C.A. 1992. Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol Lett.* 77:149-153
- Vera, M., Guiliani, N., Jerez, C. A. 2003. Proteomics and genomic análisis of the phosphate starvation response in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 71:125-132
- Wang, X., Ghosh, S., Guo, S. W. 2001. Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. *Nucleic Acids Res.* 29:E75
- Weber, A. y Jung, K. 2002. Profiling early osmostress-dependent gene expression in *Escherichia coli* using DNA macroarrays. *J Bacteriol.* 184:5502-5507

- Yang, S., Lopez, C. R., Zechiedrich, E. L. 2006. Quorum sensing and multidrug transporters in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:2386-2391
- Yarzabal, A., Appia-Ayme, C., Ratouchniak, J., Bonnefoy, V. 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* 150:2113-2123

Anexo I: Oligonucleótidos utilizados en esta tesis

Contexto	Amplificado	Nombre	Secuencia	
<i>p11</i>	<i>moaA</i>	popF1N	CATGCCGCAGGGATTAGT	
		popF1R	TGAAGCGGATATCGACAC	
		popF1C	CCAAGCCGCATCATGAAC	
	<i>p11</i>	popF2N	AGGAAATCACTGCGGATC	
		popF2C	TCAACTGGACAACCTGGAC	
	<i>sirA</i>	popI9N	AGACAAAGTACTCGACGC	
		popI9C	ATGAACTCGCCAGCAGCT	
	<i>hyp1</i>	popI10N	GGACGAGAAAAAGTTGGC	
		popI10C	GAGCGTAATATCTGACTC	
	<i>p14</i>	<i>p14</i>	popE1N2	AGGTCATGGGGAAATCTC
popE1C2			GAAACGACCGGCTTGTGTC	
<i>atsE</i>		popE2N	ATGGCTACAGTGAAGTGG	
<i>p15</i>	<i>p15</i>	P15N	CATATGACAAAGTCGGTAATAAACC	
		P15C	TTATATTTGCTCCCAGGGTAGTC	
<i>p16</i>	<i>tolC</i>	popD1N	ATGCCCTTTCATCCTCAT	
		popDIR4	CGGCTGGTCTTGACATAC	
		popD1C	TCATTGGGAGACTCCTTC	
	<i>AcrA</i>	popD2N1	ATGAACACCTGGAAGCAA	
		popD2N2	GAACACCTGGAAGCAAAC	
		popD2R	GTCTCCGTTCTGCAGGAA	
	<i>AcrB</i>	popD2C	CCTCTGGCTCGATGTGAT	
		popD3N2	AGCAGCGGCAAAATCTGG	
		popD3R	ACTCTGCAGCCGGTTCAT	
		popD3C1	TCAAACCTCCTTGTGTATG	
		popD3C2	ATGTTTTCCAAGCGCCG	
		popD4N	ATGAATACGGAACGTTGG	
	<i>hyp3</i>	popD4C2	TATGGTCCATGACTTAGC	
		<i>p16</i>	popD5N	TCTTTTCTTTATCGAGTC
	popD5C		TCACTTCTCTACCGGCAG	
		<i>grx</i>	popD6N	GTATGGTGAAAGGAGCGG
			popD6C2	ATCCCCCTGGCCATTTTC
		<i>thi</i>	popD7N2	ATGACATCCGTGATATTGC
			popD7C	TCAGACTCCCTGTCCTGT
			P16.2N	CATATGAGTACCGAAACGATTTTG
<i>p16.2</i>	<i>p16.2</i>	P16.2C	CTACTTGTCTTCCAGGGCAGG	
<i>p21</i>	<i>tehA</i>	popA9N	GGGTAATCAATGCATGGC	
		popA9R	GAAATGGCCCAAAGCACG	
<i>P14.3</i>	<i>hypA1</i>	popA8N	GCAGAGAAGCAATGAAGC	
		popA8R	AGGCCAGGAATACGGCAC	
	<i>modA1</i>	popA1N2	GTA AAAACGCTGCAAGTCG	
		popA1R3	GGCATGGATAAACGCACA	
	<i>doxDA1</i>	popA2N	ATGGCAACGACCATGTCA	
		popA2R2	CATCGCTCAAAGGCAAAG	
	<i>p21</i>	popA3N	ATGTATGGAAAGCGCCAG	
		popA3R3	CGTCTGGTTGGATAGCTG	
	<i>p14.3</i>	popA4N	ATGTCCCACCTAATCAAAG	
		popA4C	AGAGGGCAGCAGGCGAT	
	<i>ahpC</i>	popA5N2	GTCAAAAACGGTTTGGCC	
		popA5C2	CACTTCTGCTGTAATGCC	
	<i>doxDA2</i>	popA6N	CGGATCATCAGGAGAAAG	
		popA6R2	GCGCGAATTTCTTGTAGG	

	<i>modA2</i>	popA7N	TGACGAAAAGCAGCACAC
		popA7R	ATTCCGGGTTTGCCCAGA
<i>p28</i>	<i>p28</i>	P28N	CATATGAATACCCGCTCCTTTCAC
		P28C	TCAGGTGACGGCTTTTATCCGC
	<i>dnaK</i>	AfDnaK-N	ATGGCTAAAGTGATCGGA
		AfDnaK-R1	GCACTTCAAAC TGGTGTT
	<i>groEL</i>	AfGroEL-N	ATGCCAGCCAAACAAGTA
		AfGroEL-r1	TAGGGATTCTCCAGTTCG
	16S rDNA	16Sfor	TGGTGCCTAAGCGTACTGAGTGT
		16Srev	CCGAAGGGCACTTCCGCA
		Af16S-R962	CACATGCTCCACCGCTTGTGC
	23S rDNA	Af23S-R	GGTCAAGCCGCACGGGCGAT
		Af23S-R	TCAACGTGGTAGTCTTCCAC
		Af23S-R2	AGGATCGTCATCACGCCTCG
		Af23S-R3	TTCGGATACCTCCAGCATGC
		Af-23S-D1	AGGGGAGCCGAAGGGAAAC
	<i>exp1</i>	exp1sens	GAGGTGCTTGTGGATATGGAA
		exp1as	ACAGCATTGCTGGTCACAG