

UCH-FC
Biotecnol.
Molecular
6984
C.A



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN
PARA tRNA INTERRUMPIDOS POR INTRONES EN
Acidithiobacillus ferrooxidans”

FERNANDA GUTIÉRREZ PÉREZ

DIRECTOR DE SEMINARIO DE TÍTULO: Dr. Omar Orellana O.

CO-DIRECTOR DE SEMINARIO DE TÍTULO: Dra. Gloria Levicán J.

PATROCINANTE: Dra. Rosalba Lagos M.

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR BACTERIANA

ICBM-FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO - 2011

ESCUELA DE PREGRADO-FACULTAD DE
CIENCIAS-UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile
que el Seminario de Título, presentado por el Sr. o Srta.:

FERNANDA GUTIÉRREZ PÉREZ

“CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA tRNA
INTERRUMPIDOS POR INTRONES EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dr. Omar Orellana O.
DIRECTOR DE SEMINARIO DE TÍTULO

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Omar Orellana', written over two horizontal lines.

Dra. Gloria Levicán J.
CO-DIRECTOR DE SEMINARIO DE TÍTULO

COMISION DE EVALUACIÓN

Dr. Marcelo Baeza C.
PRESIDENTE COMISIÓN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Marcelo Baeza', written over two horizontal lines.

Dr. Francisco Chávez E.
CORRECTOR

Dra. Rosalba Lagos M.
PATROCINANTE

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Rosalba Lagos', written over two horizontal lines.

SANTIAGO - 2011



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

“CARACTERIZACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN
PARA tRNA INTERRUMPIDOS POR INTRONES EN
Acidithiobacillus ferrooxidans”

FERNANDA GUTIÉRREZ PÉREZ

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

DIRECTOR DE SEMINARIO DE TÍTULO: Dr. Omar Orellana O.

CO-DIRECTOR DE SEMINARIO DE TÍTULO: Dra. Gloria Levicán J.

PATROCINANTE: Dra. Rosalba Lagos M.

LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR BACTERIANA
ICBM-FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

SANTIAGO - 2011

BIOGRAFÍA

FERNANDA GUTIÉRREZ PÉREZ



Mi nombre es Fernanda Gutiérrez, nací el día 7 de Diciembre de 1984 junto a mi hermana gemela “Javi” en la comuna de Ñuñoa. Vivimos hasta los 5 años en Providencia y después nos cambiamos a Puente Alto. Ahí estudiamos nuestra enseñanza básica y media en el colegio “Los Aromos”.

Luego cada una eligió carreras diferentes. Yo elegí estudiar Bachillerato en Ciencias el año 2003, en la Universidad de Chile. Luego ingrese a la carrera “Ingeniería en Biotecnología Molecular”, el año 2004. Desde ese momento me enfoqué en descubrir mi área de interés, la microbiología. Así es que el año 2007 realice una “Unidad de Investigación” en la empresa Papeles Cordillera S.A. y luego el año 2008 realice una segunda “Unidad de Investigación” en el Laboratorio de Biología Molecular Bacteriana, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en donde el Dr. Omar Orellana y todos mis compañeros de trabajo me brindaron toda la ayuda necesaria para realizarme como persona y como científico.

El año 2009 me cambie de comuna a Providencia, junto a mis padres y mi hermana gemela. Mis dos hermanas mayores viven con sus respectivas familias. Tengo tres sobrinos maravillosos, el Domi (el regalón, 10 años), la José (la loca, 6 años) y la Vicha (la gorda, 2 años).

Actualmente me desempeño como Ingeniero en Entrenamiento en la empresa minera “Doña Inés de Collahuasi”. Trabajo en el área de Desarrollo Lixiviación, específicamente en biolixiviación, por lo que el desarrollo de este “Seminario de Título” me ha servido enormemente para mi desarrollo profesional.

Con cariño dedicada a mi clon...

"mi otro yo"

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un largo camino llegar hasta aquí, así pues quiero dar las gracias de todo corazón a todas las personas que de alguna u otra manera están detrás de este trabajo.

Primero, quiero dar gracias a mi director de seminario, el Dr. Omar Orellana que ha permitido que yo pudiese realizar de la mejor manera mi tesis. Gracias profe, por sus sabias enseñanzas.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, con los cuales comparto día a día, a los que tuvieron que partir y a los que permanecen. Gracias: Carola, David, Clau, Merly, Paula, Assaf, Héctor O., Oscar, Jano, Mario, Héctor D., Pame, Lilly. Gracias Assaf por tener siempre una buena disposición y ganas de enseñar, eres un gran científico y una gran persona. Gracias a la Caro y al David por tantos momentos felices que hemos compartido, los adoro!!.

Gracias a la Dra. Eugenia Jedlicki, al Dr. Carlos Santiviago, a la Dra. Cecilia Toro y al Dr. Aldo Solari por la ayuda recibida.

Gracias al Diego y a la Sandra por ayudarme cuando lo necesite.

A mis amigos de Ciencias a los cuales he tenido la suerte de conocer, son increíbles me han apoyado siempre y he compartido mil y un historias, gracias por estar siempre ahí, los adoro.

Amigas de la vida, son lo más grande, gracias por el apoyo incondicional en todo momento. Gracias a mi Fran, mi Ori, mi Nelly y mi Maquis las quiero mucho.

A mis amigos lindos, mis makinas queridas, que este último tiempo hemos estado un poco distanciados, los quiero muchísimo. Gracias Dario, Matu y Nico.

A mis amigas LP's por tantos momentos felices que vivimos, momentos LP's y más!!. Gracias Clau, Lore, Vale, Ori, Fran, Yu, Giss, Chika.

A mis amigos Nachin y Felipe Hurtado, son lo máximo.

A la Cinthia y a la Sole, las quiero niñas.

A mi familia, a mis padres, en especial a mis hermanas mayores que las adoro y me han dado unos angelitos, una bendición en mi vida, mis sobrinos: Domi, José y Vichita, amo. Han sido una luz en mi camino.

Gracias a lo más importante en mi vida desde siempre literalmente, "mi otro yo" "La Javi" que adoro con todo mi corazón, es mi pilar fundamental desde el principio hasta el final. Me has dado todo y siempre estás ahí para mí en los momentos malos y buenos, no sé qué haría sin ti, sin más palabras, amo.

Por último, y no menos importante le doy gracias al Kate, sin él este logro no hubiese sido posible.

Gracias a los que están lejos y a los que me cuidan desde el cielo.

A todos los que no menciono, pero que han sido importantes...

Gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN... ..	xv
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1. RNA de transferencia.....	1
2. Función y estructura de los tRNA.....	1
3. Organización y procesamiento de los genes que codifican para tRNA en procariotas	4
4. Presencia de intrones en genes que codifican para tRNA.....	5
5. Modelo de estudio: <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	6
6. Genes para tRNA en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	7
7. Hipótesis.....	9
8. Objetivo General	9

9. Objetivos Específicos.....	9
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1. Búsqueda bioinformática de genes que codifican para tRNA.....	11
2. Especies y cepas bacterianas	11
3. Plásmidos y vectores de clonamiento.....	12
4. Oligonucleótidos	13
5. Reactivos	15
6. Equipos.....	15
7. Cultivos bacterianos	16
7.1. Crecimiento de las cepas bacterianas	16
7.2. Mantenimiento de las cepas bacterianas.....	17
7.3. Preparación de las células competentes.....	17
7.3.1. Células quimiocompetentes	17
7.3.2. Células electrocompetentes	18
8. Transformación de una cepa bacteriana	18
8.1. Transformación química.....	18
8.2. Transformación por electroporación	19
9. Aislamiento y purificación de DNA.....	19
9.1. DNA cromosomal bacteriano	19

9.2.	DNA plasmidial.....	20
9.3.	DNA producto de amplificación mediante PCR	20
10.	Precipitación de RNA y DNA	20
11.	Extracción de RNA total	21
11.1	Extracción de RNA total a partir de un kit comercial	21
11.2	Extracción de RNA en condiciones ácidas para ensayos de aminoacilación <i>in vivo</i>	21
12.	Cuantificación de la concentración de RNA y DNA	23
13.	Manipulación y amplificación del DNA	23
13.1	Digestión con enzimas de restricción	23
13.2	Reacción de desfosforilación.....	23
13.3	Reacción de fosforilación.....	24
13.4	Reacción de amplificación por PCR.....	24
13.5	Ligación del inserto (DNA) con el vector	25
13.6	Secuenciación del DNA	25
14.	Electroforesis.....	25
14.1	Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa	25
14.2	Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida denaturantes.....	26
15.	Técnicas con RNA	26

15.1	Ensayos de RT-PCR.....	26
15.2	Ensayos de cRT-PCR.....	28
15.3	Técnicas de hibridación RNA-DNA (Northern blot).....	28
15.3.1.	Transferencia semi-seca o electrotransferencia del RNA.....	28
15.3.2.	Marcación radioactiva de una sonda de DNA.....	28
15.3.3.	Pre-hibridación, hibridación y lavados.....	29
16.	Complementación de una cepa mutante termosensible de <i>Salmonella entérica</i> serovar Typhimurium.....	30
16.1	Clonamiento del gen <i>serTiAf</i> en el plásmido p-SCRhaB.....	31
16.2	Construcción del gen <i>serTaf</i> y clonamiento en el plásmido p-SCRhaB.....	33
RESULTADOS	35
1.	Transcripción y procesamiento de los genes que codifican para tRNA ^{Ser} _{UGA} en <i>A. ferrooxidans</i>	35
2.	Niveles de expresión y aminoacilación <i>in vivo</i> de los tRNA ^{Ser} _{UGA} en <i>A. ferrooxidans</i>	42
3.	Complementación de una mutante termosensible en el gen <i>serT</i> de <i>Salmonella entérica</i> serovar Typhimurium.....	44
4.	Transcripción, procesamiento y funcionalidad de los posibles genes que codifican para tRNA interrumpidos por intrones en <i>A. ferrooxidans</i>	46
DISCUSIÓN.	52

1. Identificación de genes para tRNA en el genoma de las cepas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993.....	53
2. Los genes para tRNA ^{Ser} _{UGA} de <i>A. ferrooxidans</i> se expresan, procesan y son funcionales para la síntesis de proteínas.....	55
3. En <i>A. ferrooxidans</i> existen posibles pseudogenes que codifican para tRNA interrumpidos por intrones, algunos de los cuales se expresan y procesan.....	59
CONCLUSIONES	63
ANEXO 1	64
BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Cepas de <i>A. ferrooxidans</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. typhimurium</i>	11
TABLA 2. Plásmidos y vectores de clonación.....	12
TABLA 3. Oligonucleótidos	13
TABLA 4. Esquema del programa de PCR empleado para la amplificación de fragmentos de DNA o cDNA	25
TABLA 5. Marcación radioactiva de una sonda de DNA.....	29
TABLA 6. Predicción de los posibles genes para tRNA con intrones en <i>A. ferrooxidans</i>	38
TABLA 7. Predicción bioinformática de genes para tRNA de la cepa de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	65

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estructura de los tRNA	2
FIGURA 2. Esquema de la distribución de genes para tRNA en las cepas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 y ATCC 23270	8
FIGURA 3. Esquema a escala de los plásmidos	12
FIGURA 4. Estrategia de clonamiento del gen <i>serTiAf</i>	32
FIGURA 5. Esquema de la construcción del gen <i>serTAf</i>	34
FIGURA 6. Procesamiento del transcrito de los genes <i>serT</i> en <i>A. ferrooxidans</i>	38
FIGURA 7. Estructura primaria y secundaria del tRNA ^{Ser} _{UGA}	40
FIGURA 8. Ensayo de cRT-PCR de los tRNA ^{Ser} _{UGA} en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.	41
FIGURA 9. Expresión y niveles de aminoacilación de los tRNA ^{Ser} _{UGA} , tRNA ^{Ser} _{UGA} y tRNA ^{Gln} _{UUG} de <i>A. ferrooxidans</i> cultivado en medio 9K-Fe ⁺²	43
FIGURA 10. Complementación de la cepa de <i>S. typhimurium</i> TH 3238	45
FIGURA 11. Expresión <i>in vivo</i> en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 de los posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones.....	49
FIGURA 12. Expresión y niveles de aminoacilación del tRNA ^{Cys} ₆₀ de <i>A. ferrooxidans</i> cultivado en medio 9K-Fe ⁺²	50
FIGURA 13. Estructura primaria y secundaria del tRNA ^{Cys} ₆₀	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
tRNA	Ácido ribonucleico de transferencia
aaRS	Aminoacil tRNA sintetasa
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
PNK	T4 polinucleótido kinasa
TEMED	N,N,N',N' – tetrametil etilen diamina
APS	Persulfato de amonio
BSA	Albúmina de suero bovino
A	Adenosina
G	Guanosina
C	Citosina
U	Uracilo
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditioteitrol
EDTA	Ácido etilén diaminotetraacético
kpb	kilo pares de bases
kb	kilo bases
pb	pares de bases
nt	nucleótidos
ORF	Marco de lectura abierto
PCR	Reacción de polimerización en cadena

RT	Transcripción reversa
RT-PCR	Transcripción reversa- Reacción de polimerización en cadena
cRT-PCR	Transcripción reversa- Reacción de polimerización en cadena del círculo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
ICE	elemento integrativo y conjugativo
ATP	adenosina 5'-trifosfato
cDNA	DNA codificante
dNTPs	Desoxiribonucleosidos trifosfato
D.O.	Densidad óptica
Glu	Glucosa
Ram	Rammosa
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
Ser	Serina
Leu	Leucina
Ala	Alanina
Val	Valina
Phe	Fenilalanina
Trp	Triptófano
Thr	Treonina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido Glutámico
Gly	Glicina
Asp	Ácido Aspártico
Lys	Lisina
Ile	Isoleucina

Asn	Asparagina
His	Histidina
Met	Metionina
Pro	Prolina
Cys	Cisteína
Tyr	Tirosina
Arg	Arginina

RESUMEN

Los tRNA son moléculas que participan en la síntesis de proteínas y en otros procesos celulares, siendo su expresión y funcionalidad vitales para la célula. En la biogénesis de los tRNA se sintetizan transcritos primarios que requieren de un procesamiento previo de los extremos y de los posibles intrones, además de modificaciones post-transcripcionales para ser funcionales. Sobre la base de un análisis bioinformático comparativo del genoma de dos cepas secuenciadas de la bacteria extremófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270 y ATCC 53993) se detectó la presencia de dos set de genes para tRNA en la cepa ATCC 23270. Un set de genes para tRNA se encuentra disperso en el genoma y es idéntico al presente en la cepa ATCC 53993. El otro set de genes para tRNA se encuentra dentro de un elemento genético móvil denominado ICE*Af*1 (~300 kpb). El ICE*Af*1 y los genes para tRNA que contiene no están presentes en la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. En ambas cepas de *A. ferrooxidans*, se detectó un gen que codifica para un tRNA^{Ser}_{UGA} interrumpido por un intrón del grupo I. Este tRNA es el único capaz de leer el codón UCA de serina. En la cepa ATCC 23270, existe una copia adicional para este gen localizada dentro del ICE*Af*1 que no está interrumpida por un intrón. Mediante una búsqueda bioinformática de genes para tRNA en el genoma de *A. ferrooxidans*, no se encontraron otros genes para tRNA^{Ser}_{UGA}. Adicionalmente, en este análisis se detectó la presencia de otros posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones (14 en la cepa ATCC 23270 y 11 en la cepa ATCC 53993).

En este trabajo se demostró que los tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans*, son funcionales, ya que se aminoacilan *in vivo* y complementan una cepa de *Salmonella entérica* serovar Thyphimurium que presenta una mutación termosensible en el correspondiente gen para tRNA. Esto indica que estos tRNA participan en la síntesis de proteínas. Por otro lado se estudió la expresión de los otros posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones. Si bien experimentos de RT-PCR muestran que varios de estos genes se transcriben, solamente el tRNA^{Cys}₆₀ presente en el ICEA1 se procesa, pero no se aminoacila *in vivo*. Esto indica que este tRNA podría tener una función alternativa a la síntesis de proteínas. Estos resultados sugieren que el contenido y la funcionalidad de los genes para tRNA en el genoma de *A. ferrooxidans* podría alterarse por transferencia horizontal de genes (ICEA1) y/o la modulación del procesamiento de los intrones existentes. Esto podría generar un repertorio plástico de tRNA que poseen diversas propiedades funcionales.

ABSTRACT

1

The tRNA molecules are involved in the synthesis of proteins and other cellular processes, and its expression and function are vital to the cell. In the biogenesis of tRNA primary transcripts are synthesized that require pre-processing of the ends and of possible introns, as well as post-transcriptional modifications to be functional. On the basis of a comparative bioinformatics analysis of sequenced genomes from two strains of the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270 and ATCC 53993), the presence of two sets of genes for tRNA in strain ATCC 23270 was predicted. One set of tRNA genes is dispersed in the genome and is similar to the one from strain ATCC 53993. The other set of tRNA genes is located within a mobile genetic element called ICE*Af1* (~ 300 kbp). The ICE*Af1* and tRNA genes that it contains are not present in the strain of *A. ferrooxidans* ATCC 53993. In both strains of *A. ferrooxidans*, we detected a gene encoding a tRNA^{Ser}_{UGA} interrupted by a group I intron. This tRNA is the only one able to read the UCA codon for serine. In the strain ATCC 23270, contains an extra copy for this gene located within the ICE*Af1* which is not interrupted by an intron. By a bioinformatic search for tRNA genes in the genome of *A. ferrooxidans*, no extra tRNA^{Ser}_{UGA} genes were found. Additionally, in this analysis presence of other tRNA genes interrupted by introns (14 in strain ATCC 23270 and 11 in strain ATCC 53993), was predicted.

In this work we showed that tRNA^{Ser}_{UGA} in *A. ferrooxidans*, are functional, as they are aminoacylated *in vivo* and complement a strain of *Salmonella enterica* serovar

Thyphimurium which has a thermosensitive mutation in the corresponding tRNA gene. This indicates that these tRNA involved in protein synthesis. On the other hand, we studied the expression of other possible tRNA genes interrupted by introns. While RT-PCR experiments show that several of these genes are transcribed, only tRNA^{Cys}₆₀ present in the ICEA1 is processed, but not aminoacylated *in vivo*. This indicates that this tRNA could have an alternative function to the synthesis of proteins. These results suggest that the content and functionality of the genes for tRNA in the genome of *A. ferrooxidans* could be altered by horizontal gene transfer (ICEA1) and / or modulating the processing of existing introns. This could lead to plastic tRNA repertoire that have different functional properties.

INTRODUCCIÓN

1. RNA de transferencia

Los RNA de transferencia (tRNA) son las moléculas adaptadoras responsables de la traducción de los codones del RNA mensajero (mRNA) a aminoácidos en una proteína, jugando un papel central en la expresión génica (Söll y Rajbhandary, 1995). Esto los ha convertido en una macromolécula atractiva para el estudio de las bases moleculares de la función de los RNA, desde su descubrimiento hace más de cinco décadas (Hoagland *y cols.*, 1958).

2. Función y estructura de los tRNA

La función principal de los tRNA es transferir un aminoácido activado de manera específica al polipéptido naciente en el ribosoma para la síntesis de proteínas. Para ello, las enzimas aminoacil-tRNA-sintetasas (aaRS) esterifican los tRNA con el aminoácido adecuado según el anticodón, formando los aminoacil-tRNA. Estas aaRS tienen la capacidad de reconocer específicamente tanto al tRNA como al aminoácido correspondiente (Meinzel *y cols.*, 1995; Cathopoulos *y cols.*, 2007).

La primera secuencia completa de un tRNA fue establecida por Holley *y cols.* en el año 1965, en donde se determinó la estructura primaria y las posibles estructuras secundarias de un tRNA^{Ala} (Dirheimer *y cols.*, 1995). La estructura secundaria de los tRNA viene dada por la capacidad que tienen los tRNA de plegarse, ya que existen apareamientos entre secuencias cortas de bases complementarias formándose una estructura en forma de trébol (Figura 1A). Dentro de esta estructura se pueden identificar

cuatro elementos característicos: 1) el brazo D (su nombre proviene de la presencia de bases G modificadas a dihidouridina (D)); 2) el brazo del anticodón; 3) el brazo T (brazo T ψ C), donde se encuentra la secuencia T ψ C conservada en todos los tRNA (ψ = pseudouridina); y 4) el brazo aceptor que posee la secuencia CCA en el extremo 3' terminal por la cual se une el aminoácido (Dirheimer y cols., 1995). Entre el brazo T y el brazo del anticodón existe un brazo de largo variable entre los diferentes tRNA.

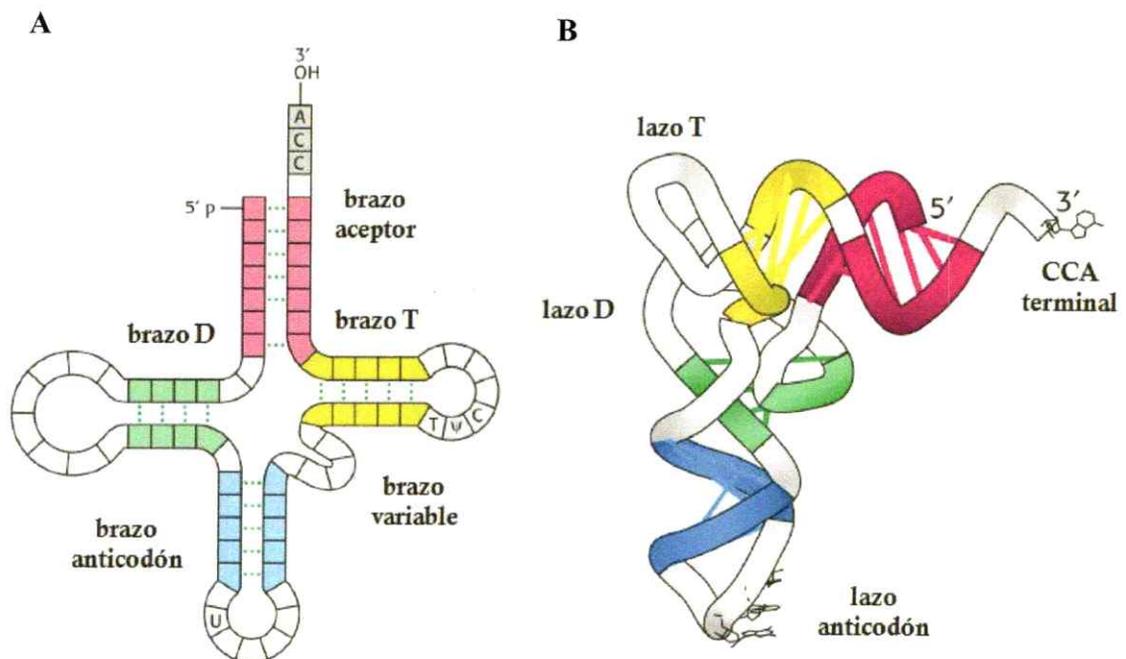


Figura 1. Estructura de los tRNA. A. Estructura secundaria de los tRNA (forma de trébol). B. Estructura terciaria de los tRNA (forma de L). Se observan los brazos característicos de un tRNA: brazo D (color verde), brazo del anticodón (color azul), brazo T (color amarillo) y el brazo aceptor (color rosado). La región extra, correspondiente al brazo variable se muestra en color blanco (lazo variable) (Adaptado de Berg y cols., 2002)

Generalmente los tRNA tienen entre 75 y 90 nucleótidos (nt) de longitud y las posiciones se numeran desde el extremo 5' al 3' según la secuencia patrón de 76 nt

descrita por Sprinzl *y cols.* en 1998 (Sprinzl *y cols.*, 1998), siendo la secuencia del anticodón siempre los nucleótidos 34, 35 y 36. En los tRNA existen nucleótidos conservados, por ejemplo en la posición 33 siempre hay uracilo (U), al menos para los tRNA que participan de la síntesis de proteínas ya que es un nucleótido clave para la unión del tRNA al ribosoma (Phelps y Joseph, 2005). Otros nucleótidos se encuentran semiconservados, es decir, presentan purinas o pirimidinas pero sin especificar el tipo de base, por ejemplo en la posición 37 siempre hay una purina (A o G) y en la posición 38 siempre hay una pirimidina (C o U) y el resto de los nucleótidos varían para cada especie de tRNA (Dirheimer *y cols.*, 1995).

Según estudios cristalográficos por rayos X, los tRNA tienen una estructura tridimensional en forma de L invertida que se encuentra estabilizada por interacciones de puentes de hidrógeno principalmente entre las bases no apareadas en la estructura secundaria. Algunos de los nucleótidos que juegan un papel determinante en el plegamiento de la estructura terciaria están en las posiciones 14, 15, 18 y 19 presentes en el lazo del brazo D (Marck y Grosjean, 2002). La Figura 1B muestra la estructura tridimensional general que adoptan los tRNA con el anticodón en uno de los extremos de la molécula y el brazo aceptor en el extremo opuesto (Dirheimer *y cols.*, 1995).

Además de tener una función crucial en la síntesis de proteínas, algunos tRNA cumplen funciones alternativas, por ejemplo los tRNA^{Lys}, tRNA^{Phe} y tRNA^{Tyr} tienen la capacidad de regular la expresión de algunas aaRS (Ryckelynck *y cols.*, 2005); los tRNA^{Gly} y tRNA^{Ser} se han visto implicados en la síntesis de peptidoglicano (Petit *y cols.*, 1968; Francklyn y Minajigi, 2010) y los tRNA^{Lys} y tRNA^{Ala} en la modificación de lípidos (Francklyn y Minajigi, 2010).

3. Organización y procesamiento de los genes que codifican para tRNA en procariontes

En bacterias, el número total de genes que codifican para tRNA en los diferentes genomas varía desde ~30 a >100 (Li y cols., 2005). Los genes para tRNA en el genoma bacteriano se pueden organizar de tres maneras distintas: 1) como un gen individual generando un transcrito monocistrónico, 2) formando parte de operones junto a otros genes para tRNA o RNA ribosomal (rRNA), ó 3) agrupados con genes que codifican para proteínas, generando un transcrito policistrónico desde un promotor común (Withers y cols., 2006). La distribución de estos genes para tRNA dentro de transcritos monocistrónicos o policistrónicos varía a través de los diferentes organismos. Algunas bacterias como *Bacillus subtilis* tienen la mayoría de sus genes para tRNA codificados dentro de operones policistrónicos, mientras que otras bacterias como *Streptomyces coelicolor* tienen casi todos sus genes para tRNA organizados en unidades transcripcionales monocistrónicas (Pettersson, 2009).

Los genes para tRNA se transcriben activamente, llegando en levaduras a producir 3 millones de moléculas de tRNA por generación (Phizicky y Hopper, 2010). Cuando se transcriben los genes para tRNA ya sea en unidades transcripcionales monocistrónicas o policistrónicas, se forma un pre-tRNA con secuencias extra de tamaño variable en sus extremos 5' y 3', las cuales necesitan ser procesadas para formar un tRNA maduro y funcional. El procesamiento de los tRNA consiste en una serie de reacciones post-transcripcionales que incluyen: 1) remoción de la secuencia 5' extra por la enzima RNasa P; 2) remoción de la secuencia 3' extra por diferentes endonucleasas y

exonucleasas; 3) adición de la secuencia CCA en el extremo 3' por la enzima tRNA-nucleotidil-transferasa y procesamiento de los intrones cuando corresponda; y 4) modificaciones múltiples en los nucleótidos de los tRNA (estas bases modificadas son muy importantes en la estabilización estructural de los tRNA y en sus propiedades funcionales, tal como en la aminoacilación y la unión al codón del mRNA) (Börjk, 1995; Weiner, 2004; Pettersson, 2009). Actualmente, aún no está claro si estas reacciones siguen este orden específico, ya que por ejemplo se ha determinado que la remoción de los intrones puede ocurrir en cualquier momento del tiempo de maduración de los tRNA (Pettersson, 2009).

4. Presencia de intrones en genes que codifican para tRNA

Los intrones en genes para tRNA se han encontrado en los tres dominios filogenéticos: Bacteria, Arquea y Eucaria. El primer reporte de un gen para tRNA interrumpido por un intrón fue descrito en el año 1977 (Goodman *y cols.*, 1977). En esta investigación se determinó que un gen de levadura que codifica para un tRNA^{Tyr} se encuentra interrumpido por un intrón de 14 pares de bases (pb). Por otro lado, en el año 1990 se descubrió por primera vez un intrón en genes que codifican para tRNA^{Leu} de bacterias (Smith, 1991).

Hasta la fecha los genes que codifican para RNA estables de bacterias poseen dos clases de intrones que según diferencias estructurales y el mecanismo de maduración se clasifican en intrones del grupo I e intrones del grupo II (Hanger *y cols.*, 2005). Los intrones del grupo I y del grupo II son miembros de los RNA que se auto-procesan. Se ha determinado en experimentos *in vitro* que estos intrones no requieren de proteínas

catalíticas, pero que sin embargo *in vivo* podrían requerir de una proteína como cofactor que ayude a la mantención de la estructura del RNA correcta para la autocatálisis (Westaway y Abelson, 1995). Los intrones presentes en tRNA de bacterias se encuentran comúnmente cerca del anticodón (Kawach y cols., 2005; Vepritskiy y cols., 2001). Un dato importante es que la mayoría de los genes bacterianos que codifican para tRNA no contienen intrones, a diferencia de eucariotas y arqueas que tienen 4-25% de sus genes para tRNA con intrones (Pettersson, 2009).

5. Modelo de estudio: *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria, Gram negativa, quimiolitotrofa que obtiene la energía para su proliferación desde la oxidación de minerales que contienen hierro o azufre. Prolifera a 30°C, a pH 1-2 y fija tanto carbono como nitrógeno (este último sólo en anaerobiosis) desde la atmósfera. Es abundante en ambientes naturales asociados con cuerpos de mineral pirita, yacimientos de carbón y otros drenajes ácidos (Rawlings y Kusano, 1994; Rawlings y Silver, 1995; Valdés y cols., 2008a).

Este microorganismo es de gran interés por su peculiar fisiología y por su uso en el procesamiento de minerales industriales (Valdés y cols., 2008a). Fue la primera bacteria descrita capaz de solubilizar cobre y otros metales desde rocas (Colmer y Hinkel, 1947).

A. ferrooxidans es considerado un modelo de estudio para la biominería, lo que ha impulsado el desarrollo de una serie de investigaciones para entender los procesos fisiológicos y metabólicos que le permiten adaptarse a ambientes extremos (bajo pH y

altas concentraciones de metales pesados). Un análisis comparativo del genoma de *A. ferrooxidans* con los genomas de especies biolixiviantes estrechamente relacionadas, *A. thiooxidans* y *A. caldus*, reveló una región de DNA que solo se encuentra presente en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, pero no en los otros acidithiobacilli (Valdés y cols., 2008b). Por otro lado, un análisis bioinformático comparativo del genoma de dos cepas secuenciadas y anotadas de *A. ferrooxidans* (ATCC 23270 y ATCC 53993, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) reveló la presencia de un segmento de 300 kilo pares de bases (kpb) exclusivo de la cepa ATCC 23270 (Levicán y cols., 2009). Este es el mismo segmento que no está presente en los otros acidithiobacilli analizados por Valdés y cols. (2008b). Se determinó que esta región tiene características de un elemento integrativo y conjugativo (ICE) y se denominó ICE*Af1*. Los ICE son una clase de elementos genéticos móviles auto-transmisibles que contribuyen al intercambio horizontal de genes entre bacterias (Wozniak y Waldor, 2009). Generalmente se insertan en genes para tRNA. En este caso particular el ICE*Af1* está inserto en un gen para tRNA^{Ala}.

6. Genes para tRNA en *Acidithiobacillus ferrooxidans*

En la investigación realizada por Levicán y cols. (2009) mediante herramientas bioinformáticas se identificaron los genes para tRNA presentes en los genomas de las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 de *A. ferrooxidans*. Con este análisis se logró determinar que la cepa ATCC 23270 posee dos sets de genes para tRNA: uno correspondiente a genes para tRNA localizados dispersos en el cromosoma y otro en que los genes para tRNA se encuentran agrupados dentro del ICE*Af1*. La cepa ATCC 53993 solamente posee el primer set de genes para tRNA (Figura 2).

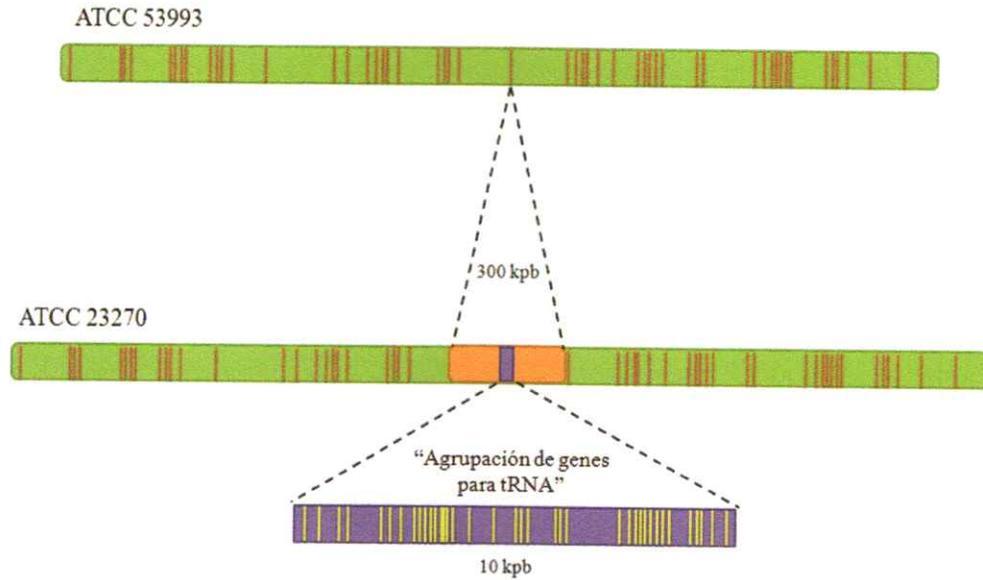


Figura 2. Esquema de la distribución de genes para tRNA en las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y ATCC 23270. En color naranja se señala la región de 300 kpb exclusiva de la cepa ATCC 23270; en color morado se detalla la “agrupación de genes para tRNA” y en color rojo genes para tRNA dispersos en el genoma y amarillos se señalan los genes para tRNA de la “agrupación de tRNA”.

Antecedentes previos de nuestro laboratorio señalan que el ICE*Af1* correspondería a un elemento móvil activo ya que es capaz de circularizarse y escindir del cromosoma (Bustamante *y cols*, 2009). Estos antecedentes sugieren que el elemento ICE*Af1* presente en la cepa ATCC 23270 puede contribuir al flujo génico lateral, incluidos los genes para tRNA, entre *A. ferrooxidans* y otros microorganismos de la comunidad biolixivante.

Del análisis bioinformático se reveló que en la cepa ATCC 53993 existe un gen para tRNA^{Ser}_{UGA} interrumpido por un intrón de 220 pb presente en una sola copia en el genoma. Este tRNA se considera esencial ya que es el único capaz de descodificar el

codón UCA correspondiente a serina en la síntesis de proteínas. Hasta el momento no se ha descrito ningún otro tRNA que pueda leer este codón de serina, por lo que en *A. ferrooxidans* ATCC 53993 el intrón en este tRNA tendría que procesarse para que sea funcional. Este mismo gen para tRNA^{Ser}_{UGA} interrumpido por un intrón de 220 pb se encontró en la cepa ATCC 23270 en el set disperso en el genoma, es decir fuera del ICEAfl. Sin embargo, la cepa ATCC 23270 posee una copia adicional de este gen no interrumpida por un intrón localizada en el ICEAfl. Hasta el momento no se ha descrito ni caracterizado un tRNA interrumpido por un intrón en una bacteria extremófila.

Con los antecedentes analizados, se propone la siguiente hipótesis:

7. Hipótesis: Los genes para tRNA interrumpidos por intrones en *Acidithiobacillus ferrooxidans* son funcionales.

8. Objetivo General: Estudiar la expresión, procesamiento y funcionalidad de los genes que codifican para un tRNA esencial (tRNA^{Ser}_{UGA}) y otros genes para tRNA interrumpidos por intrones en las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993.

9. Objetivos Específicos:

- 1) Identificar los genes para tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans*, y estudiar su expresión y procesamiento.
- 2) Determinar los niveles de expresión y aminoacilación *in vivo* de los tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans*.
- 3) Estudiar la funcionalidad en la síntesis de proteínas de los tRNA^{Ser}_{UGA}.

- 4) Identificar y estudiar la expresión *in vivo* de otros posibles genes que codifican para tRNA interrumpidos por intrones en *A. ferrooxidans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Búsqueda bioinformática de genes que codifican para tRNA

Se utilizó el genoma de dos cepas secuenciadas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 obtenidas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para realizar la búsqueda de genes que codifican para tRNA, usando el programa ARAGORN (<http://130.235.46.10/ARAGORN/>) (Laslett y Canback, 2004). Este programa detecta genes para tRNA interrumpido y no interrumpido por intrones, y genes para tmRNA. Los intrones de los posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones se utilizaron en una búsqueda de similitud de secuencia utilizando Blastn contra la base de datos de NCBI y contra bases de datos de intrones tipo I (<http://www.rna.whu.edu.cn/gissd/help.html>) (Zhou y cols., 2008) y tipo II (<http://www.fp.ucalgary.ca/group2/introns/>) (Dai y cols., 2003) para detectar su posible clasificación.

2. Especies y cepas bacterianas

Las cepas de *A. ferrooxidans*, *E. coli* y *S. typhimurium* que se emplearon en esta tesis se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *A. ferrooxidans*, *E. coli* y *S. typhimurium*.

Cepas	Genotipo/Descripción	Fuente
<i>A. ferrooxidans</i>		
ATCC 23270	Silvestre	ATCC
ATCC 53993	Silvestre	ATCC
<i>E. coli</i>	SupE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1	Novagen
DH5α	gyrA96 thi-1 relA1	
<i>S. typhimurium</i>	<i>serT</i> (fla-5398, ts-lethal) <i>ataA</i> ::[P22 sieA44 Kn-9 PflIC(-435-->+6)-cat 9+] flgM5208::MudB	Chevance y cols., 2006

3. Plásmidos y vectores de clonamiento

Los plásmidos y vectores utilizados para el desarrollo de esta tesis se detallan en la Tabla 2. Por otro lado, a modo informativo se adjuntan los diagramas de los diferentes plásmidos utilizados (Figura 3).

Tabla 2. Plásmidos y vectores de clonación.

	Nombre	Descripción	Fuente
VECTOR	pGEM-T Easy	Vector de 3015 pb utilizado para clonar productos de PCR y RT-PCR. Resistencia a Ampicilina	Promega
	p-SCRhaB	Vector de 7519 pb utilizado para clonar los genes que codifican para tRNA ^{Ser} _{UGA} . Posee un promotor inducible por ramnosa. Resistencia a trimetoprim.	Vector no comercial, facilitado por el Dr. Carlos Santiviago, Laboratorio de Microbiología, ICBM.
PLÁSMIDOS	p-SCRhaB- <i>serTiAf</i>	Plásmido derivado de p-SCRhaB que contiene el gen <i>serT</i> con intrón de <i>A. ferrooxidans</i>	Esta tesis
	p-SCRhaB- <i>serTAf</i>	Plásmido derivado de p-SCRhaB que contiene el gen <i>serT</i> sin intrón de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	Esta tesis

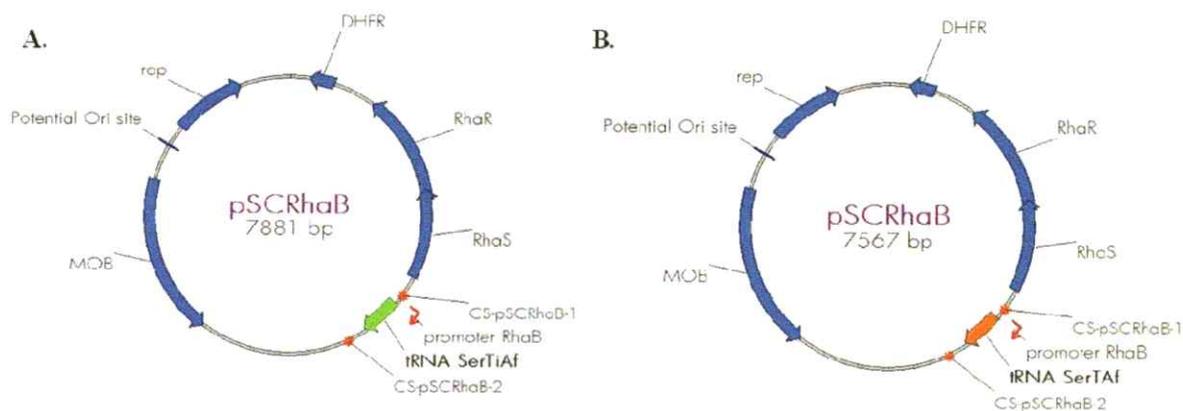


Figura 3. Esquema a escala de los plásmidos utilizados en este trabajo, donde se detallan sus características más relevantes. En A. p-SCRhaB-*serTiAf* y B. p-SCRhaB-*serTAf*.

4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para el desarrollo de esta tesis se detallan en la Tabla 3 y fueron obtenidos de IDT-Fermelo. Aquellos oligonucleótidos específicos de cada técnica se mencionarán junto con la técnica en que fueron utilizados.

Tabla 3. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia (5'- 3')	Temperatura de Asociación (°C)
Clonamiento del gen <i>serTiAf</i>		
tRSer-intrón-F (P1) ^(a)	CATATGATTCCGGAGGTGTGGCAGAGCG	88
tRSer-intrón-R (P2)	TAATCTGGCGGAGGCGGTGAGA	70
Construcción del gen <i>serTAf</i>		
tRSercluster1 ^(a)	TATGATTCCGGAGATTTGGCCGAGTGGTTT AAGGCAGCGGTCTTGAAAATCGCCGGGC	178
tRSercluster2 ^(a)	GCCTCTGGCGTTCCCTGGGTTCGA ATCCCAGAGTCTCCGCCAGATTAA	152
tRSercluster3 ^(a)	AGCTTTAATCTGGCGGAGACTCTGGGATTC GAACCCAGGGAACGCCAGAGGCGCCCGGC	192
tRSercluster4 ^(a)	GATTTTCAAGACCGCTGCCTTAAAC CACTCGGCCAAATCTCCGGAATCA	146
cRT-PCR		
RT-SerTi-F	CCTCCGCCAGGAGGTGTG	62
RT-SerTi-R	CGGTGAGATTCGAACTCACG	62
RT-SerT-F	CCAGAGTCTCCGCCAGGAG	64
RT-SerT-R	GATTCGAACCCAGGGAACGC	64
RT-PCR		
RT-SerT-intrón-F	GGAGGTGTGGCAGAGCGG	62
RT-SerT-intrón-R	TGGCGGAGGCGGTGAGAT	60
tRNASerT-RT1-F	GGAGATTTGGCCGAGTGG	58
tRNASerT-RT2-R	GCGGAGACTCTGGGATTC	58
RT-90-GlyUCC-F	GCCGCTGTACAGTGGCG	58
RT-90-GlyUCC-R	GCGGACACTGACCGGGG	60
RT-65-GlyUCC-F	GGCGGCCTTGCCGGGTT	60
RT-65-GlyUCC-R	AGTTGGCCTCCGGAATGG	58

RT-84-AlaGGC-F	GCGGGCGCTGGATCGG	58
RT-84-AlaGGC-R	GGACAGGTGACCGGCGT	58
RT-37-AlaGGC-F	GCAGAAATAGCTTACGGAAAG	60
RT-37-AlaGGC-R	TGGAGCAGAAAGTGCGAGT	58
RT-3-AspGUC-F	GGGCGGTATGGAACAGCC	60
RT-3-AspGUC-R	GTGGGCGGTCAGTGTCTG	60
RT-60-CysACA-F	GATCAGGTAGCTCAGTGGAA	60
RT-60-CysACA-R	TGGCGACCAGGGGTGGAT	60
RT-16-IleGAU-F	GTGAGCAATGGCGGGAATG	60
RT-16-IleGAU-R	GGGTGAGCAGCAGACCAT	58
RT-69-LeuCAG-F	CCATGGGTGGTTGATGGGT	60
RT-69-LeuCAG-R	GCTCATGGGCACGGCGT	58
RT-25-LeuCAA-F	TCATTGGCCTGGTGGAGAA	58
RT-25-LeuCAA-R	GTCCACAGACTCCTGTTCC	60
RT-23-LeuCAG-F	TGGCGTGTGGCGCGCAT	58
RT-23-LeuCAG-R	CCAGCGCATAAAGGCTCC	58
RT-12-LeuGAG-F	GCTTGGTTGGAAAGCGTATTT	60
RT-12-LeuGAG-R	AACCTGGCCACAGGACTC	58
RT-74-LysUUU-F	GGACTGGCGAGTGCCGTT	60
RT-74-LysUUU-R	GGGACAGGTCCGAAGACT	58
RT-97-TyrAUA-F	TCGCCAGTTGGATCGGTG	58
RT-97-TyrAUA-R	GGCCACCAGTATGGAGGC	60
RT-64-ValCAC-F	TGGTGGTGTGGGCCGGA	58
RT-64-ValCAC-R	TGGTGGGCGGTGCAGGG	60
Northern blot ^(b)		
55-SerT-Sonda1	TTTCAAGACCGCTGCCTTAAACCAC	74
75-SerTi-Sonda1	TTTCAAGACCGGTGCAATCAACCGC	76
91-Gln-Sonda1	ATCAAAATCCGGTGCCTTACCGCTT	74
Direccionalidad en el vector p-SCRhaB		
CS-pSCRhaB-1(F)	CACGTTTCATCTTCCCTGGT	60
CS-pSCRhaB-2 (R)	ACGGCGTTCACTTCTGAGT	60

Los oligonucleótidos directos se señalan con una letra F, los oligonucleótidos reversos se señalan con una letra R. ^(a) Oligonucleótidos que presentan sitios de restricción señalados en letra negrita. ^(b) Para el ensayo de Northern blot del tRNA^{Cys}₆₀ se utilizó el oligonucleótido reverso diseñado para el ensayo de RT-PCR. Los números utilizados al inicio del nombre de los oligonucleótidos o después de las letras RT corresponden a un patrón usado según la lista de tRNA utilizada en esta tesis (ver Tabla 7, Anexos 1)

5. Reactivos

Todos los desoxiribonucleótidos, endonucleasas de restricción, FastAP, marcadores de peso molecular para DNA (100 pb y 1 kb), PNK y M-MuLV Transcriptasa Reversa proceden de Fermentas. Los siguientes reactivos se adquirieron en Sigma Chemical Co. (USA): lisozima, BSA, antibióticos, TEMED, PSA, bromuro de etidio, DTT, 2-mercaptoetanol, xilen-cianol FF, azul de bromofenol, Ficoll, polivinilpirrolidona. El SDS se obtuvo en United States Biochemicals Co. (USA). La T4 DNA ligasa y T4 RNA ligasa se obtuvieron de New England Biolabs. La *pfu* DNA polimerasa se adquirió en Agilent y la *Paq* DNA polimerasa en Stratagene. Los siguientes reactivos se obtuvieron en Invitrogen: ThermoScript RNase H- Reverse Transcriptase y fenol saturado ácido (pH 4). Todas las sales, ácidos, bases y compuestos orgánicos de grado analítico proceden de Merck, Fluka, JT Baker, Sigma Co o Winkler Ltda. El DNA de espermatozoos de salmón fue de Promega Corp. Los reactivos para medios de cultivo: triptona, extracto de levadura y agar, se adquirieron en Mo Bio Laboratories, Inc. La membrana de nylon Hybond-N+ fue de Amersham Biosciences y el papel 3MM fue de Whatman. Los compuestos radiactivos [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP se obtuvieron de Fermelo.

6. Equipos

Los aparatos utilizados como cubetas, electroporador, fuentes de electroforesis, balanzas, centrifugas de mesa, incubadores, pHmetro, espectrofotómetro etc. son los habituales en un laboratorio de biología molecular. Otros equipos utilizados en esta

Tesis, se detallan a continuación: Cámara de transferencia semi-seca (Owl) y escáner PhosphoImager, Personal Molecular Imager FX (BioRad)

7. Cultivos bacterianos:

7.1. Crecimiento de las cepas bacterianas

La cepa de *E. coli* se cultivó en medio Luria Bertani (LB) (Tryptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 1% p/v) o en medio LB suplementado con antibiótico a 37°C con agitación hasta la concentración requerida, se utilizó para la propagación de plásmidos. Para preparar los medios sólidos se agregó agar a una concentración de 1,5% p/v. Se esterilizó por autoclave durante 20 min a 15 atm. El crecimiento bacteriano se controló midiendo la densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro a 600 nm (D.O.₆₀₀). Las bacterias se colectaron por centrifugación a 4700 g por 5 minutos.

La cepa de *Salmonella entérica* se cultivó en medio Luria Bertani (LB) suplementado con antibiótico a 30°C y a 42°C según fuese necesario, se utilizó para ensayos de complementación.

Los medios se suplementaron con antibióticos en algunos casos a una concentración adecuada (ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 10 µg/ml, trimetoprim 50 µg/ml). Para la selección por expresión del gen β-galactosidasa se suplementó con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-tiogluco-pironósido) 80 µg/ml. Para la inducción del promotor T7 se suplementó con IPTG 0,5 mM. Para la inducción del promotor RhaB se

suplemento con ramnosa 0,2% y para la represión del mismo se suplemento con glucosa 0,2%.

Las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 se mantuvieron por cultivos sucesivos a 30°C con agitación constante en medio 9K-Fe²⁺ (K₂HPO₄ x 3H₂O 0,04 g/l, MgSO₄ 0,4 g/l, (NH₄)₂SO₄ x 7H₂O 0,1 g/l y FeSO₄ x 7H₂O 33,3 g/l), se ajustó el pH 1,6 con H₂SO₄ concentrado y se esterilizó por filtración en filtros Stericup 0.22 µm de Millipore. Se controló el crecimiento por recuento directo de las bacterias totales en una cámara Petroff-Hausser. Las bacterias se colectaron en fase tardía del crecimiento exponencial mediante centrifugación a 7.200 g x 10 min.

7.2. Mantenimiento de las cepas bacterianas

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó almacenando a -80°C los cultivos crecidos en medio líquido y para el caso de *Salmonella entérica* y *E. coli* se añadió al medio glicerol 60%.

7.3. Preparación de las células competentes

7.3.1. Células quimiocompetentes

Para preparar las células quimiocompetentes se utilizó el Método Cloruro de Rubidio (RbCl), el cual consistió en crecer las células en 100 ml de medio LB, con agitación o aireación abundante hasta una D.O.₆₀₀ de 0,4, se mantuvo el cultivo en hielo durante 15 min, posteriormente se centrifugó a baja velocidad (1.000 g a 4°C durante 5 min), se resuspendieron suavemente las células en 30 ml de buffer TFBI (CH₃CO₂K 30

mM, RbCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, Glicerol 15%, se lleva a pH 5,8 con ácido acético diluido) frío y se mantuvo en hielo durante 15 min, luego se centrifugó a baja velocidad nuevamente y se resuspendieron las células en 3 ml del buffer TFBII (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, RbCl 10 mM, Glicerol 15%, se lleva a pH 6,5 con NaOH diluido) frío y se mantuvo en hielo durante 15 min, luego se alícuoto y almacenó a -80°C cuando no fueron usadas inmediatamente.

7.3.2. Células electrocompetentes

Se utilizó un cultivo de células crecido toda la noche en medio LB con agitación constante para inocular 5 ml de medio LB, el cual se incubó con agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,6, posteriormente se centrifugó a 1800 g a 4°C por 10 min y se eliminó el sobrenadante, luego las células se lavaron tres veces con 5 ml de agua destilada, estéril y fría, centrifugando cada vez a 1800 g a 4°C por 10 min, finalmente se resuspendió en 200 µl de agua destilada, estéril y fría. Estas células fueron utilizadas inmediatamente.

8. Transformación de una cepa bacteriana

8.1. Transformación Química

Para transformar células quimiocompetentes se mezclaron 50 µl de células en estado competente y 2-5 µl del DNA plásmidico, los cuales se mantuvieron en hielo durante 20 min, a continuación se realizó un choque térmico a 42°C durante 50 s para favorecer la entrada del DNA exógeno, y se puso inmediatamente en hielo. Posteriormente se añadió 950 µl de medio LB a temperatura ambiente y se incubó con

agitación constante durante 90 min. Finalmente se plaqueó 50-100 μ l del cultivo transformado en placas con medio LB agar más el antibiótico adecuado y se incubó toda la noche a la temperatura deseada.

8.2. Transformación por electroporación

Para transformar células electrocompetentes se mezclaron 70 μ l de células electrocompetentes con 2 μ l del DNA plásmidico y se depositaron entre los electrodos de una cubeta para electroporar previamente enfriada y sin introducir burbujas. Se colocó la cubeta en el electroporador y se aplicó un pulso de 1800 V, 25 μ F y 200 Ω , posteriormente se agregó 1 ml de medio LB a la cubeta, resuspendiendo suavemente las células que fueron transformadas. Luego se transfirió de manera estéril a un tubo de cultivo en donde se recuperaron las células incubándolas por 90 min con agitación constante, finalmente se plaqueó 50-100 μ l del cultivo transformado en placas con medio LB agar más el antibiótico adecuado y se incubó toda la noche a la temperatura deseada.

9. Aislamiento y purificación de DNA

9.1. DNA cromosomal bacteriano

La extracción del DNA genómico de *A. ferrooxidans* se efectuó a partir de cultivos crecidos a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial tardía en medio 9K-Fe²⁺ con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) según indicaciones del proveedor.

9.2. DNA plasmidial

Para la purificación del DNA plasmidial se utilizó el sistema QIAprep® spin Miniprep kit (Qiagen). Se creció un cultivo de células en 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado por 12 h, con agitación o aireación abundante y se colectaron las células por centrifugación a 22.000 g por 1 min. Las bacterias se sometieron a lisis alcalina y el DNA plasmidial se purificó por cromatografía de intercambio iónico según las indicaciones del proveedor.

9.3. DNA producto de amplificación mediante PCR

Para purificar fragmentos derivados de reacciones de PCR o de digestiones con enzimas de restricción desde geles de agarosa, se utilizó el sistema HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Real Genomics) ó el sistema Spin Prep.™ Gel DNA Kit (Novagen) según las instrucciones del proveedor.

10. Precipitación de RNA y DNA

Las precipitaciones con etanol se realizaron con el propósito de concentrar el DNA y/o RNA y eliminar las sales. Se le agregó un décimo de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto frío a la muestra, posteriormente se dejó a -80° C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron a 19000 g por 30 min y luego se lavaron con etanol 70 % frío. Finalmente, se secaron al vacío y se resuspendieron en agua estéril o en soluciones detalladas en el protocolo.

11. Extracción de RNA total

11.1. Extracción de RNA total a partir de un kit comercial

Para la realización de RT-PCR y RT-PCR del círculo (cRT-PCR) se extrajo RNA a partir de 500 ml de cultivo de *A. ferrooxidans* en fase exponencial tardía crecido en medio 9K-Fe²⁺, se colectaron las células y se suspendieron en 100 µl de buffer TE pH 8 (Tris 10 mM (ajustar el pH a 8 con HCl), 1 mM EDTA). Luego se agregó 10 µl de buffer de lisis libre de RNasa (Tris-HCl 0,5M pH 6,8, EDTA 20 mM, SDS 10%) y se mezcló suavemente por pipeteo. Se colocó la mezcla en un baño de agua hirviendo durante 3 min y se dejó enfriar a T° ambiente. Estos pasos son necesarios para garantizar la ruptura de las células sin dañar el RNA. Los pasos siguientes son fidedignos al protocolo del kit de extracción de RNA de Qiagen.

11.2. Extracción de RNA en condiciones ácidas para ensayos de aminoacilación *in vivo*.

Para realizar los ensayos de aminoacilación *in vivo* se procedió a extraer RNA en condiciones ácidas para evitar que los tRNA se desacilen durante el procedimiento, bajo estas condiciones se estabiliza la unión aminoacil-tRNA. Luego la preparación de tRNA se somete a un tratamiento con peryodato que destruye la actividad libre de los tRNA no aminoacilados y mediante la adición de una amina se puede remover la adenosina terminal del extremo 3' terminal de los estos tRNA.

Para ello se extrajo RNA a partir de 2 L de cultivo de *A. ferrooxidans* en fase exponencial tardía crecido en medio 9K-Fe²⁺, se colectaron las células y se lavaron con ácido sulfúrico 10mM para eliminar la jarosita (HFe₃(SO₄)₂(OH)₆). Luego se lavó el pellet con buffer TE pH 8. Las células se resuspendieron en un buffer de suspensión (EDTA 1mM, acetato de sodio 0,3M pH 5,2) y se agregó 500 µl de fenol ácido, se agitó en un vortex y se dejó en hielo durante 10 min con agitación. Las fases se separaron por centrifugación a 16.000 g por 10 min. Se precipitó el RNA desde la fase acuosa, luego el RNA obtenido se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada ácida. Se separó el RNA en dos fracciones de 25 µl cada una. A una de las fracciones se le agregó 1,4 µl de acetato de sodio 0,3M pH 5,2 y se congeló a -80°C. Por otro lado, la otra fracción de RNA fue tratada a pH básico con el fin de desacilar los tRNA, para ello se agregó 6,3 µl de Tris-acetato 1M pH 9 y se incubó a 37°C durante 1 h y 30 min. Luego se procedió a precipitar el RNA desacilado. La muestra se seco a T° ambiente y se le agregó 25,4 µl de acetato de sodio 50 mM pH 5,2. En este punto se descongela el RNA no desacilado.

A ambas fracciones de RNA, tanto la fracción desacilada (no protegida) como a la fracción no desacilada (protegida) se les realiza el mismo tratamiento que tiene como último fin eliminar la adenosina terminal de los tRNA desacilados y dejar intactos los tRNA acilados. Es así como, a través de una electroforesis en cámaras de secuenciación, se puede distinguir por una migración diferencial de los tRNA el nivel de aminoacilación de los tRNA *in vivo*. Este tratamiento consistió en agregar 4,84 µl de una solución de peryodato de sodio (NaIO₄) 250 mM a las muestras y se dejó en oscuridad y en hielo durante 1 h y 30 min, luego se agregó 13 µl de glucosa 20% y se incubó en

oscuridad y en hielo durante 1 h y 30 min, luego se precipitó el RNA. El RNA se resuspendió en 250 μ l de lisina 0,5M pH 8, se incubó durante 1 h a 45°C y se procedió a precipitar el RNA. Finalmente el RNA se resuspendió en 10 μ l de agua bidestilada ácida.

Todas las soluciones se trataron previamente con dietilpírocarbonato (DEPC) 0,1%.

12. Cuantificación de la concentración de DNA y RNA

Para cuantificar el DNA y RNA presente en las diferentes muestras se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración de DNA considerando que $D.O_{260} = 1$ corresponde a 50 μ g/ml de DNA de doble hebra y a 40 μ g/ml de RNA (Sambrook y *cols.*, 1989).

13. Manipulación y amplificación del DNA

13.1. Digestión con enzimas de restricción

El inserto (DNA) y el vector fueron digeridos con enzimas de restricción utilizando 5 unidades de enzima por μ g de DNA en las condiciones de tiempo, temperatura y fuerza iónica recomendada por los proveedores. Las reacciones enzimáticas se detuvieron por calentamiento a 65-70°C durante 20 min.

13.2. Reacción de desfosforilación

Al digerir el DNA con enzimas de restricción, se generaron extremos 5' fosfato que deben ser eliminados para aumentar la eficiencia de unión del inserto. Para desfosforilar los

vectores se utilizó fosfatasa alcalina termosensible (FastAP™). Para ello el extremo 5' fosfato de 1 µg de DNA se trató con 1 U de FastAP™ en buffer FastAP™ y se incubó a 37°C por 10 min. La enzima se inactivó al incubar la reacción a 75°C por 5 min.

13.3. Reacción de fosforilación

Los oligonucleótidos usados para la construcción del gen *serTaf* se fosforilaron para su posterior ligación con la enzima T4 DNA ligasa. Para ello se utilizó 10 U de la enzima T4 polinucleótido quinasa (PNK), la cual cataliza la transferencia de un fosfato proveniente del ATP al extremo 5' terminal del DNA. La reacción se realiza en presencia de 20 pmol de ATP, buffer de reacción 10X, y 20 pmol del oligonucleótido a fosforilar en un volumen final de 20 µl. Esta reacción se incubó a 37°C por 20 min y se inactivó a 75°C durante 10 min.

13.4. Reacción de amplificación por PCR

La enzima *Paq* DNA polimerasa se utilizó para la verificación de la presencia y direccionalidad de un inserto (DNA).

La enzima *Pfu* DNA polimerasa se utilizó para la clonación de genes en el plásmido de interés y se utilizó para la amplificación de cDNA.

Las condiciones de la reacción de PCR variaron dependiendo del tamaño del fragmento y de la T_m de los oligonucleótidos, pero en general se siguió el esquema presentado en la Tabla 4.

Tabla 4. Esquema del programa de PCR empleado para la amplificación de fragmentos de DNA o cDNA.

Condiciones	Ciclos	Reactivos (para 50µl)
95°C - 2 min	X 1	5 µl Buffer de reacción 10X 0,4 µl dNTPs 100 mM (25 mM c/u) 1 µl de cada oligonucleótido 0,5 µl DNA polimerasa
95°C - 20 seg	X 30-35	
55°C - 20 seg ^(a)		
72°C - 30 seg ^(b)		
72°C - 5 min	X 1	

^(a) La temperatura depende de la temperatura de asociación de los oligonucleótidos y ^(b) el tiempo depende del tamaño del fragmento a analizar.

13.5. Ligación del inserto (DNA) con el vector.

Se mezcló el inserto con el vector en una relación 3:1 y se adicionó buffer de ligación, más dos unidades de enzima T4 DNA ligasa hasta completar con agua estéril un volumen final de 20 µl, luego se incubó a 16°C toda la noche. A continuación, se utilizó la totalidad de la mezcla para la transformación.

13.6. Secuenciación de DNA

Los DNA se mandaron a secuenciar a Macrogen USA.

14. Electroforesis

14.1. Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa

Las muestras de DNA y RNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa, cuyo porcentaje varió entre 1% y 2% en función del tamaño del fragmento a analizar. Al gel de agarosa se le añadió bromuro de etidio 0,5 µg/ml. La electroforesis se realizó a 100 V por tiempos variables en buffer TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,3, EDTA 1 mM) y la

muestra se visualizó en un transiluminador de radiación UV. Los geles se fotografiaron con una cámara digital y la imagen se procesó en un computador.

14.2. Electroforesis de RNA en geles de poliacrilamida denaturantes.

Para conseguir una mayor capacidad resolutive se realizó una electroforesis vertical en cámaras de secuenciación usando geles de poliacrilamida denaturantes. Estos geles contienen Urea 8M, Acri/Bis 8%, 1X TBE, APS 10 % y TEMED 100% se completa con agua hasta un volumen final de 50 ml. Se mezcla todo menos el APS y el TEMED, y se deja a 30 °C con agitación para que se disuelva la Urea, luego se agregan los componentes faltantes. Al cargar este tipo de geles hay que tener algunas precauciones como son: precorrer el gel durante 30 min a 1800 V para que la temperatura llegue a 50 °C y sea homogénea en toda la superficie, por otro lado las muestras son resuspendidas en un buffer de carga denaturante (2X) (Urea 8M, Sacarosa 20%, Azul de bromofenol 0,025%, xilen cianol FF 0,025%). El gel se corre a 50 W y 1700 V. La migración de los colorantes es un indicativo del tiempo de electroforesis. Como la muestra a analizar en nuestro caso son tRNA de más de 70 pb, se utiliza la porción del gel que se encuentra entre los dos colorantes.

15. Técnicas con RNA

15.1. Ensayos de RT-PCR

Este protocolo se utilizó con la finalidad de analizar la expresión y procesamiento de los genes que codifican para tRNA^{Ser}_{UGA} interrumpido y no interrumpido por un intrón,

y para los tRNAi. Para ello se diseñaron oligonucleótidos RT (nombre genérico, ver Tabla 3 en apartado 4. Oligonucleótidos, en Materiales y Métodos) en los extremos de los genes para tRNA. El RNA total extraído de *A. ferrooxidans* se trató previamente con DNasa libre de RNasa para eliminar el DNA cromosómico bacteriano. Para ello se trató 50 µg RNA total con 68 U de DNasa I y el buffer indicado según el proveedor. Esta mezcla se incubó a 37°C por 30 min, luego se añade EDTA 25 mM y se incubó a 65°C por 10 min para inactivar la enzima.

La preparación de RNA libre de DNA se utilizó para la síntesis de cDNA. Para llevar a cabo la transcripción reversa se usaron 4 µg de RNA, 20 pmol del oligonucleótido RT- reverso y agua hasta completar un volumen de 11 µl. La mezcla se incubó durante 5 min a 70°C y luego se incubó en hielo durante 2 min. Se agregaron los componentes del buffer de extensión hasta un volumen final de 19 µl: 5 µl de buffer de reacción 5X y 0,5 mM de cada dNTP. Finalmente se añadió 1 µl de transcriptasa reversa 200 U/µl y se incubó 1h a 42°C. La reacción se inactivó calentando a 65°C por 10 min. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento anterior sin embargo en vez de usar 1 µl de transcriptasa reversa se uso 1 µl de agua.

Una vez obtenido el cDNA se procede a realizar la reacción de amplificación por PCR. Esta reacción se realizó en un volumen total de 25 µl siguiendo un protocolo similar al descrito en la Tabla 4 (ver apartado 13.4. Reacción de amplificación por PCR, en Materiales y Métodos). Se utilizó como molde 5 µl de cDNA.

15.2. Ensayos de cRT-PCR

Los experimentos de cRT-PCR se llevaron a cabo de manera similar a los descritos en los ensayos de RT-PCR, sin embargo en este caso las muestras de RNA libres de DNA se sometieron a una ligación de sus extremos con la enzima T4 RNA ligasa para circularizar los RNA (Levicán y cols, 2005; Lohan y Gray, 2004). Luego se realiza el ensayo de RT-PCR descrito anteriormente.

15.3. Técnicas de hibridación de RNA-DNA (Northern blot)

15.3.1. Transferencia semi-seca o electrotransferencia del RNA

Este procedimiento se utilizó para fijar los RNA separados en los geles de poliacrilamida 8% denaturantes (Urea 8M) a una membrana de nylon. Para ello se utilizó una cámara semi-seca (ver apartado 6. Equipos, en Materiales y Métodos) según las instrucciones del fabricante. Se usaron papeles Whatman previamente sumergidos en un buffer de transferencia (Tris-Acetato pH 4,2 40 mM y EDTA 2mM) para montar el sistema. La transferencia se llevo a cabo a 1mA por cada cm² de membrana de nylon durante 2 h. Se fijó el RNA a la membrana a 75 °C por 12 h.

15.3.2. Marcación radioactiva de una sonda de DNA

Para realizar la marcación de las sondas de DNA se utilizó la enzima PNK en presencia de [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP.

De acuerdo a los reactivos listados en la Tabla 5, se procedió a mezclar los componentes 1), 2) y 3) y se incubaron a 65°C por 10 min (denaturación), luego se

enfriaron en hielo. A esta mezcla se adicionaron los componentes 4) y 5) y se incubaron a 37°C por 30 min. Se realizó un spin y se inactivó por calor a 65°C por 20 min, repitiendo el spin.

Tabla 5. Marcación radioactiva de una sonda de DNA.

Reactivos	Stock	Para 25 µl de reacción
1) dH ₂ O		18,5 µl
2) Buffer T4-PNK	10 X	2,5 µl
3) Oligonucleótido	5 pmol/µl	1,5 µl
4) [γ ³² P]-ATP	3000-6000 Ci/mmol	1,5 µl (15 µCi)
5) T4-PNK	10 U/ µl	1 µl

15.3.3. Pre-hibridación, Hibridación y Lavados

La membrana de nylon con los RNA fijados se incubó en 20 ml de buffer de pre-hibridación (SSC 6X, SDS 0,1%, Denhardt's 10X, DNA esperma de salmón 0,1 mg/ml) a 45 °C durante 2 a 6 h, luego se remueve este buffer y se agrega 10 ml de buffer de hibridación (SSC 6X, SDS 0,1%, Denhardt's 10X) y 8 µl de la sonda específica marcada radioactivamente. Esto se incubó a 45°C durante 6 a 20 h. Transcurrido este tiempo se remueve toda la sonda marcada que no se unió al RNA en la membrana y se realizaron 3 lavados sucesivos por 15 min a 45°C. Estos lavados consistieron en un lavado con 20 ml de buffer de lavado 1 (SSC 2X y SDS 0,5%) y dos lavados con 20 ml de buffer de lavado 2 (SSC 2X y SDS 0,1%). Tras el último lavado se dejó secar la membrana, se envolvió en plástico transparente y se expuso a una pantalla, la cual es revelada transcurrido 2 a 72 h en un escáner PhosphoImager (ver apartado 6. Equipos, en Materiales y Métodos).

La membrana marcada se lavó con dos lavados de SDS 0,1% hervido y un lavado de SSC 2X. Este procedimiento es suficiente para eliminar toda la sonda marcada de la membrana, quedando lista para ser utilizada nuevamente.

16. Complementación de una cepa mutante termosensible de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium

La cepa de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) posee una mutación puntual en el gen que codifica para el tRNA^{Ser}_{UGA} (gen *serT*), localizada en la posición 10 del tRNA maduro en donde una base guanina es reemplazada por una adenina. Esta mutación fue descrita en una investigación en donde se buscaban genes esenciales envueltos en el proceso de formación del regulón flagelar de *S. typhimurium* (Chevance y cols, 2006). Esta mutación permite el crecimiento de la bacteria a 30°C, pero no a la temperatura restrictiva de 42°C, por lo que se puede comprobar la recuperación del fenotipo debido a la introducción del gen en estudio, en este caso el gen *serTAf* interrumpido y no interrumpido por un intrón.

Para llevar a cabo los ensayos de complementación en la cepa TH 3238 se realizaron construcciones en el vector p-SCRhaB, en donde se clonaron los genes *serTiAf* y el gen *serTAf*. Este vector tiene un promotor inducible por ramnosa y reprimible por glucosa, además de resistencia a trimetoprim (ver Figura 3, apartado 3. Plásmidos y Vectores de Clonamiento, en Materiales y Métodos) para analizar su posible funcionalidad en la síntesis de proteínas.

16.1. Clonamiento del gen *serTiAf* en el plásmido p-SCRhaB

Para realizar este sistema se diseñaron oligonucleótidos (tRSer-intrón-F y tRSer-intrón-R) que hibridan con los extremos del gen *serTi* de *A. ferrooxidans* (*serTiAf*). Estos oligonucleótidos poseen en sus extremos 5' y 3' secuencias flanqueantes de 5 pb correspondientes a los extremos del gen *serT* de *S. typhimurium*. Además, el oligonucleótido tRSer-intrón-F posee en su extremo 5' un sitio de restricción para la enzima NdeI representado con letra negrita en la Tabla 3 (ver apartado 4. Oligonucleótidos, en Materiales y Métodos). Ambos oligonucleótidos se utilizaron para la amplificación del gen *serTi* con la enzima *Pfu* DNA polimerasa a partir de DNA genómico de *A. ferrooxidans*. A este producto de amplificación hubo que agregarle adeninas terminales para poder clonarlo en el vector pGEM-T easy. Este vector posee sólo un sitio de corte para la enzima de restricción NdeI por lo que se procedió a cortar con esta enzima para liberar el inserto. Luego este inserto se subclonó en el vector p-SCRhaB previamente digerido con la enzima NdeI y desfosforilado, generando la construcción p-SCRhaB-*serTiAf*. La estrategia de clonamiento se muestra en la Figura 4.

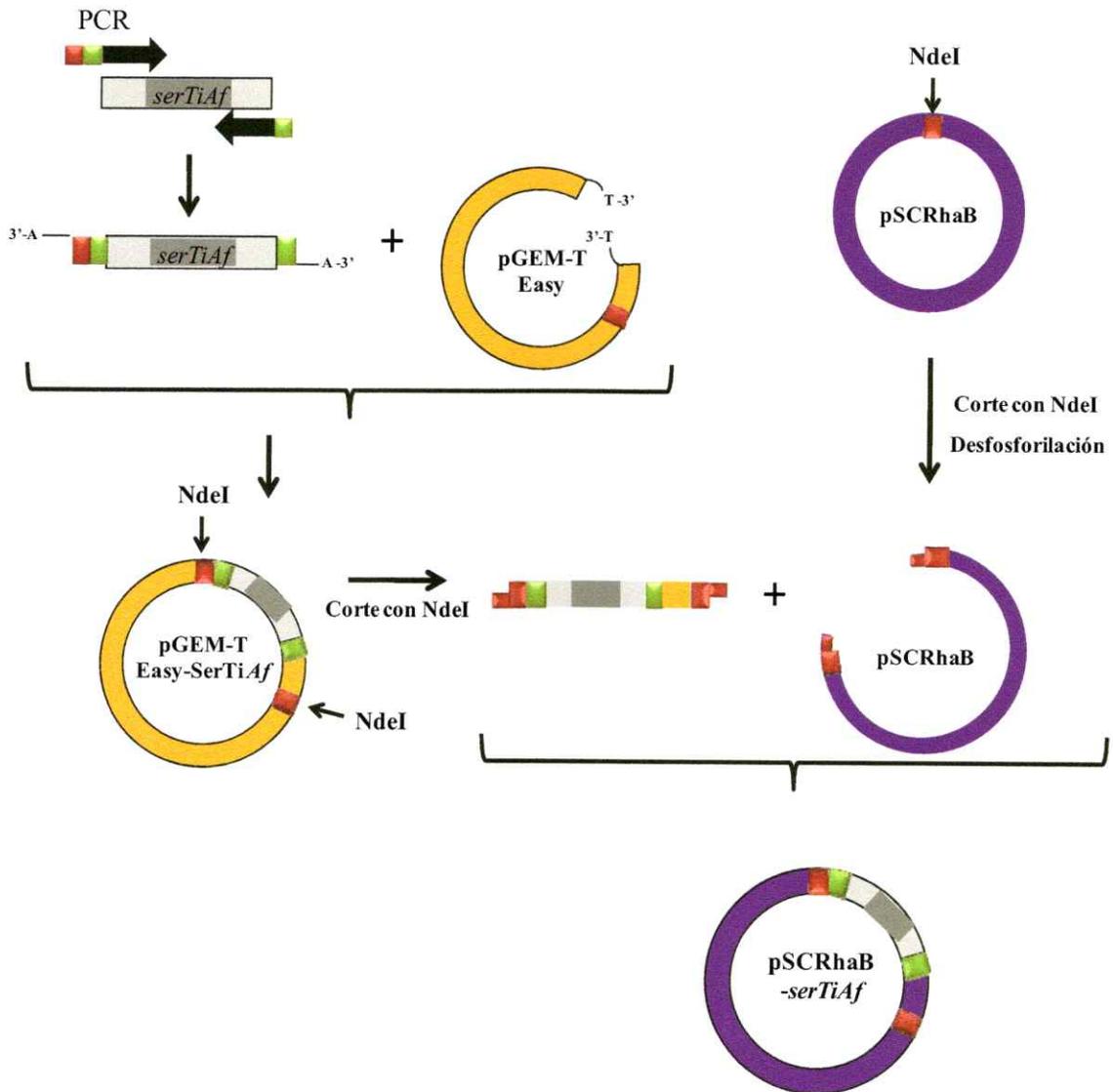


Figura 4. Estrategia de clonamiento del gen *serTiAf*. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 3 (ver apartado 4. Oligonucleótidos, en Materiales y Métodos). En verde se señalan las secuencias flanqueantes de 5 pb correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen *serT* de *S. typhimurium*. En rojo se señalan los sitios de corte para la enzima de restricción NdeI. En gris oscuro se muestra el intrón del gen *serTiAf*.

16.2. Construcción del gen *serTAf* y clonamiento en el plásmido p-SCRhaB

Para este sistema se diseñaron parejas de oligonucleótidos complementarios (tRSercluster1, tRSercluster2, tRSercluster3 y tRSercluster4) que hibridan entre ellos para formar el gen *serT* de *A. ferrooxidans* (*serTAf*) completo. Estos oligonucleótidos tienen un tamaño de 50 nt aproximadamente, los que además de cubrir la secuencia completa del gen, poseen en sus extremos 5' y 3' secuencias flanqueantes de 5 pb correspondientes a los extremos del gen *serT* de *S. typhimurium*. También se encuentran en los extremos sitios de restricción para las enzimas NdeI en el extremo 5' y HindIII en el extremo 3' representados en negrita en la Tabla 3 (ver apartado 4. Oligonucleótidos, en Materiales y Métodos). El esquema de la construcción se detalla en la Figura 5.

Para llevar a cabo la formación de la construcción señalada en la Figura 5, se procedió a fosforilar y a purificar los oligonucleótidos mediante una cromatografía de filtración en gel Sephadex G25, según las instrucciones del fabricante. Luego se les agregó un buffer de hibridación STE (10 mM Tris pH 8, 50 mM NaCl, 1mM EDTA). La reacción que contiene ambas parejas de oligonucleótidos en cantidades equimolares se incubó a 95°C durante 3 min, luego se deja bajar la temperatura de manera gradual hasta aproximadamente 22°C, lo cual demora alrededor de 2 h aproximadamente, luego se procedió a ligar los oligonucleótidos (ver apartado 13.3 Reacción de fosforilación, en Materiales y Métodos) y el producto obtenido se analizó en un gel de agarosa de 2%.

Este producto que tiene los sitios de restricción previamente diseñados fue ligado al plásmido p-SCRhaB previamente digerido con las enzimas de restricción NdeI y Hind III y desfosforilado, generando la construcción p-SCRhaB-*serTAf*.

Ambas construcciones p-SCRhaB-*serTiAf* y p-SCRhaB-*serTAf* fueron transferidas a la cepa de *S. typhimurium* mediante transformación electroquímica y se seleccionaron las transformantes a 30°C en placas LB kanamicina y trimetoprim. A continuación, se escogió a uno de los transformantes y se realizó una dilución en agua estéril para poder plaquear 5 µl del mismo transformante en LB kanamicina y trimetoprim suplementado con ramnosa o glucosa 0,2% (control negativo) a 30°C y 42°C. De las colonias que aparecieron se seleccionaron algunas para purificación del plásmido para repetir la transformación y así corroborar los resultados.

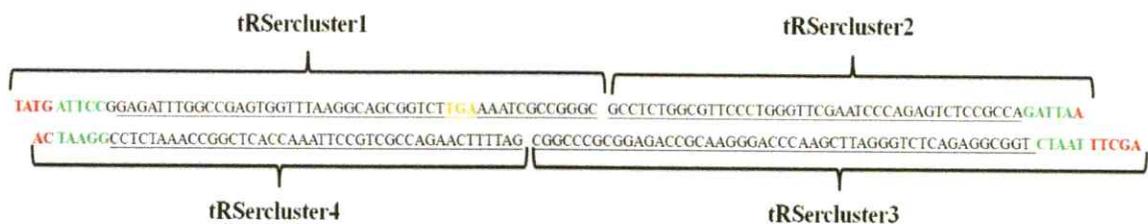


Figura 5. Esquema de la construcción del gen *serTAf*. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 3 (ver apartado 4. Oligonucleótidos, en Materiales y Métodos). Las letras rojas corresponden a los sitios de corte de las enzimas NdeI (extremo 5') y HindIII (extremo 3'). Las secuencias representadas en letra verde corresponde a secuencias flanqueantes de 5 pb correspondientes a los extremos del gen *serT* de *S. typhimurium*. El anticodón del gen *serTAf* se detalla en letra amarilla.

RESULTADOS

1. Transcripción y procesamiento de genes para tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans*.

Luego que se transcriben los genes que codifican para tRNA, el transcrito requiere de un procesamiento para ser funcional, el cual consiste en una serie de reacciones que convierten a una molécula precursora del tRNA en un producto maduro que desempeña las funciones correspondientes en la célula. En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio (Levicán y cols., 2009) se identificó, mediante herramientas bioinformáticas, la presencia de un gen que codifica para un tRNA^{Ser}_{UGA} con un intrón de 220 pb (*serTiAf*) en dos cepas de *A. ferrooxidans* (ATCC 23270 y ATCC 53993) cuyo genoma se ha secuenciado. Mediante un análisis bioinformático se predijo que correspondía a un intrón del grupo I, los cuales tienen la capacidad de catalizar su propio procesamiento (auto-catálisis) (Kawach y cols., 2005; Vepritskiy y cols., 2001). En la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se identificó un gen adicional que codifica para un tRNA^{Ser}_{UGA} sin intrón (*serTAf*) presente en un elemento integrativo y conjugativo (*ICEAf1*), el cual no está presente en la cepa ATCC 53993 (Levicán y cols., 2009). En esta cepa solamente existe el gen *serTiAf* el cual requiere de un procesamiento previo del RNA precursor que remueva el intrón para ser funcional. Con el objeto de determinar otros posibles genes que codifican para tRNA^{Ser}_{UGA} en ambas cepas de *A. ferrooxidans*, se realizó una búsqueda bioinformática en los genomas de las cepas secuenciadas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 obtenidas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando el programa ARAGORN (<http://130.235.46.10/ARAGORN/>) (Laslett y Canback, 2004). Este programa detecta

genes para tRNA interrumpidos y no interrumpidos por intrones, además de genes para tmRNA. Los resultados de este análisis se detallan en la Tabla 7 (Anexo 1). No se encontraron otros genes que codifiquen para tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans*, aparte de los mencionados anteriormente, lo que indica que el gen *serTiAf* interrumpido por un intrón en la cepa ATCC 53993 debe ser funcional ya que es el único capaz de descodificar los codones UCA. Es importante destacar que los 59 genes para tRNA presentes en la cepa ATCC 53993 están presentes en la cepa ATCC 23270. Sin embargo, esta última cepa tiene además otros 37 genes que codifican para tRNA, todos ellos ubicados en el ICE*Af*1 que representan las 20 especies de tRNA.

El análisis bioinformático realizado con el genoma de ambas cepas de *A. ferrooxidans* sugiere la presencia de otros posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones (14 en la cepa ATCC 23270 y 11 en la cepa ATCC 53993). Esto es un dato novedoso ya que en bacterias es poco usual encontrar genes interrumpidos por intrones. Sin embargo, generalmente los intrones presentes en genomas bacterianos interrumpen genes para tRNA (intrones del grupo I) y genes para rRNA (intrones del grupo II) (Kawach y cols., 2005; Vepritskiy y cols., 2001). El programa bioinformático ARAGORN realiza la búsqueda de genes para tRNA basándose en un patrón de tRNA conocido (secuencias conservadas entre las especies de tRNA) y valida esta búsqueda con la predicción de la estructura secundaria. En el caso de la búsqueda de genes para tRNA interrumpidos por intrones, este programa detecta como intrón cualquier secuencia de DNA que interrumpa el patrón de tRNA conocido. Es decir, no realiza una búsqueda por similitud de secuencia o dominios conservados con bases de datos de intrones. Por esta razón, es factible que los genes para tRNA interrumpidos por intrones

detectados con este programa sean pseudogenes. Para validar los resultados bioinformáticos obtenidos con el programa ARAGORN, se planteó estudiar la expresión *in vivo* de los posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones en *A. ferrooxidans* (cuarto objetivo de este “seminario de título”)

Con el objeto de validar que el gen *serTiAf* interrumpido por un intrón y el gen *serTaf* presente en el ICE*Af1* son funcionales, se planteó como primera etapa analizar si estos genes se expresan y procesan *in vivo* en *A. ferrooxidans* para poder formar así una molécula de tRNA madura. Para ello se realizó un ensayo de RT-PCR a partir de RNA extraído de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 crecido en medio 9K-Fe⁺². Los resultados obtenidos, que se detallan en la Figura 6, muestran que en ambas cepas los genes *serTiAf* se expresan. El producto de amplificación observado tiene un tamaño de ~90 pb correspondiente al tRNA^{Ser}_{UGA} maduro lo que sugiere que el intrón se procesa. En este ensayo no se pudo detectar el precursor del tRNA^{Ser}_{UGA}, que tendría un tamaño de 310 pb, lo que sugiere que en las condiciones en que se cultivó la bacteria el precursor se procesa completamente.

Por otro lado, también se expresa el gen *serTaf* de la cepa ATCC 23270. El producto de amplificación correspondiente al tRNA^{Ser}_{UGA} maduro tiene un tamaño de ~91 pb (Figura 6B)

Todos los productos de RT-PCR se clonaron para su posterior secuenciación. La información que nos arrojó la secuenciación permitió determinar que ambos genes para tRNA^{Ser}_{UGA} correspondían a la secuencia predicha y que el intrón del tRNA^{Ser}_{UGA} se procesa.

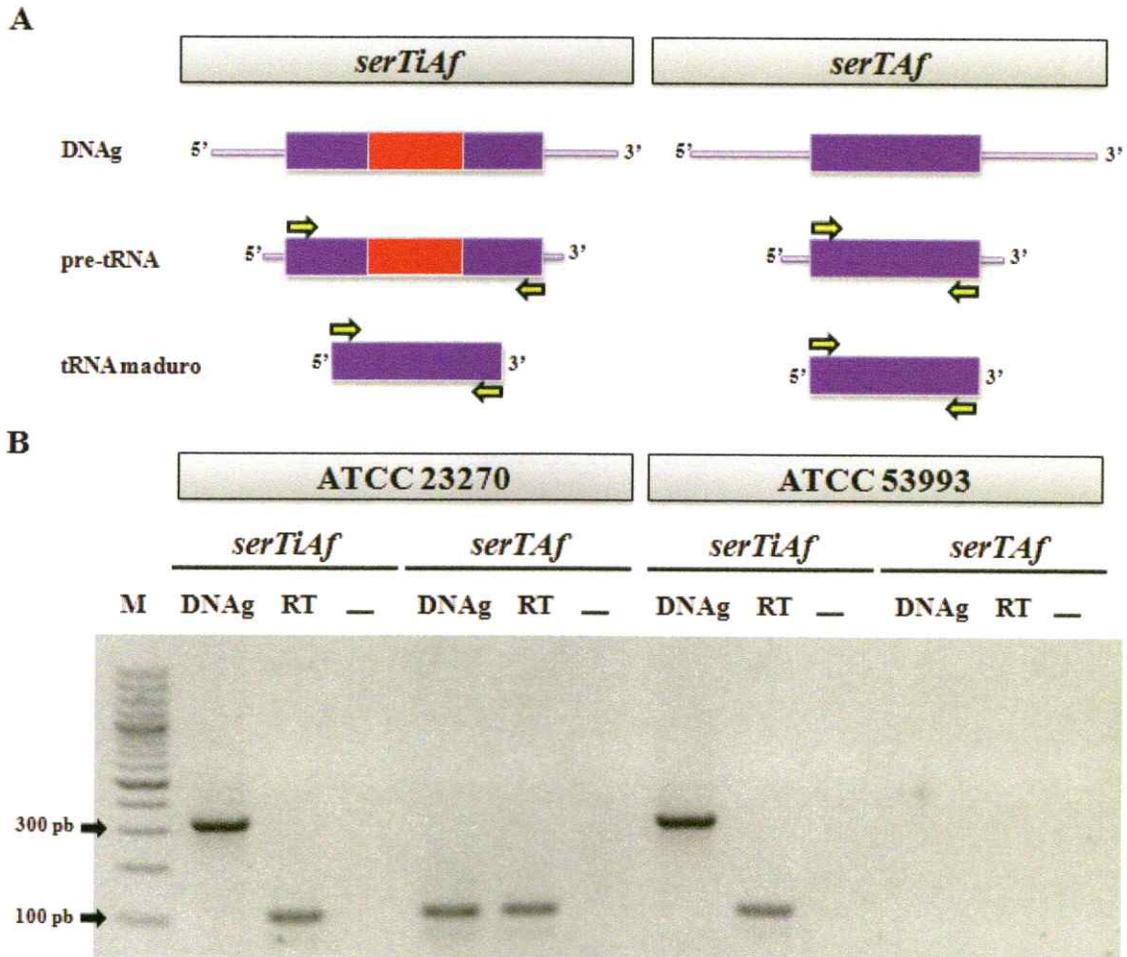


Figura 6. Procesamiento del transcrito de los genes *serT* en *A. ferrooxidans*. **A.** Esquema del procesamiento del transcrito de los genes *serTiAf* y *serTAf*. En color rojo se detalla el intrón y en color morado los exones. Las flechas en color amarillo corresponden a los oligonucleótidos que hibridan en los extremos de cada gen para tRNA^{Ser}_{UGA}. **B.** Fotografía de un gel de agarosa 2% en donde se muestran los productos de PCR y RT-PCR utilizando los oligonucleótidos señalados en color amarillo en A. Se usó como molde DNA genómico (DNAg) o RNA total (RT) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993. Las barras negras sobre los carriles corresponden a los controles negativos sin transcriptasa reversa. M corresponde al marcador de tamaño 100 pb.

La secuencia indica que el intrón presente en el tRNA^{Ser}_{UGA} se procesa generando el triplete UGA coincidiendo con la predicción bioinformática (Figura 7). Este tipo de organización corresponde a los genes para tRNA interrumpidos canónicos de bacterias.

Con este ensayo no se puede determinar si los extremos de los tRNA^{Ser}_{UGA} se procesan correctamente, lo que es un prerrequisito para que un tRNA sea funcional. Para abordar este aspecto se realizó un experimento en donde se ligaron los extremos 5' y 3' de los tRNA con la enzima T4 RNA ligasa generando RNA circulares, los que posteriormente se sometieron a una reacción de cRT-PCR (RT-PCR del círculo) con oligonucleótidos específicos para cada tRNA^{Ser}_{UGA} (ver apartado 15.2. Ensayos de cRT-PCR, en Materiales y Métodos). Los productos de amplificación se clonaron y secuenciaron corroborando que los extremos de ambos tRNA^{Ser}_{UGA} coinciden con la secuencia predicha bioinformáticamente (Figura 8).

A.

Estructura primaria del posible precursor del tRNAi^{Ser}_{UGA} (310 nt)

GGAGGUGUGGCAGAGCGGUUGAUUGCACCGGUCUGUCCCCAAUCGAGC
CCCUGCCGGGAAACGGGCAGGGUGACAGGAAUCAAAUUCGGCGAAUCC
CCUGGUUUGUCCGAGGUAACGCCGAGCCAAGCCGGAAAGGUUCCGGAA
GGUGUAGAGAUCAGACGGUUCCCACCUACAGCCUCAUGGCCAGGGUGA
AGGCAUGAUCCAGACUCCAAAAGGGCCUCAUGGUCCUGUGGCGAAAG
CCAUGGUGGGUAAGGAAAACCGGCAGGGGUUAACGCCCCUCGUGAGUUC
 GAAUCUCACCGCCUCCGCCA

B.

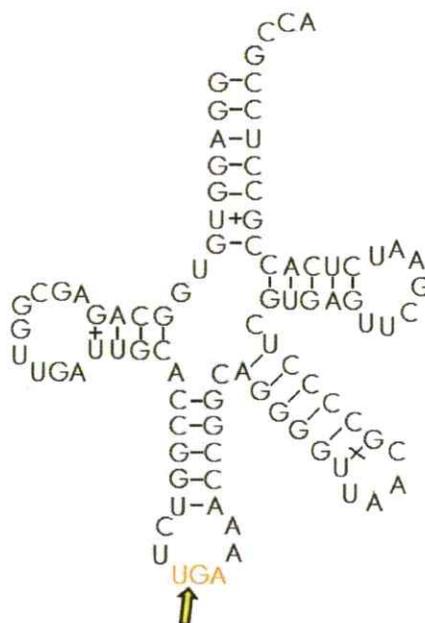
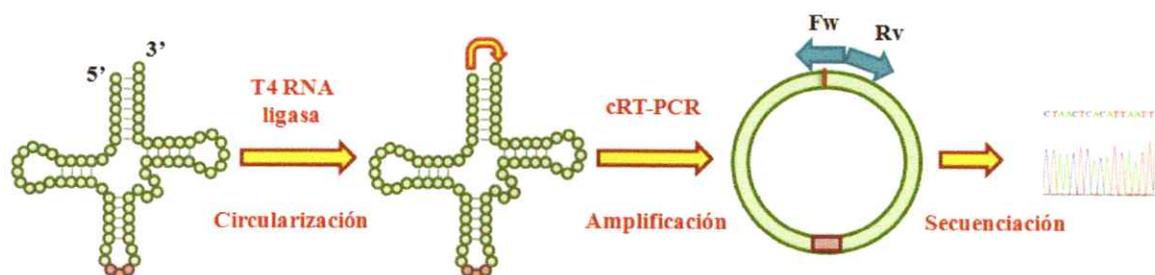
Estructura secundaria del tRNAi^{Ser}_{UGA} (tRNA maduro) (90 nt)

Figura 7. Estructura primaria y secundaria del tRNAi^{Ser}_{UGA}. A. Estructura primaria correspondiente al posible precursor del tRNAi^{Ser}_{UGA} de 310 nt. En letra roja se señala la secuencia del intrón de 220 nt, la cual se encuentra interrumpiendo la posición 35 del tRNA maduro correspondiente al anticodón. En letra negra y subrayada se señala el anticodón. B. Estructura secundaria correspondiente al tRNAi^{Ser}_{UGA} maduro de 90 nt (anticodón, señalado en color anaranjado). La flecha amarilla indica la posición del intrón.

A.



B.

Secuenciación tRNA^{Ser}_{UGA} círculo (90 nt)

CCTCCGCCAGGAGGTGTGGCAGAGCGGTTGATTGCACCGGTCTTGAAA
 ACCGGCAGGGGTTAACGCCCTCGTGAGTTCGAATCTCACCG

Secuenciación tRNA^{Ser}_{UGA} círculo (91 nt)

CCAGAGTCTCCGCCAGGAGATTTGGCCGAGTGGTTTAAGGCAGCGGTC
TTGAAAATCGCCGGGCGCCTCTGGCGTTCCTGGGTTCGAATC

Figura 8. Ensayo de cRT-PCR de los tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. A. Esquema de ligación de los extremos 5' y 3' terminales de los tRNA^{Ser}_{UGA}. En color rojo se señala el anticodón y en color plomo se detallan los oligonucleótidos específicos para cada tRNA^{Ser}_{UGA} utilizados para el ensayo de cRT-PCR. Los productos de amplificación se clonaron y secuenciaron. **B.** Resultados de la secuenciación de ambos tRNA^{Ser}_{UGA}. En color rojo se señala el anticodón UGA y en letra subrayada de color gris se detalla el extremo 3' CCA terminal. En color gris se detalla la secuencia de los oligonucleótidos utilizados.

2. Niveles de expresión y aminoacilación *in vivo* de los tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans*.

Para dilucidar si los tRNA^{Ser}_{UGA} y tRNA^{iSer}_{UGA} son sustratos de la enzima seril-tRNA-sintetasa se determinó si se encontraban aminoacilados *in vivo* mediante un ensayo de oxidación y liberación del nucleósido 3' terminal con periodato. Para ello se extrae tRNA total de la bacteria en condiciones ácidas para evitar que los tRNA se desacilen. Posteriormente, una alícuota correspondiente a la mitad de esta preparación de tRNA se somete a desacilación mediante un tratamiento con pH básico. Ambas fracciones, desacilada (+OH) y acilada (-OH), se trataron con periodato y lisina. De esta manera los tRNA desacilados pierden su adenosina terminal. Los tRNA aminoacilados quedan protegidos de este tratamiento por lo que mantienen su tamaño original. Luego mediante una separación electroforética y ensayos de Northern blot con sondas marcadas específicas, se diferencian los tRNA desacilados de los aminoacilados, ya que migran más rápido por la pérdida de un nucleósido en los tRNA desacilados (Choi y cols., 2003; Salazar y cols., 2004).

Los resultados obtenidos confirman que el tRNA^{iSer}_{UGA} y el tRNA^{Ser}_{UGA} se expresan, e indican además que ambos tRNA se encuentran parcialmente aminoacilados *in vivo* (alrededor de un 50% aprox.) (Figura 9). Como control positivo se utilizó el tRNA^{Gln}_{UUG} de *A. ferrooxidans* que se aminoacila en un 100% (Levicán y cols., 2007). El porcentaje de aminoacilación *in vivo* obtenido para el tRNA^{Gln}_{UUG} es de un 100% (Figura 9). Este resultado sugiere que la acilación parcial de los tRNA^{Ser}_{UGA} corresponde al nivel de aminoacilación *in vivo* en *A. ferrooxidans*.

Cabe destacar que para el $\text{tRNAi}^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$ (de ambas cepas) se necesitaron 2 h de exposición para poder visualizar el tRNA acilado del desacilado, en cambio para el caso del $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$ (de la cepa ATCC 23270) se necesitó exponer al menos 10 veces más del tiempo para visualizar el tRNA. Esto sugiere que existen diferentes niveles de expresión de estos tRNA.

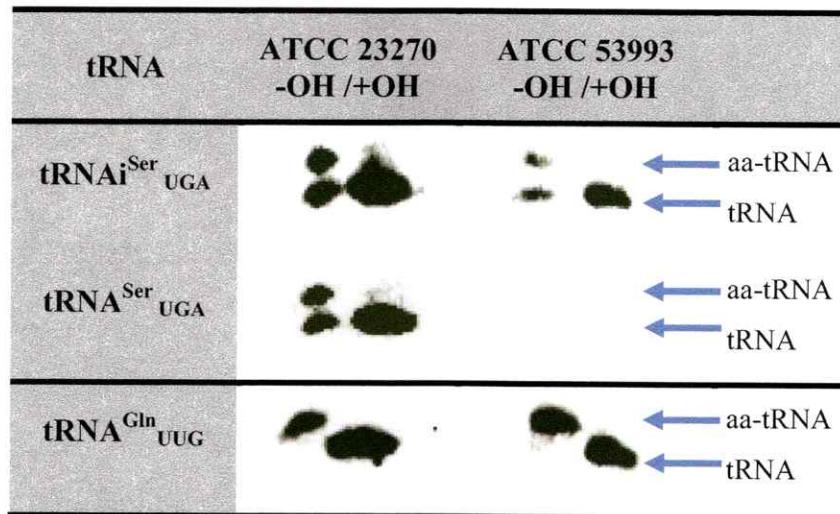


Figura 9. Expresión y niveles de aminoacilación de los $\text{tRNAi}^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$, $\text{tRNA}^{\text{Ser}}_{\text{UGA}}$ y $\text{tRNA}^{\text{Gln}}_{\text{UUG}}$ de *A. ferrooxidans* cultivado en medio 9K-Fe⁺². Northern blot con sondas específicas para cada tRNA previa separación electroforética de los tRNA en geles denaturantes de poliacrilamida. Se detallan las fracciones, desacilada (+OH) y acilada (-OH). Las flechas azules indican la migración de los tRNA aminoacilados (aa-tRNA) y los tRNA desacilados (tRNA).

3. Análisis de la funcionalidad de los tRNA^{Ser}_{UGA} de *A. ferrooxidans* mediante complementación de una mutante termosensible en el gen *serT* de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium

Con el objetivo de analizar si los tRNA^{Ser}_{UGA}, son capaces de participar en la síntesis de proteínas, se realizó un análisis de complementación de la cepa de *S. typhimurium* TH 3238 que presenta una mutación puntual en el gen que codifica para el tRNA^{Ser}_{UGA}. La mutación que se localiza en la posición 10 del tRNA maduro, en donde una base guanina es reemplazada por una adenina, permite el crecimiento de la bacteria a 30°C pero no a la temperatura restrictiva de 42°C (Chevance y cols, 2006). Para comprobar la recuperación del fenotipo debido a la introducción del gen en estudio, se clonaron los genes *serTiAf* y *serTAf* en el vector p-SCRhaB bajo el control de un promotor inducible por ramnosa y reprimible por glucosa, que además posee resistencia a trimetoprim.

De esta manera se construyeron los plásmidos p-SCRhaB-*serTiAf* y p-SCRhaB-*serTAf*. Ambos plásmidos fueron capaces de complementar la cepa termosensible en presencia de ramnosa no así en presencia de glucosa, indicando así que ambos tRNA^{Ser}_{UGA} son funcionales para la síntesis de proteínas y que por lo tanto el intrón presente en el gen que codifica para tRNA^{Ser}_{UGA} se debería procesar correctamente en la cepa de *S. typhimurium* TH 3238 (Figura 10).

Con el fin de confirmar que la complementación se debe a los genes para tRNA^{Ser}_{UGA} de *A. ferrooxidans* y no a la reversión de la mutación puntual del gen *serT* de *S. typhimurium*, se aisló DNA plásmidial a partir de colonias crecidas a la

temperatura restrictiva para transformar nuevamente la cepa de *S. typhimurium* TH 3238. De esta manera se reprodujo los resultados anteriormente descritos, descartando así la posible reversión de la mutación puntual del gen para tRNA^{Ser}_{UGA}. Estos resultados se detallan en la Figura 10.

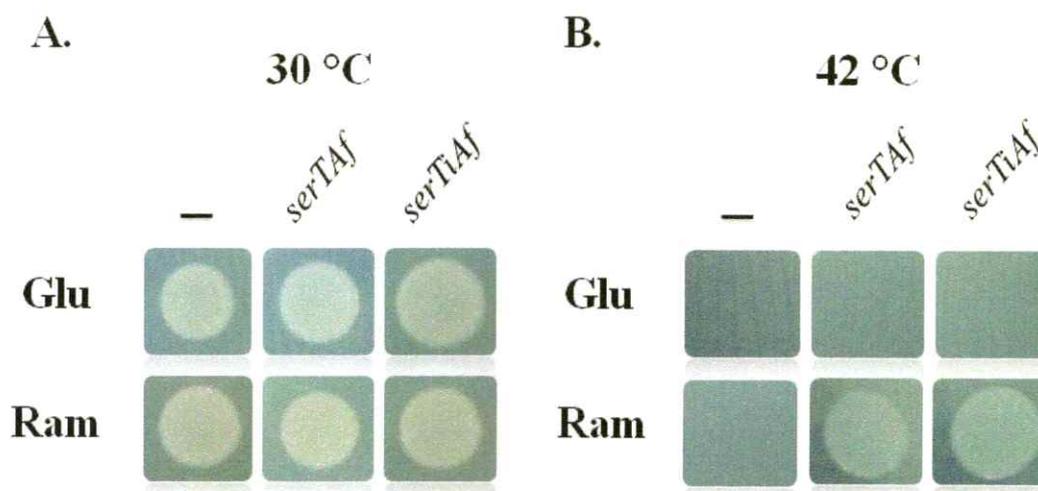


Figura 10. Complementación de la cepa de *S. typhimurium* TH 3238. Crecimiento bacteriano de la cepa *S. typhimurium* TH 3238 transformada con el plásmido p-SCRhaB (-), p-SCRhaB-*serTAf* (*serTAf*) ó p-SCRhaB-*serTiAf* (*serTiAf*). Las placas de cultivo contenían glucosa (Glu) ó ramnosa (Ram), que reprime o activa respectivamente la expresión de los genes clonados en el vector p-SCRhaB. El experimento se realizó a la temperatura permisiva (A. 30°C) y a la temperatura restrictiva (B. 42°C).

4. Transcripción, procesamiento y funcionalidad de los posibles genes que codifican para tRNA interrumpidos por intrones en *A. ferrooxidans*

A partir de la búsqueda bioinformática de genes para tRNA con el programa ARAGORN. Se observó la presencia en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 de otros 14 posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones (Tabla 6). Siguiendo los mismos procesos metodológicos llevados a cabo con los tRNA^{Ser}_{UGA}, se procedió a tratar de determinar si los tRNA interrumpidos por intrones encontrados en *A. ferrooxidans* tienen la capacidad de expresarse, procesarse y ser funcionales. De estos 14, 11 se encuentran presentes en el genoma de la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans*. Los 3 tRNA_i adicionales en la cepa ATCC 23270 se encuentran en el ICEA_{f1}.

Los intrones de estos posibles genes para tRNA interrumpidos varían en tamaño de 14 a 1536 pb. Con el fin de analizar estos intrones, se realizó una búsqueda de similitud de secuencia utilizando el programa BLASTN contra la base de datos de NCBI, de intrones del grupo I (<http://www.rna.whu.edu.cn/gissd/help.html>) (Zhou y cols., 2008) e intrones del grupo II (<http://www.fp.ucalgary.ca/group2introns/>) (Dai y cols., 2003), ya que son los únicos intrones encontrados hasta la fecha en bacterias. Solamente se pudo identificar el intrón del tRNA^{Leu}₁₂ como un intrón del grupo II.

Con el objeto de determinar si los posibles tRNA interrumpidos por intrones encontrados en *A. ferrooxidans* tienen la capacidad de expresarse y procesarse se realizaron ensayos de RT-PCR. Para ello se diseñaron partidores en los extremos de los posibles tRNA analizados. Los resultados obtenidos que se detallan en la Figura 11, indican que de los 14 posibles genes (el tRNA_i^{Ser}_{UGA} se excluyó del análisis),

aparentemente 10 se expresan y procesan. Sin embargo en algunos casos los productos de amplificación no se visualizan nítidamente.

Tabla 6. Predicción de los posibles genes para tRNA con intrones en *A. ferrooxidans*

Nombre	Pre-tRNA (pb)	tRNA maduro (pb)	Intrón (pb)
1. <i>gly</i> ₉₀ (UCC)	757	92	665
2. <i>gly</i> ₆₅ (UCC)	260	88	172
3. <i>ala</i> ₈₄ (GGC)	1073	99	974
4. <i>ala</i> ₃₇ (GGC) ^a	102	88	14
5. <i>asp</i> ₃ (GUC)	477	97	380
6. <i>cys</i> ₆₀ (ACA) ^a	153	96	57
7. <i>leu</i> ₆₉ (CAG)	685	97	588
8. <i>leu</i> ₂₅ (CAA) ^a	1477	99	1378
9. <i>leu</i> ₂₃ (CAG)	1637	101	1536
10. <i>ile</i> ₁₆ (GAU)	1266	88	1178
11. <i>leu</i> ₁₂ (GAG)	423	92	331
12. <i>lys</i> ₇₄ (UUU)	206	93	113
13. <i>tyr</i> ₉₇ (GUA)	227	91	136
14. <i>val</i> ₆₄ (CAC)	187	75	112
15. <i>ser</i> T ₇₅ (UGA)	310	90	220

Los tRNA listados corresponden a los encontrados en las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 a excepción de los tRNA señalados por ^(a) que están presentes solamente en la cepa ATCC 23270 (tRNA con intrones del ICEAfl).

Todos los productos de RT-PCR, ya sea que presentan una banda nítida o difusa en el gel, se clonaron para su posterior secuenciación. Los resultados de la secuenciación indican que los tRNA^{Cys}₆₀, tRNA^{Val}₆₄, tRNA^{Ala}₃₇, tRNA^{Asp}₃ y tRNA^{Lys}₇₄ se transcriben ya que se detecta el pre-tRNA. Sin embargo el único tRNA que se procesa es el tRNA^{Cys}₆₀, aunque en un sitio diferente al predicho por el programa ARAGORN.

Para corroborar si este tRNA^{Cys}₆₀ maduro podría ser funcional se determinó si se aminoacila *in vivo*, para ello se llevo a cabo el procedimiento utilizado para los tRNA^{Ser}_{UGA} (ver apartado 2. Niveles de expresión y aminoacilación *in vivo* de los tRNA^{Ser}_{UGA} en *A. ferrooxidans*, en Resultados). Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 12.

Los resultados obtenidos del Northern blot dan cuenta que el tRNA^{Cys}₆₀ interrumpido por un intrón de *A. ferrooxidans* no es capaz de aminoacilarse *in vivo* en las condiciones analizadas. Se detectó como un RNA con una migración diferente a la que tendría el tRNA maduro. La migración del RNA corresponde a un tamaño mayor (~150 nt) al esperado según la secuenciación del producto de RT-PCR (~73 nt). Esto podría deberse a que el intrón no se haya removido o que se haya removido pero no se hayan procesado los extremos. En este caso probablemente se haya removido el intrón, ya que se detectó una molécula de tRNA maduro en la secuenciación del producto amplificado desde ensayos de RT-PCR (Figura 13).

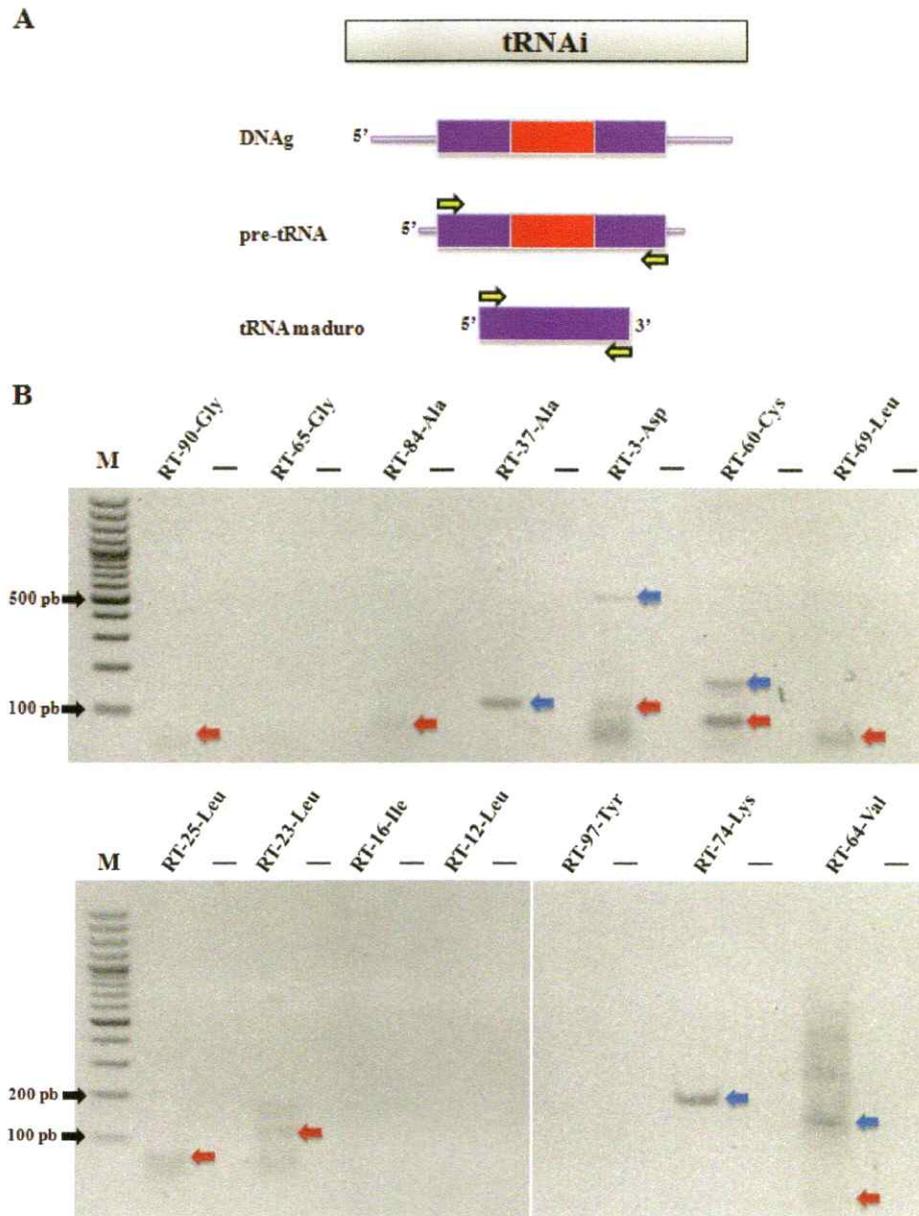


Figura 11. Expresión *in vivo* en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 de los posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones. A. Esquema de los pasos de procesamiento de un tRNA con intrón. En color rojo se detalla el intrón y en color morado los exones. Las flechas en color amarillo corresponden a los oligonucleótidos que hibridan en los extremos de cada tRNAi. **B.** Fotografía de un gel de agarosa 2% de los productos de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos representados en color amarillo en A. Se usó como molde RNA total (RT) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. El transcrito no procesado correspondiente al pre-tRNA se destaca con flechas azules y los posibles tRNA maduros con flechas rojas. Las barras negras sobre los carriles corresponden a los controles negativos sin transcriptasa reversa. M corresponde al marcador de tamaño 100 pb.

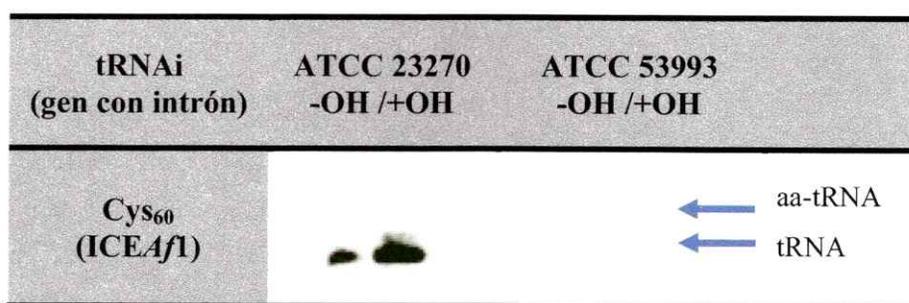


Figura 12. Expresión y niveles de aminoacilación del tRNA^{Cys₆₀} de *A. ferrooxidans* cultivado en medio 9K-Fe⁺². Northern blot con sondas específicas para el tRNA^{Cys₆₀} previa separación electroforética de los tRNA en geles denaturantes de poliacrilamida. Se detallan las fracciones, desacilada (+OH) y acilada (-OH). Las flechas azules indican la migración de los tRNA aminoacilados (aa-tRNA) y los tRNA desacilados (tRNA).

A.

Predicción bioinformática del tRNA^{Cys}₆₀ maduro (96 nt)

↓

**GAUCAGGUAGCUCAGUGGAAGAGCAGCAAGGUACAAGAGUGGCAGAGCA
GUUCUGGAAAAUGCAGGGGUCGGUGGUUCGAAUCCACCCUGGUCGCCA**

Secuenciación tRNA^{Cys}₆₀ maduro (73 nt)

↓

**GAUCAGGUAGCUCAGUGGAAGAGCAGUUCUGGUAAUGCAGGGGUCGG
UGGUUCGAAUCCACCCUGGUCGCCA**

B.

C.

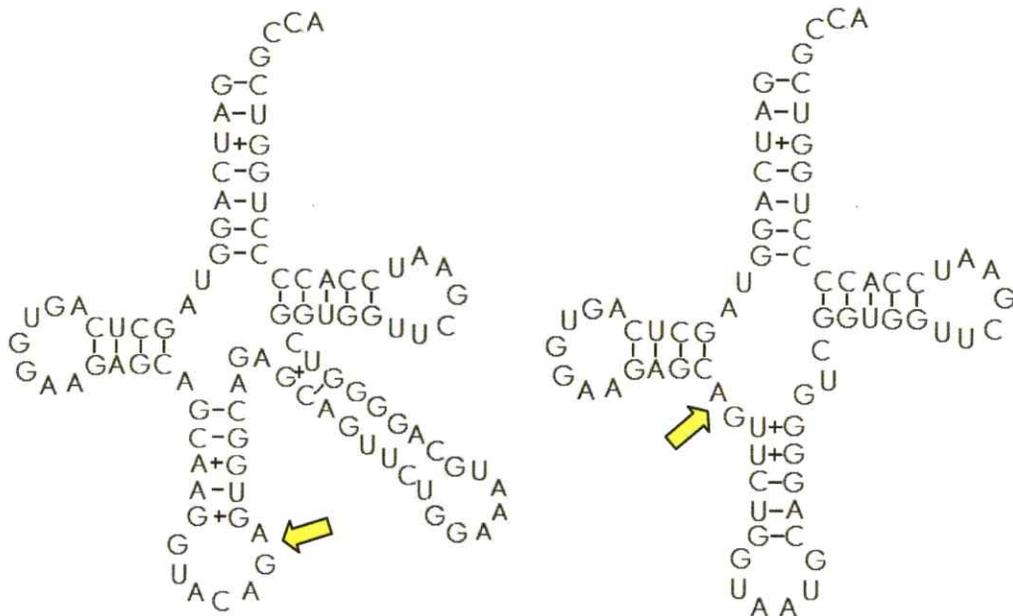


Figura 13. Estructura primaria y secundaria del tRNA^{Cys}₆₀. A. Estructura primaria predicha por el programa bioinformático ARAGORN del tRNA^{Cys}₆₀ maduro y resultado de la secuenciación del producto de RT-PCR del RNA maduro. En color rojo y subrayado se detalla el anticodón. Para el caso del producto secuenciado existen dos posibles anticodones (UAA que codifica para leucina ó AAU que codifica para isoleucina). Las secuencias marcadas en color amarillo indican las secuencias que se mantienen tanto en la predicción bioinformática como en el resultado de secuenciación. B. Estructura secundaria correspondiente al tRNA^{Cys}₆₀ maduro de 96 nt predicho bioinformáticamente. C. Estructura secundaria correspondiente al resultado de la secuenciación del producto de amplificación del RNA maduro de 73 nt. Las flechas amarillas indican la posición del intrón.

DISCUSIÓN

El objetivo de este “seminario de título” ha sido estudiar la expresión, procesamiento y funcionalidad de los genes que codifican para un tRNA esencial (tRNA^{Ser}_{UGA}) y otros genes para tRNA interrumpidos por intrones en el microorganismo extremófilo *A. ferrooxidans*.

Los tRNA cumplen diversas funciones celulares siendo una de las más estudiadas su participación en la síntesis de proteínas. Para cumplir su función los transcritos precursores de los tRNA tienen que pasar por una etapa de maduración que consiste en una serie de reacciones post-transcripcionales en donde participan múltiples enzimas. Así pueden ser reconocidos por las aaRS y estas añadan el aminoácido específico en el extremo 3' terminal.

Los genes para tRNA tienden a estar presentes en múltiples copias en los genomas de muchos organismos, desde procariotas a eucariotas. Estas copias pueden estar ordenadas en “agrupaciones”, o como genes individuales, o bien, en el caso de las bacterias, en operones policistrónicos con otros genes para tRNA, rRNA o genes que codifiquen para proteínas. En genes de bacterias es poco común encontrar intrones, sin embargo si estos se encuentran presentes interrumpen genes para tRNA (intrones del grupo I) y genes para rRNA (intrones del grupo II).

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta investigación apoyan en parte a la hipótesis de este “seminario de título” sobre la funcionalidad de genes para tRNA interrumpidos por intrones en *A. ferrooxidans*. A continuación se discutirá en

detalle los aspectos más relevantes que derivan de los resultados obtenidos en este trabajo.

1. Identificación de genes para tRNA en el genoma de las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993.

Antecedentes previos demuestran la presencia de dos set de genes para tRNA en el genoma de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, uno de ellos disperso en el genoma y otro que forma parte de un elemento integrativo y conjugativo denominado ICE*Af1* (Levicán y cols. 2009). El ICE*Af1* y los genes para tRNA que contiene no están presentes en la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Este estudio corresponde al primer análisis de las especies de tRNA presentes en el genoma de este microorganismo extremófilo.

Para identificar genes para tRNA existen dos importantes aproximaciones: una es la búsqueda de genes para tRNA y otra la predicción de su estructura secundaria. Los programas bioinformáticos diseñados para realizar estas aproximaciones se basan en un patrón de tRNA conocido (secuencias conservadas entre las especies de tRNA) y lo aplica para reconocer genes para tRNA desde la secuencia genómica completa. Pero la habilidad de encontrar verdaderos genes para tRNA depende de la validez de la predicción de la estructura secundaria de los tRNA, en donde se puede predecir el anticodón.

En esta investigación se utilizó el programa ARAGORN para la búsqueda detallada de genes para tRNA en el genoma de las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993. Se encontró que los genes para tRNA presentes en la cepa ATCC

53993 también están presentes en la cepa ATCC 23270, sin embargo esta última posee 37 genes para tRNA adicionales presentes en el elemento móvil ICEA_{f1}. En este elemento los genes para tRNA se encuentran organizados en una agrupación de 36 genes para tRNA. Este dato es interesante ya que hasta el momento no se describió ninguna agrupación de genes para tRNA con tal cantidad de genes en un elemento móvil. Anteriormente se había descrito la presencia de 12 genes para tRNA en el fago Φ149 de *Vibrio cholerae* (Manual y Gosh, 1993), y de 27 genes para tRNA en un megaplásmido de *Methylibium petroleiphilum* (Kane y cols., 2007). Esta información nos permitió detectar la presencia de una mayor cantidad de genes para tRNA en el genoma de la cepa ATCC 23270. Esto sugiere que esta cepa podría tener alguna ventaja frente a la cepa ATCC 53993, cuando se requiera una mayor población de tRNA. Sin embargo, los tRNA presentes en la agrupación no son capaces por sí solos de descodificar los 61 codones necesarios para la síntesis de proteínas (Levicán y cols., 2009).

Dentro de este análisis bioinformático se corroboró la presencia del gen que codifican para tRNA^{Ser}_{UGA} (gen *serTiAf*) en la cepa ATCC 53993 y de los genes que codifican para tRNA^{Ser}_{UGA} (gen *serTAf*) y tRNA^{Ser}_{UGA} (gen *serTiAf*) en la cepa ATCC 23270 previamente descritos por Levicán y cols. (2009), sin embargo no se encontró ninguna copia adicional de este gen.

2. Los genes para tRNA^{Ser}_{UGA} de *A. ferrooxidans* se expresan, procesan y son funcionales para la síntesis de proteínas.

En este trabajo se logró demostrar que la copia del gen *serTiAf* se expresa y procesa en ambas cepas ya que al realizar estudios de transcripción reversa (RT-PCR) se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado. En este ensayo no se logró detectar el pre-tRNA. Los resultados de la secuenciación efectivamente demuestran que el sitio de procesamiento del intrón corresponde a la posición 35 del tRNA maduro, corroborando la predicción bioinformática realizada por el programa ARAGORN. Sin embargo con estos resultados, no podemos decir a ciencia cierta si el producto obtenido es un tRNA maduro, ya que en este procedimiento se utilizaron oligonucleótidos que hibridan en los extremos de los tRNA, por lo que no sabemos cuál es el verdadero sitio de procesamiento en los extremos 3' y 5'. Para determinar la secuencia de los extremos 3' y 5' del tRNA maduro se secuenció el producto de amplificación obtenido del ensayo de cRT-PCR de la molécula de tRNA circularizada. Los resultados de la secuenciación demuestran que los genes para tRNA^{Ser}_{UGA} se procesan correctamente en los extremos 5' y 3'. Por otro lado, se encontró que el gen *serTAf* presente solamente en la cepa ATCC 23270 también se expresa y procesa correctamente en sus extremos 5' y 3', al igual que el gen *serTiAf*.

Para determinar si estos tRNA^{Ser}_{UGA} son funcionales, se realizó un ensayo de aminoacilación *in vivo* de estos tRNA en *A. ferrooxidans*. Los tRNA al encontrarse aminoacilados son capaces de participar, además de la síntesis de proteínas, en una variedad de procesos celulares. Entre esas funciones se encuentra la participación del

tRNA^{Gly} y tRNA^{Ser} en la síntesis de peptidoglicano (Petit *y cols.*, 1968, Francklyn y Minajigi, 2010) del tRNA^{Glu} en la síntesis de tetrapirroles (Jahn *y cols.*, 1992) y de múltiples tRNA en la regulación de una serie de procesos celulares relacionados con la homeostasis de aminoácidos (Yanofsky, 2000).

Los resultados obtenidos revelan un nivel de aminoacilación parcial de los tRNA^{Ser}_{UGA} *in vivo* (alrededor de un 50% de aminoacilación). Se ha descrito que el tRNA^{Ser}_{UGA} mitocondrial de mamíferos se aminoacila en un 70% (Chimnaronk *y cols.*, 2005).

En la bacteria *E. coli* se ha descrito que los niveles de aminoacilación se ven afectados por la disponibilidad de aminoácidos. El nivel de aminoacilación depende de la concentración de cada tRNA y del uso de sus codones en los mRNA. De este modo, los tRNA menos usados se mantienen aminoacilados cuando disminuye la concentración de los aminoácidos en el medio de cultivo (Elf *y cols.*, 2003; Dittmar *y cols.*, 2005; Lindsley *y cols.*, 2005). Se demostró que los codones correspondientes a los tRNA que se mantienen aminoacilados (bajo uso) se encuentran sobre-representados en los mRNA de las proteínas relacionadas con la síntesis de aminoácidos. Estas observaciones sugieren que cuando la bacteria se encuentra en carencia de aminoácidos la variación diferencial del nivel de aminoacilación de los distintos tRNA isoaceptores permitiría que la traducción de los mRNA relacionados con la síntesis de aminoácidos fuera más rápida que el resto de los mRNA (Elf *y cols.*, 2003). Los datos expuestos concuerdan con la idea de que la variación en los niveles de aminoacilación de los tRNA^{Ser}_{UGA} corresponde a un aumento o disminución de su uso en la síntesis de proteínas más que a una disminución del nivel de aminoacilación debido al protocolo utilizado. Esto se

comprobó con el control positivo utilizado en este ensayo. Por otro lado, el menor nivel de aminoacilación observado para estos tRNA quizás podría afectar la velocidad de traducción de los codones que corresponden a estos tRNA. Esto podría afectar la velocidad de síntesis de proteínas relacionadas.

Con respecto a la concentración de tRNA celulares los resultados sugieren que existiría mayor concentración del tRNA^{Ser}_{UGA} que el tRNA^{Ser}_{UGA} en la célula (alrededor de 10 veces más) ya que el tiempo de exposición necesario para visualizarlos en el Northern blot es diferente. Por lo que podemos concluir que el nivel de expresión del tRNA^{Ser}_{UGA} con intrón es mayor que para el tRNA^{Ser}_{UGA} presente en el ICEA1. Se ha sugerido que la concentración de tRNA celulares podría estar limitando la velocidad de traducción de las proteínas. Por ejemplo en *E. coli* y *S. cereviceae*, se ha observado que genes que se expresan altamente usan un subset de codones óptimos que se complementarían con los tRNA más abundantes dentro de la célula (Withers y cols., 2006). Por otro lado, se ha correlacionado la concentración de los tRNA con el número de copias del gen para tRNA, lo que conlleva a regular la síntesis de proteínas (Withers y cols., 2006; Kunisawa, 2002). En el caso de *A. ferrooxidans* el uso del codón UCA (leído por el tRNA^{Ser}_{UGA}) es de muy baja frecuencia en el genoma de la cepa ATCC 23270 y se encuentra sobre-representado en los mRNA de genes que participan en funciones relacionadas a elementos extracromosomales y móviles como son los genes que codifican para integrasas y proteínas relacionadas con la estabilidad plasmidial (Levicán y cols. 2009). La cepa ATCC 53993 tiene una copia del gen *serT* y la cepa ATCC 23270 tiene dos copias del gen *serT* lo que sugiere que la cepa ATCC 23270 al tener el ICEA1 posee mayor cantidad de proteínas relacionadas con funciones de

elementos cromosomales y móvil por lo que necesita descodificar mayor cantidad de codones UCA, necesitando mayor concentración de este tRNA para la síntesis de proteínas.

Para evaluar si los tRNA^{Ser}_{UGA} de *A. ferrooxidans* participan de la síntesis de proteínas se procedió a evaluar el crecimiento a 42°C de una cepa de *S. typhimurium* que presenta una mutación termosensible del gen *serT* (Chevance y cols, 2006).

Los resultados de la complementación nos reveló que efectivamente ambos tRNA^{Ser}_{UGA} de *A. ferrooxidans* son funcionales para la síntesis de proteínas.

Basándonos en los resultados expuestos nos planteamos la siguiente pregunta ¿podría esta copia extra del gen *serT* darle alguna ventaja adaptativa a la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en condiciones que demanden una mayor cantidad de este tRNA específico y esencial para la síntesis de proteínas?

En trabajos realizados anteriormente en nuestro laboratorio se señala que un tRNA^{Gln} y un tRNA^{Glu} contenidos en el ICEA1 se aminoacilan *in vivo*. Estos resultados sumados a los obtenidos en este trabajo sugieren que el contenido y la funcionalidad de los genes para tRNA en el genoma de *A. ferrooxidans* podría alterarse por transferencia horizontal de genes (ICEA1) y/o la modulación del procesamiento de los intrones existentes. Esto podría generar un repertorio plástico de tRNA que poseen diversas propiedades funcionales y eventualmente modular el proteoma bacteriano.

3. En *A. ferrooxidans* existen posibles genes que codifican para tRNA interrumpidos por intrones, algunos de los cuales se expresan y procesan.

En el genoma de *A. ferrooxidans* se identificaron varios posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones (14 en la cepa ATCC 23270 y 11 en la cepa ATCC 53993). El programa bioinformático ARAGORN utilizado para buscar estos genes realiza una búsqueda rápida por similitud de secuencias siendo capaz de detectar genes para tRNA interrumpidos por cualquier secuencia de DNA, a pesar de que está secuencia no posea las características usuales de los intrones del grupo I ó intrones del grupo II encontrados en bacterias. Por esta razón, probablemente los genes para tRNA interrumpidos por intrones detectados a partir de este programa sean pseudogenes. Para dilucidar esta interrogante se realizaron estudios de expresión y funcionalidad de estos genes.

Los resultados de amplificación por RT-PCR y de secuenciación indicaron que los tRNA^{Val}₆₄, tRNA^{Ala}₃₇, tRNA^{Asp}₃ y tRNA^{Lys}₇₄ se transcriben pero no se procesan ya que se detecta el pre-tRNA, no así el producto de tRNA maduro. Estos datos nos sugieren que el procesamiento de estos transcritos primarios no se está llevando a cabo al menos en las condiciones analizadas. En el caso del tRNA^{Cys}₆₀ se detecta un producto maduro aunque el sitio de procesamiento es diferente al predicho por el programa ARAGORN.

Con respecto a otros productos de amplificación secuenciados correspondientes a posibles tRNA maduros podemos concluir que la mayoría correspondían a productos de amplificación inespecíficos.

Los resultados obtenidos de los ensayos de RT-PCR, no son del todo concluyentes ya que en los casos que no se detecta un producto de amplificación no significa que los genes para tRNA_i no se estén expresando sino que por ejemplo para el caso de los tRNA_i con intrones con tamaños muy grandes probablemente no sean detectados si el intrón no se procesa. Por otro lado, se ha descrito en *Bacillus subtilis* que un tRNA^{Lys} se expresa y aminoacila en fase estacionaria pero no en fase exponencial. Resultados similares se obtuvieron con un tRNA^{Leu} en *Streptomyces coelicolor* (Ataide y cols., 2005). Esto sugiere que algunos de los tRNA_i quizás no se estén expresando en las condiciones estudiadas (fase exponencial tardía). El estudio de expresión y procesamiento en otras condiciones a las estudiadas podría ser una buena herramienta para tener resultados más concluyentes que nos pudiesen explicar de mejor manera la hipótesis planteada.

Los resultados de los ensayos de aminoacilación *in vivo* nos sugiere que los tRNA^{Cys}₆₀ y tRNA^{Ala}₃₇ no sean un tRNA propiamente tal ya que no son aminoacilados *in vivo*. Sin embargo la presencia de las moléculas de RNA tipo tRNA en *A. ferrooxidans* es interesante y plantea la pregunta si estos RNA cumplen otro rol diferente al que tienen los tRNA típicos. Los demás tRNA_i no se detectaron al menos en el rango de tamaño analizado en este experimento (entre 60 a 200 nt aproximadamente) y bajo las condiciones estudiadas. Cabe destacar que los tRNA^{Cys}₆₀ y tRNA^{Ala}₃₇, están presentes en el ICEA_{f1}. Ambos tRNA se están expresando, y al menos tRNA^{Cys}₆₀ no se aminoacila *in vivo*. Por otro lado, el intrón presente en el gen para tRNA^{Cys}₆₀ se procesa en un sitio diferente al predicho bioinformáticamente, sin embargo en el ensayo de Northern blot se detecta un RNA de tamaño mayor al esperado para el tRNA maduro, esto se puede deber

a que los extremos del tRNA no se estén procesando correctamente. Se ha determinado que en condiciones fisiológicas a baja concentración del precursor, la maduración del intrón ocurre antes que el procesamiento de los extremos del tRNA, mientras que a altas concentraciones de precursor, la maduración de los extremos precede a la del intrón. (Castaño *y cols.*, 1985; Han y Kang, 1997).

Todos estos datos confirman en parte que la mayoría de los genes para tRNAi serían pseudogenes o que estos tRNAi sean utilizados en alguna función celular que requiera niveles bajos de expresión. También es posible que su expresión sea regulada y aumente en otras condiciones distintas a las analizadas o que tengan alguna función alternativa dentro de la célula.

Los tRNA poseen ciertas características particulares o “elementos de identidad” que les permiten ser reconocidos específicamente por las aaRSs y además ser capaces de reconocer el codón correspondiente en el mRNA (Dirheimer *y cols.*, 1995). Mediante un análisis bioinformático utilizando una base de datos actualizada de tRNA (<http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de/>) (Jühling *y cols.*, 2009) se logró determinar los “elementos de identidad” de cada una de las diferentes especies de tRNAi. Este análisis nos reveló que la mayoría de los tRNAi de *A. ferrooxidans* no presentan los “elementos de identidad” correspondientes a su especie, esto nos confirma la idea de que sean pseudogenes.

Por ejemplo la mayoría de los tRNAi no presentan la secuencia CCA en su extremo 3' terminal, sin embargo esta característica puede ser revertida ya que post-transcripcionalmente puede ser añadida por la enzima tRNA-nucleotidil-transferasa encontrada en el genoma de *A. ferrooxidans*. Para el caso específico del tRNA^{Cys}₆₀

predicho por el programa ARAGORN (ver Figura 13B. en el apartado de Resultados), la estructura secundaria de este tRNA posee un brazo variable largo, sin embargo los resultados arrojados por la base de datos de tRNA nos revela que este tRNA con el anticodón ACA presenta un un brazo variable corto en todos las especies de tRNA. Por otro lado como se discutió anteriormente el tRNA^{Cys}₆₀ posee un procesamiento distinto del intrón al predicho por el programa ARAGORN. Al usar el resultado de la secuenciación en el programa ARAGORN nos arrojó que esta secuencia correspondía efectivamente a una estructura secundaria de un tRNA, sin embargo no se podía distinguir correctamente el anticodón. Este tRNA correspondería a un tRNA^{Ile}_{AAU} o a un tRNA^{Leu}_{UAA}, sin embargo ambos tRNA en la base de datos utilizada poseen brazos variables largos y la estructura secundaria obtenida corresponde a un tRNA con un brazo variable corto. Estos datos nos sugieren que este gen para tRNA^{Cys}₆₀ sería un pseudogen.

Además se llevo a cabo un análisis detallado del contexto genómico de cada pseudogen para tRNAi y se encontró que en la mayoría de los casos estos pseudogenes se encuentran interrumpiendo genes que codifican para proteínas.

Finalmente se puede mencionar que de los 15 genes para tRNA interrumpidos por intrones arrojados por el programa ARAGORN solamente uno es funcional (tRNA^{Ser}_{UGA}), por lo que confirma en parte nuestra hipótesis planteada sobre la funcionalidad de los tRNAi en *A. ferrooxidans*.

Sería interesante estudiar si los tRNAi están siendo procesados correctamente en los extremos y el lugar exacto de procesamiento del tRNA^{Cys}₆₀. Para ello hay que realizar experimentos de cRT-PCR y analizar una gran cantidad de clones, que permita obtener un resultado confiable.

CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en esta investigación corresponden al primer estudio sobre la caracterización del tRNA^{Ser}_{UGA} interrumpido por un intrón del grupo I en las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993. Se demostró que el gen que codifica para este tRNA es funcional para la síntesis de proteínas, ya que se obtiene un tRNA maduro capaz de complementar la mutación termosensible del gen *serT* de *S. typhimurium*, y además es capaz de aminoacilarse *in vivo*. La cepa ATCC 23270 posee un copia extra de este gen en un elemento móvil activo (*ICEA1*) que no se encuentra interrumpida por un intrón. Esta copia también es funcional para la síntesis de proteínas y se aminoacila *in vivo*.

Finalmente, se determinó que en *A. ferrooxidans* existen otros posibles genes para tRNA interrumpidos por intrones, algunos de los cuales se están expresando y procesando. Sin embargo la mayoría de estos corresponden a posibles pseudogenes, ya que no poseen los "elementos de identidad" específicos para cada especie de tRNA y además no se aminoacilan *in vivo*.

ANEXOS 1

Tabla 7. Predicción bioinformática de genes para tRNA de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Gen para tRNA	Anticodón	Tamaño ^a	Localización ^b	Gen para tRNA	Anticodón	Tamaño ^a	Localización ^b	Gen para tRNA	Anticodón	Tamaño ^a	Localización ^b
<i>lys1</i>	UUU	76	Chr	<i>leu33</i>	CAG	88	ICE	<i>asn66</i>	GUU	76	Chr
<i>phe2</i>	GAA	76	Chr	<i>glu34</i>	UUC	77	ICE	<i>leu67</i>	CAG	87	Chr
<i>asp7</i>	GUC	97	Chr	<i>glu35</i>	CUC	75	ICE	<i>ser68</i>	GGA	91	Chr
<i>gln4</i>	UUG	88	Chr	<i>arg36</i>	ACG	76	ICE	<i>leu69</i>	CAG	97	Chr
<i>tyr5</i>	GUA	85	Chr	<i>glu41</i>	GGC	88	ICE	<i>leu70</i>	UAA	85	Chr
<i>gly6</i>	UCC	74	Chr	<i>ile38</i>	GAU	76	ICE	<i>lys71</i>	CUU	76	Chr
<i>thr7</i>	GGU	76	Chr	<i>val39</i>	UAC	76	ICE	<i>arg72</i>	ACG	77	Chr
<i>trp8</i>	CCA	76	Chr	<i>met40</i>	CAU	76	ICE	<i>ser73</i>	CGA	91	Chr
<i>met9</i>	CAU	77	Chr	<i>met41</i>	CAU	75	ICE	<i>lys74</i>	UUU	93	Chr
<i>ile10</i>	GAU	77	Chr	<i>cys42</i>	GCA	75	ICE	<i>ser75</i>	UGA	90	Chr
<i>ala11</i>	UGC	76	Chr	<i>gln43</i>	UGU	75	ICE	<i>glu76</i>	UUC	76	Chr
<i>leu12</i>	GAG	92	Chr	<i>thr44</i>	UGU	76	ICE	<i>leu77</i>	UAG	85	Chr
<i>thr13</i>	UGU	76	Chr	<i>thr45</i>	UGU	76	ICE	<i>leu78</i>	CAA	87	Chr
<i>arg14</i>	CCU	76	Chr	<i>asp46</i>	GUC	77	ICE	<i>pro79</i>	UGG	77	Chr
<i>ser15</i>	GCU	93	Chr	<i>his47</i>	GUG	76	ICE	<i>met80</i>	CAU	77	Chr
<i>ile16</i>	GAU	88	Chr	<i>ser48</i>	CGA	92	ICE	<i>ala81</i>	CGC	76	Chr
<i>arg17</i>	UCU	77	Chr	<i>lys49</i>	CUU	76	ICE	<i>glu82</i>	CUC	76	Chr
<i>gly18</i>	GCC	75	Chr	<i>pro50</i>	CGG	78	ICE	<i>gly83</i>	CCC	74	Chr
<i>cys19</i>	GCA	74	Chr	<i>tyr51</i>	GUA	85	ICE	<i>gln84</i>	GGC	99	Chr
<i>thr20</i>	CGU	76	Chr	<i>ser52</i>	GGA	90	ICE	<i>pro85</i>	GGG	77	Chr
<i>val21</i>	UAC	76	Chr	<i>ser53</i>	GCU	89	ICE	<i>val86</i>	GAC	75	Chr
<i>asp22</i>	GUC	77	Chr	<i>leu54</i>	UAG	85	ICE	<i>leu87</i>	GAG	85	Chr
<i>ile23</i>	CAG	101	Chr	<i>ser55</i>	UGA	91	ICE	<i>arg88</i>	CCG	77	Chr
<i>ala24</i>	GGC	76	Chr	<i>pro56</i>	UGG	77	ICE	<i>gln89</i>	CUG	74	Chr
<i>leu25</i>	CAU	99	ICE	<i>asn57</i>	GUU	75	ICE	<i>gly90</i>	UCC	92	Chr
<i>arg26</i>	UCU	76	ICE	<i>ala58</i>	UGC	76	ICE	<i>gln91</i>	UUG	74	Chr
<i>arg27</i>	UCG	76	ICE	<i>gly59</i>	UCC	76	ICE	<i>his92</i>	GUG	76	Chr
<i>leu28</i>	UAA	85	ICE	<i>cys60</i>	ACA	96	ICE	<i>pro93</i>	CGG	77	Chr
<i>phe29</i>	GAA	76	ICE	<i>trp61</i>	CCA	77	ICE	<i>ala94</i>	UGC	76	Chr
<i>leu30</i>	CAA	85	ICE	<i>val62</i>	CAC	75	Chr	<i>ile95</i>	GAU	77	Chr
<i>lys31</i>	UUU	76	ICE	<i>val63</i>	CAC	75	Chr	<i>met96</i>	CAU	77	Chr
<i>gln32</i>	CUG	74	ICE	<i>gly64</i>	UCC	88	Chr	<i>tyr97</i>	AUA	91	Chr

^a Tamaño en nucleótidos; ^bChr: Cromosoma, ICE: ICEAfl. Los genes interrumpidos se destacan en gris.

La cepa ATCC 53993 tiene los mismos genes para tRNA que la cepa ATCC 53993 a excepción de los genes presentes en el ICEAfl

BIBLIOGRAFÍA

- **Ataide, S., Jester, B., Devine, K. y Ibba, M.** (2005) Stationary-phase expression and aminoacylation of a transfer-RNA-like small RNA. *EMBO reports* 6: 742-747
- **Berg, J., Tymoczko, J. y Stryer, L.** (2002) Synthesizing the Molecules of Life. En: *Biochemistry*, 5th edition. W.H. Freeman, New York., ISBN: 0-7167-3051-0
- **Björk, G.** (1995) Biosynthesis and function of modified nucleosides. En: *tRNA: structure, biosynthesis, and function*. Söll, D. y Rajbhandary, U. (eds). ASM Press, Washington, D.C., ISBN 1-55581-073-X
- **Bustamante, P., Gutiérrez, F., Almarza, O., Levicán, G., Katz, A., Valdés, J., Quatrini, R., Holmes, D. S. y Orellana, O.** (2009) Un elemento integrativo y conjugativo en *Acidithiobacillus ferrooxidans* que agrupa 36 genes para tRNA. Presentación oral en el Congreso de Microbiología de Chile (SOMICH)
- **Castaño, J., Tobian, J. y Zasloff, M.** (1985) Purification and characterization of an endonuclease from *Xenopus laevis* ovaries which accurately processes the 3' terminus of human pre-tRNA-Met (i) (3'pre-tRNase). *J. Biol. Chem.* 260: 9002-9008
- **Cathopoulis, T., Chuawong, O. y Hendrickson, T.** (2007) Novel tRNA aminoacylation mechanisms. *Mol. BioSyst.* 3: 408-418
- **Chevance, F., Karlinsey, J., Wozniak, C. y Hughes, K.** (2006) A little gene with big effects: a *serT* mutant is defective in *flgM* gene translation. *J. Bacteriol.* 188: 297-304

- **Chimnaronk, S., Jeppesen, M., Suzuki, T., Nyborg, J., y Watanabe, K. (2005)** Dual-mode recognition of noncanonical tRNAs^{Ser} by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria. *EMBO Journal*. 24: 3369-3379
- **Choi, H., Gabriel, K., Schneider, J., Otten, S. y McClain, W. (2003)** Recognition of acceptor-stem structure of tRNA^{Asp} by *Escherichia coli* aspartyl-tRNA synthetase. *RNA* 9:386-393
- **Colmer, A. y Hinkel, M. (1947)** The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science*. 106: 253–256
- **Dai, L., Toor, N., Olson, R., Keeping, A. y Zimmerly, S. (2003).** Database for mobile group II introns. *Nucleic Acids Res.* 31: 424-426. (Disponible en: <http://www.fp.ucalgary.ca/group2introns/>)
- **Dirheimer, G., Keith, H., Dumas, P. y Westhof E. (1995)** Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs. En: *tRNA: structure, biosynthesis, and function*. Söll, D. y Rajbhandary, U. (eds). ASM Press, Washington, D.C., ISBN 1-55581-073-X
- **Dittmar, K., Sorensen, M., Elf, J., Ehrenberg, M. y Pan, T. (2005)** Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO Rep.* 6:151-157
- **Elf, J., Nilsson, D. Tenson, T. y Ehrenberg, M. (2003)** Selective charging of tRNA isoacceptors explains patterns of codon usage. *Science*. 300:1718-1722
- **Francklyn, C. y Minajigi, A. (2010)** tRNA as an active chemical scaffold for diverse chemical transformations. *FEBS Letters* 584: 366–375

- **Goodman, H., Olson, M. y Hall, B. (1977)** Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: The yeast tyrosine-inserting ochre suppressor *SUP4-o*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5453-5457
- **Han, S. y Kang, H. (1997)** Purification and characterization of the precursor tRNA 3'-end processing nuclease from *Aspergillus nidulans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 233: 354-358
- **Hanger, P., Simon, D. y Bhattacharya, D. (2005)** The natural history of group I introns. *TRENDS in Genetics.* 21: 112-118
- **Hoagland, M., Stephenson, M., Scott, J., Hecht, I. y Zamecnik, P. (1958)** A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 231:241-257
- **Jahn, D., Verkamp, E. y Söll, D. (1992)** Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *TIBS.* 17:215-218
- **Jühling, F., Mörl, M., Hartmann, R., Sprinzl, M., Stadler, P. y Pütz, J. (2009)** tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res.* 37: 159-162 (Disponible en: <http://trnadb.bioinf.uni-leipzig.de/>)
- **Kane, S., Chakicherla, A., Chain, P., Schmidt, R., Shin, M., Legler, T., Scow, K., Larimer, F., Lucas, S., Richardson, P. y Hristova, K. (2007)** Whole-genome analysis of the methyl *tert*-butyl ether-degrading beta-proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1. *J. Bacteriol.* 189: 1931-1945
- **Kawach O., Voß C., Wolff J., Hadfi K., Maier U. y Zauner S. (2005)** Unique tRNA introns of an enslaved algal cell. *Mol. Biol. Evol.* 22:1694-1701

- **Kunisawa, T.** (2002) Functional role of bacteriophage transfer RNAs: codon usage analysis of genomic sequences stored in the GENBANK/EMBL/DDBJ databases. *Data Science Journal.* 1: 216-228
- **Laslett, D. y Canback, B.** (2004) ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res.* 32: 11-16. (Disponible en: <http://130.235.46.10/ARAGORN/>)
- **Levicán, G., Katz, A., Valenzuela, P., D. y Orellana, O.** (2005) A tRNA^{Glu} that uncouples protein and tetrapyrrole biosynthesis. *FEBS Letters.* 579: 6383-6387
- **Levicán, G., Katz, A., de Armas, M. y Orellana, O.** (2007) Regulation of a glutamyl-tRNA synthetase by the heme status. *PNAS.* 104: 3135-3140
- **Levicán, G., Katz, A., Valdés, J., Quatrini, R., Holmes, D. y Orellana, O.** (2009) A 300 kpb genome segment, including a complete set of tRNA genes, is dispensable for *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Advanced Materials Research.* 71: 187-190
- **Li, Z., Gong, X., Joshi, V. y Li, M.** (2005) Co-evolution of tRNA 3' trailer sequences with 3' processing enzymes in bacteria. *RNA.* 1: 567-577
- **Lindsley, D., Bonthuis, P., Gallant, J., Tofoleanu T., Elf, J. y Ehrenberg, M.** (2005) Ribosome bypassing at serine codons as a test of the model of selective transfer RNA charging. *EMBO Rep.* 6:147-150
- **Lohan A. y Gray M.** (2004). Methods for analysis of mitochondrial tRNA editing in *Acanthamoeba castellanii*. *Methods Mol. Biol.* 265: 315-332
- **Manual, M. y Ghosh. R.** (1993) Structural organization of the transfer RNA gene clusters of cholera phage ϕ 149. *J. Biosci.* 18: 195-205

- **Marck, C. y Grosjean, H.** (2002) tRNomics: Analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eucarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodón-sparing strategies and domain-specific features. *Bioinformatics*. 8: 1189-1232
- **Meinzel, T., Mechulam, Y., y Blanquet, S.** (1995) Aminoacyl-tRNA Synthetases: Occurrence, Structure, and Function. En: *tRNA: structure, biosynthesis, and function*. Söll, D. y Rajbhandary, U. (eds). ASM Press, Washington, D.C., ISBN 1-55581-073-X
- **National Center for Biotechnology Information (NCBI)** (Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- **Petit, J., Strominger, J. y Söll, D.** (1968). Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VII. Incorporation of serine and glycine into interpeptide bridges in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biol. Chem.* 243:757-767
- **Pettersson, B.** (2009) tRNA gene structures in bacteria. Acta Universitatis Upsaliensis. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*, Uppsala. ISBN 978-91-554-7480-5
- **Phelps, S. y Joseph, S.** (2005) Non-bridging phosphate oxygen atoms within the tRNA anticodon-stem loop are essential for ribosomal A site binding and translocation. *J. Mol. Biol.* 349: 288-301
- **Phizicky, E. y Hopper, A.** (2010) tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* 24:1832-60
- **Rawlings D. y Kusano T.** (1994) Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58: 39-55

- **Rawlings, D. y Silver, S.** (1995) Mining with microbes. *Nature Biotechnology*. 13:773-778
- **Ryckelynck, M., Giegé, R. y Frugier, M.** (2005) tRNAs and tRNA mimics as cornerstones of aminoacyl-tRNA synthetase regulations. *Biochimie*. 87: 835-845
- **Salazar, J., Ambrogelly, A., Crain, P., McCloskey, J. y Söll, D.** (2004) A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA. *PNAS*. 101:7536-7541
- **Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Col Spring Harbor Laboratory Pres. USA.
- **Söll, D. y Rajbhandary, U.** (1995) Transfer RNA in its fourth decade. En: *tRNA: structure, biosynthesis, and function*. Söll, D. y Rajbhandary, U. (eds). ASM Press, Washington, D.C., ISBN 1-55581-073-X
- **Sprinzl, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. y Steinberg, S.** (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Research*. 26: 148–153
- **Smith, T.** (1991) Intron phylogeny: a new hypothesis. *TIG*. 7: 145-148
- **Valdés J., Pedroso I., Quatrini R., Dodson R., Tettelin H., Blake II R., Eisen J., Holmes D.** (2008a). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics*. 9: 597
- **Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R. y Holmes, D.** (2008b) Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 94: 180-184

- **Vepritskiy A., Vitol A. y Nierzwicki-Bauer S.** (2001). Novel Group I intron in the tRNA^{Leu} (UAA) gene of γ -Proteobacterium isolated from deep subsurface environment. *J. Bacteriol.* 184: 1481-1487
- **Weiner, A.** (2004) tRNA maturation: RNA polymerization without a nucleic acid template. *Curr Biol* 14: 883-885
- **Westaway, S. y Abelson, J.** (1995) Splicing of tRNA precursors. En: *tRNA: structure, biosynthesis, and function*. Söll, D. y Rajbhandary, U. (eds). ASM Press, Washington, D.C., ISBN 1-55581-073-X
- **Withers, M., Wernish, L. y Dos Reis, M.** (2006) Archaeology and evolution of transfer RNA genes in the *Escherichia coli* genome. *RNA*. 12: 933-941
- **Wozniak, R. y Waldor, M.** (2009) A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element. *PLoS Genet.* 5:1-11
- **Yanofsky, C.** (2000) Transcription attenuation: Once viewed as a novel regulatory strategy. *J. Bacteriol.* 182:1-8
- **Zhou, Y., Lu, C., Wu, Q., Wang, Y., Sun, Z., Deng, J. y Zhang, Y.** (2008) GISSD: Group I intron sequence and structure database. *Nucleic Acids Res.* 36: 31-37. (Disponible en: <http://www.rna.whu.edu.cn/gissd/help.html>)