



Caracterización de la proteína FNR de *A. ferrooxidans*, estructural y funcionalmente

**Tesis entregada para optar al grado de
Doctor en Biociencias Moleculares**

Héctor Marcelo Osorio Urtubia

Director de Tesis: David Holmes

Codirectora: Eugenia Jedlicki

**Santiago – Chile
2012**

RESUMEN

En este estudio se demostró la capacidad de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC23270 de vivir en condiciones anaeróbicas de crecimiento utilizando S^0 y Fe^{+3} como dador y aceptor de electrones respectivamente.

Se identificó en el genoma de la bacteria un gen *fnr* que podría codificar para el regulador global de la anaerobiosis, la proteína FNR (Fumarate Nitrate Reduction). Al comparar la secuencia aminoacídica de FNR_{AF}, con la del ortólogo mejor caracterizado, la proteína FNR de *E. coli*, se observó grandes similitudes en relación a los dominios, motivos y aminoácidos importantes para la función de esta clase de proteínas. Entre éstos últimos, se identificó cuatro residuos de cisteína fundamentales para la unión de un centro $[4Fe-4S]^{+2}$ en condiciones anaeróbicas en la proteína. Al modelar estructuralmente FNR_{AF} en base a la estructura cristalina de un miembro relacionado de la familia, la proteína CRP (Proteína activadora del catabolismo), se observó una distribución espacial similar de los residuos de cisteína encargados de unir el centro $[4Fe-4S]^{+2}$, al observado en la proteína FNR de *E. coli*. Todos estos resultados sugieren fuertemente que FNR_{AF} tiene una función similar al de otras proteínas FNRs descritas en otras bacterias.

La proteína FNR_{AF} purificada anaeróbicamente mostró distintas características como color, absorbancia UV-Visible y cantidad de hierro que sugieren fuertemente la unión de un centro $[4Fe-4S]^{+2}$, el cual es un cofactor esencial para su función regulatoria. Una característica interesante encontrada en FNR_{AF} fue la menor sensibilidad a oxígeno que presentó el centro $[4Fe-4S]^{+2}$ en comparación a proteínas ortólogas, lo cual no ha sido descrito anteriormente en otras bacterias y podría dar cuenta del funcionamiento de la proteína tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas de crecimiento, permitiendo de este modo, una mejor transición de la bacteria entre ambos tipos de ambientes.

También se logro identificar en la bacteria distintos sitios de unión de FNR_{AF} ubicados en regiones promotoras de genes pertenecientes a distintas vías metabólicas tales como transporte de membrana, stress, reacciones redox, regulación transcripcional y metabolismo energético. En esta última categoría se identificó un complejo multienzimático de proteínas de membrana denominado SreABCD, el cual ha sido asociado en otros microorganismos a la reducción anaeróbica de azufre. Ensayos de RT-qPCR y proteómica demostraron que tanto a nivel transcripcional como traduccional, los niveles de expresión de *sreABCD* se vieron incrementados en fase estacionaria del crecimiento anaeróbico. Análisis de co-transcripción mediante RT-PCR demostraron que *sreABCD* se expresó como una sola unidad transcripcional constituyendo por ende un operón. La ubicación de este sitio de unión a FNR es característico de promotores tipo II (sitio de unión de FNR ubicado rio arriba de caja -35 de unión a la RNA polimerasa), los cuales

activan la expresión de genes ubicados río abajo del promotor por medio de la acción del regulador FNR. También en experimentos *in vivo* en cepas heterólogas de *E. coli*, se demostró la activación en la expresión de *sreABCD* dependiente de la expresión de FNR_{AF}.

Todos los resultados anteriormente señalados permitieron identificar posibles redes de interacción génica que operan en la bacteria al vivir en condiciones anaeróbicas de crecimiento. Lográndose predecir relaciones funcionales dependientes del regulador FNR_{AF}, tales como las conexiones entre las hidrogenasas tipo hupSL encargadas de la oxidación de hidrógeno acoplado a la reducción de azufre (*sreABCD*) y a la formación de cisteína (*cysJIHDNG*). Este aminoácido es importante en la unión de centros Fe-S en metaloproteínas como FNR. Estas nuevas evidencias abren la puerta a futuras investigaciones que permitan comprender de mejor manera el inusual metabolismo anaeróbico de *A. ferrooxidans* ATCC23270.

Esta tesis establece el marco de trabajo para futuras investigaciones dirigidas a explorar los genes y vías metabólicas que utiliza *A. ferrooxidans* ATCC23270 para poder adaptar su metabolismo a condiciones de crecimiento anaeróbico y enfocadas a la caracterización de los posibles mecanismos regulatorios utilizados por el regulador FNR_{AF} para permitir dicha adaptación metabólica.

ABSTRACT

This study investigated molecular genetic aspects of the growth of the chemolithoautotrophic acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in anaerobic growth conditions using S^0 and Fe^{+3} as electron donor and acceptor respectively.

A gene denominated *fnr*_{AF} was identified in the genome of *A. ferrooxidans* that is predicted to encode the global regulator FNR (Fumarate Nitrate Reductase). A comparison of the amino acid sequence of FNR_{AF} with the FNR of *Escherichia coli*, revealed conserved domains, motifs and amino acids important for the function of this class of proteins including four critically positioned cysteine residues predicted to be involved in the binding of a $[4Fe-4S]^{+2}$ center under anaerobic conditions. Molecular modeling of the three dimensional structure of FNR_{AF} using the structurally related CRP (Catabolite Activator Protein) crystal structure as a template demonstrated significant conservation of the spatial distribution of the critical cysteine residues. These results strongly suggest that FNR_{AF} has a similar function to other reported FNRs.

FNR_{AF}, purified under anaerobic conditions, exhibited properties such as color, UV-visible absorbance and amount of iron that are characteristic of an $[4Fe-4S]^{+2}$ center, an essential cofactor for the regulatory function of FNR_{AF}. An interesting feature of FNR_{AF} was the diminished sensibility of the $[4Fe-4S]^{+2}$ center to oxygen compared with orthologous FNRs. This has not previously been described in other bacteria and could provide a mechanism that permits *A. ferrooxidans* to live aerobically or anaerobically and to transition between the two states.

In addition, FNR binding sites were predicted using bioinformatic tools in promoter regions of genes belonging to a number of metabolic pathways such membrane transport functions, stress and redox reactions, transcriptional regulation and energy metabolism. Among the latter is the SreABCD complex involved in the anaerobic reduction of sulfur in other bacteria. RT-qPCR and proteomic analyses demonstrated that the transcription of the *sreABCD* gene cluster and the levels of SreABCD encoded proteins were increased during stationary phase under anaerobic conditions. PCR analysis demonstrated that the *sreABCD* gene cluster was expressed as a single transcriptional unit and is therefore an operon. An FNR DNA binding site was identified upstream of the promoter of the operon using HMM and PSSM bioinformatics tools for pattern-matching. The promoter exhibited sequence characteristics of type II promoters responsible for activation of downstream genes. Activation of *SreABCD* by FNR_{AF} was experimentally validated through *in vivo* assays with a reporter gene in a heterologous host (*E. coli*).

Combining the above results allowed a systems biology approach to be developed that predicted a network of interacting genes and pathways used in anaerobic metabolism under the control of the master regulator FNR. This network predicts genetic connections not previously described in other bacteria for regulators of the FNR class such as the connections between *hupSL*, involved in oxidation of molecular hydrogen coupled to the reduction of sulfur (*sreABCD*) and cysteine formation (*cysJIHDNG*); the latter is involved

in the binding of Fe-S centers in metalloproteins such as FNR. These novel features merit further attention because they may provide insight into the unusual metabolism of *A. ferrooxidans*.

This thesis sets the framework for future research directed at exploring the metabolic strategies used by *A. ferrooxidans* ATCC23270 to adapt its metabolism to anaerobic conditions. It also focuses the attention of the experimental biologist on key genetic and metabolic facets of the anaerobic response that require further experimental investigation.