

UCH-FC
MAG-B
D 542
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“ESTUDIO FUNCIONAL DE LA
VÍA DEL SEGUNDO
MENSAJERO C-DI-GMP DE
Acidithiobacillus thiooxidans
DSM 9463”**

**TESIS ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE EN CUMPLIMIENTO
PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**POR
MAURICIO JAVIER DÍAZ FUENZALIDA**

**Enero, 2014
SANTIAGO - CHILE**

DIRECTOR DE TESIS: DR. NICOLÁS GUILIANI GUERIN

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

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

MAURICIO JAVIER DÍAZ FUENZALIDA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de Octubre de 2012.


Director de Tesis:

Dr. Nicolás Guiliani


.....

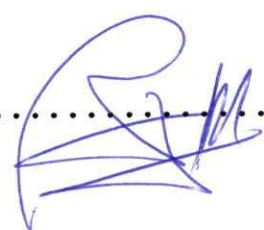
Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Francisco Chávez, Presidente



.....

Dr. Marcelo Baeza


.....

Dedicado a la memoria de José Fuenzalida, mi abuelo



Hay cosas que no han cambiado desde que escribí mi última biografía, como el hecho que nací el 7 de Mayo del año 1986 en la ciudad de Rancagua, que soy el hijo mayor del matrimonio de mis padres Lila y Jorge y que pasé mi infancia en la comuna de Machalí.

Como dije anteriormente en mi seminario de título, el año 2004 entré a la Facultad de Ciencias a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular y en el año 2008 comencé a realizar mi unidad de investigación en el Laboratorio de Comunicación bajo la tutela del Dr. Nicolás Guiliani, en donde posteriormente me titulé profesionalmente de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Este año logro terminar el Magister en una forma que se ha enredado con mis estudios posteriores, ya que fui aceptado en programa de Doctorado en ciencias con mención en Microbiología.

Básicamente he tenido que escribir esta tesis molesta en medio de clases, pruebas y pasantías en Alemania, donde aproveché de visitar Berlín. Aunque sacrificué el verano con mi familia para esta estadía, me sentí tranquilo porque detesto el calor.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por apoyarme siempre durante mis estudios universitarios y durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Nicolás Guiliani por permitirme realizar la tesis en su laboratorio.

A los miembros del Laboratorio de Comunicación Bacteriana que me han ayudado, aunque se hayan graduado y me hayan dejado solo.

A los Proyectos Fondecyt 1080441 y 1120295 por financiar la investigación durante el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE ANEXOS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	29
DISCUSIÓN	49
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	60
ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aminoácidos clave involucrados en la actividad DGC del dominio GGDEF de la proteína PleD (<i>Caulobacter crescentus</i>).	4
Figura 2. Aminoácidos claves involucrados en la actividad del dominio EAL de la proteína Tbd1265 (<i>Thiobacillus denitrificans</i>).	6
Figura 3. Diversidad estructural existente en algunos de los componentes que participan en el metabolismo y vía de señalización del c-di-GMP en diversas bacterias.	9
Figura 4. Contextos genómicos de los genes relacionados al metabolismo y señalización del c-di-GMP identificados en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	32
Figura 5. Alineamiento de secuencias entre los putativos dominios GGDEF identificados en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	34
Figura 6. Alineamiento de secuencias entre los putativos dominios EAL identificados en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	37
Figura 7. Alineamiento del putativo dominio HD-GYP identificado en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	38
Figura 8. Alineamiento entre los putativos dominios PilZ identificados en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	41
Figura 9. Análisis cualitativo de la expresión transcripcional de los putativos genes GGDEF y EAL encontrados en <i>At. thiooxidans</i> .	42
Figura 10. Curva de calibración de c-di-GMP utilizada en espectrometría de masas.	45
Figura 11. Análisis por MS/MS de soluciones de c-di-GMP.	46
Figura 12. Complementación heteróloga en cepas mutantes AdrA1f y MAE282 de <i>Salmonella</i> .	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración intracelular de c-di-GMP en algunas bacterias.	3
Tabla 2. Identificación de genes que codifican putativas DGCs y PDEs en el genoma de <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	30
Tabla 3. Genes codificantes para putativas proteínas con el dominio de unión a c-di-GMP PilZ identificados en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	31
Tabla 4. Predicción bioinformática de la funcionalidad de los putativos dominios GGDEF identificados en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	35
Tabla 5. Predicción bioinformática de la funcionalidad de los putativos dominios EAL identificados en <i>At. thiooxidans</i> ATCC 19377.	39
Tabla 6. Resumen de resultados de los experimentos de RT-PCR.	42
Tabla 7. Resumen de la determinación de c-di-GMP por MS.	45
Tabla 8. Presencia de especies iónicas moleculares en los análisis de MS/MS con polaridad positiva.	45
Tabla 9. Comparación entre miembros de <i>Acidithiobacillus</i> .	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Tabla A1. Representación génica de la vía metabólica del c-di-GMP presentes en genomas pertenecientes a diferentes linajes de bacterias.	69
Tabla A2. Cepas y plasmidios utilizados en este estudio.	71
Tabla A3. Partidores utilizados en este estudio.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
c-di-GMP	Diguanilato cíclico
cDNA	DNA complementario
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
DGC	Diguanilato ciclasa
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
LB	Luria-Bertani (medio de cultivo)
MS	Espectrometría de masas
ORF	Marco de lectura abierto (Open Reading Frame)
PDE	Fosfodiesterasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QS	Quorum Sensing
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcripción reversa acoplada a PCR
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

RESUMEN

Las biopelículas son ecosistemas microbianos organizados conformados por múltiples clases de microorganismos envueltos en una matriz extracelular sobre una superficie viva o inerte. Estas estructuras poseen gran importancia en los ámbitos de la ecología, la biominería, la biorremediación y la medicina. Debido a su importancia en el proceso de biolixiviación, ya que permite un contacto estrecho entre microorganismo y sustrato, nuestro laboratorio se ha enfocado en caracterizar los mecanismos moleculares de formación de biopelículas en bacterias biomineras pertenecientes al género *Acidithiobacillus*.

La formación de biopelículas es un proceso muy complejo que se encuentra regulado a múltiples niveles. En numerosas bacterias Gram-negativas, los procesos de adhesión a superficies y formación de biopelículas se encuentran bajo la regulación del segundo mensajero diguanilato cíclico (c-di-GMP). Éste es sintetizado a partir de GTP por proteínas con actividad diguanilato ciclasas (DGCs) y degradado por proteínas fosfodiesterasas (PDEs). Mediante seis clases de receptores de naturaleza proteica y un dominio receptor conservado en la región 5' no codificante en algunos mRNA ("riboswitch") se regulan procesos como motilidad, secreción de factores de adhesión a superficies, formación de biopelículas, respuesta a estrés ambiental y virulencia.

Debido a la importancia del c-di-GMP en la regulación del proceso de formación de biopelículas, se decidió determinar si la bacteria biominera *Acidithiobacillus thiooxidans* poseía una vía del c-di-GMP funcional, tal como había sido descrito para

Acidithiobacillus ferrooxidans, una bacteria mesófila oxidante de ión ferroso y compuestos de azufre, y *Acidithiobacillus caldus*, una bacteria termófila moderada oxidante de compuestos de azufre. *At. thiooxidans*, como otros miembros del género *Acidithiobacillus*, es una γ -proteobacteria, acidófila y quimiolitotrófica que oxida azufre elemental y compuestos reducidos de azufre. Comparte el mismo ambiente que *At. ferrooxidans*, sin embargo *At. thiooxidans* es incapaz de oxidar hierro o piritita, pero es capaz de resistir pH más extremos que *At. ferrooxidans*. Se sabe que *At. thiooxidans* es capaz de formar biopelículas sobre la superficie de los minerales, pero los mecanismos moleculares que controlan este fenotipo siguen siendo desconocidos.

El análisis bioinformático de la secuencia genómica de la cepa tipo ATCC 19377 de *At. thiooxidans* reveló la presencia de 25 posibles genes que codificarían para proteínas con dominios relacionados con el metabolismo del c-di-GMP y además diez putativos genes codificando proteínas efectoras capaces de unir c-di-GMP. Dentro de estas se encuentran PelD y CelA, que formarían parte de complejos multiproteicos de membrana que sintetizan exopolisacáridos de tipo Pel o celulosa, respectivamente.

Al comparar la secuencia aminoacídica de los dominios identificados con dominios funcionales, se determinó que la mayoría poseen los aminoácidos clave para su función.

Mediante experimentos de RT-PCR, se demostró que la mayoría de los genes estudiados en la cepa DSM 9463 se expresan bajo las condiciones de crecimiento utilizadas. Por otro lado, al analizar por espectrometría de masas los extractos

enriquecidos en nucleótidos a partir de células de *At. thiooxidans* crecidas en diferentes sustratos energéticos, se detectó la presencia de c-di-GMP, lo cual permite concluir que esta especie de *Acidithiobacillus* también es capaz de producir este segundo mensajero. Finalmente, al realizar ensayos de complementación heteróloga en cepas mutantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se demostró que los genes *AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224* y *AthiA1_15675* restauran el fenotipo rugoso de la cepa mutante en una diguanilato ciclasa (DGC), indicando por ende que éstos codifican DGCs funcionales.

Este conjunto de resultados permite concluir que la bacteria biominera *Acidithiobacillus thiooxidans* tiene una vía del c-di-GMP funcional y que podría estar involucrada en la regulación de la formación de biopelículas mediante la síntesis de exopolisacáridos de tipo Pel, de tipo celulosa, o ambos.

ABSTRACT

Biofilms are organized microbial ecosystems made up of multiple classes of microorganisms involved in extracellular matrix on a living or inert surface. These structures have great importance in the fields of ecology, bio-mining, bioremediation and medicine. Because of its importance in the process of bioleaching, allowing close contact between microorganism and substrate, our laboratory has focused on characterizing the molecular mechanisms of biofilm formation in biomining bacteria belonging to the genus *Acidithiobacillus*.

Biofilm formation is a complex process that is regulated at multiple levels. In many Gram-negative bacterias, the processes of adhesion to surfaces and biofilm formation are under the regulation of second messenger c-di-GMP. This is synthesized from GTP by proteins with diguanylate cyclases activity (DGCS) and degraded by phosphodiesterases proteins (PDEs). Through six classes of proteinaceous receptors and a conserved domain in 5' untranslated region in some mRNAs ("riboswitch") regulate processes such as motility, secretion of factors of adhesion to surfaces, biofilm formation, response to environmental stress and virulence.

Due of the importance of c-di-GMP in biofilm formation, it was decided to determine if the booming bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* possessed a functional c-di-GMP pathway, as had been described for *Acidithiobacillus ferrooxidans*, an iron and sulfur compounds oxidizing bacteria, and *Acidithiobacillus caldus*, a moderate thermophilic, sulfur compounds oxidizing bacteria. *At. thiooxidans*, like other members

from *Acidithiobacillus* genus, is an acidophilic and chemolithoautotrophic γ -proteobacteria oxidizing elemental sulfur or reduced sulfur compounds. It share the same environment that *At. ferrooxidans*, however, *At. thiooxidans* is not capable to oxidize iron or pyrite, but is capable resist more extreme pH than *At. ferrooxidans*. Is known that *At. thiooxidans* is capable to form biofilms in mineral surfaces, but the molecular mechanisms that control this phenotype are still unknown.

Bioinformatic analysis of the genomic sequence of the type strain ATCC 19377 of *At. thiooxidans* revealed the presence of 25 potential genes that encode for proteins with functions related to metabolism plus ten putative genes encoding proteins involved in signaling of c-di-GMP, within which are PelD and CelA.

By comparing the amino acid sequence of the domains identified with functional domains, we found that most possessed the key amino acids for its function. This suggests the existence of a functional pathway in this organism.

By RT-PCR experiments showed that most studied of strain DSM 9463 are expressed under the growth conditions used. Furthermore, the analysis by mass spectrometry of nucleotide enriched extracts from cells of *At. thiooxidans* grown on different energy substrates detected the presence of c-di-GMP, which allows the conclusion that this species of *Acidithiobacillus* is also capable of producing this second messenger. Finally, by heterologous complementation assays in mutant strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium demonstrated that *AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224* and *AthiA1_15675* genes restore the rough phenotype of

the mutant strain in a diguanylate cyclase (DGC), thus indicating that these genes encode functional DGCs.

These results allow conclude that the biomining bacteria *Acidithiobacillus thiooxidans* has a functional c-di-GMP pathway that could be involved in regulation of biofilm formation through the exopolysaccharide synthesis, either Pel type or cellulose type, or both.

INTRODUCCIÓN

1.1. Biopelículas.

Las biopelículas son ecosistemas microbianos organizados con características funcionales y estructuras complejas (Costerton y col., 1995). Las biopelículas se componen de una o varias clases de microorganismos que se adhieren sobre una superficie viva o inerte, formando una comunidad (Davey y O'Toole, 2000). Las biopelículas son extremadamente importantes desde un punto de vista ecológico (Costerton y col., 1995), industrial (Olivera-Nappa y col., 2010; Saha y Donofrio, 2012) y médico, debido, para este último campo, a su participación en las infecciones persistentes y resistencia a los antibióticos (Sauer y col., 2007).

Los microorganismos inmersos dentro de las biopelículas difieren de sus contrapartes planctónicas tanto a nivel morfológico como fisiológico (Watnick y Kolter, 2000). Los estudios de formación de biopelículas en bacterias han definido las diferentes etapas, las cuales son i) el movimiento de las células hacia el sustrato, ii) la interacción inicial inespecífica entre la bacteria y el sustrato, iii) la colonización secundaria a través de interacciones específicas célula-sustrato y célula-célula, iv) la formación de microcolonias y maduración de la biopelícula y v) la secreción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) a modo de matriz protectora (Davey y O'Toole, 2000). Estas EPS se componen principalmente de exopolisacáridos, aunque también se encuentran proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Fleming y Wingender, 2010). La naturaleza de

estas EPS depende de los microorganismos participantes, los sustratos y las condiciones ambientales (Branda y col, 2005).

Dado que el proceso de formación y desarrollo de biopelículas es extremadamente complejo, necesita ser regulado a diferentes niveles. Dentro de los mecanismos moleculares que regulan el proceso de formación de biopelículas en diferentes bacterias se encuentran la vía del “Quorum Sensing” (QS) (Thoendel y Horswill, 2010; Galloway y col., 2011) y la vía del segundo mensajero diguanilato cíclico (c-di-GMP) (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004).

1.2. Vía del c-di-GMP.

El segundo mensajero nucleotídico diguanilato cíclico (c-di-GMP) fue descubierto inicialmente como un activador alostérico de la proteína celulosa sintasa de la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* (Weinhouse y col., 1997). A lo largo de los años se ha visto que este segundo mensajero se encuentra presente en diversos linajes de bacterias (Ryjenkov y col., 2005; Jenal y Malone, 2006; Tamayo y col., 2007). El impacto global que posee este segundo mensajero en la fisiología bacteriana recién ha comenzado a descifrarse mediante técnicas bioinformáticas y experimentales (Jonas y col., 2009). Los niveles intracelulares de c-di-GMP (Tabla 1) son regulados por la actividad de dos grupos de proteínas con actividades opuestas: diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs) (Kirillina y col., 2004; Römling y col., 2005).

Tabla 1. Concentración intracelular de c-di-GMP en algunas bacterias.

Bacteria	[c-di-GMP] (pmol/mg célula)	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	0,2-0,6	Spangler y col., 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-10,1	Barraud y col., 2009
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	5	Lee y col., 2010a
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	8-81*	Ruiz y col., 2012
<i>Shewanella oneidensis</i>	20	Thormann y col., 2006

* El valor de concentración intracelular de c-di-GMP expresado en ng/(mg proteína) de Ruiz y col., (2012) se normalizó para tener unidades comparables entre especies.

1.2.1. Actores del metabolismo del c-di-GMP: DGCs y PDEs.

Los análisis bioinformáticos del creciente número de genomas bacterianos disponibles han revelado que los genes codificantes para proteínas diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs) se encuentran presentes en diversos linajes de bacterias (Galperin y col., 2001; Galperin, 2004; Galperin y col., 2010) (Anexo 1, Tabla A1, página 67). Existen algunas bacterias que carecen de esta vía de señalización como *Staphylococcus aureus* (Shang y col., 2009) y *Helicobacter pylori* (Jenal y Malone, 2006). El número de genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo del c-di-GMP varía según la especie: por ejemplo, *Mycobacterium smegmatis* posee un sólo gen que codifica una proteína con actividad DGC/PDE (Kumar y Chatterji, 2008), mientras que *Vibrio vulnificus* codifica en su genoma alrededor de cien proteínas putativas involucradas con el metabolismo del c-di-GMP (Galperin y col., 2010).

1.2.1.1. Diguanilato Ciclasas.

Las DGCs sintetizan c-di-GMP a partir de dos moléculas de GTP, con liberación de 2 moléculas de pirofosfato, mediante un dominio proteico de aproximadamente 180

aminoácidos denominado GGDEF, que posee en su secuencia el motivo altamente conservado GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe), el cual es fundamental para la actividad catalítica (Ausmees y col., 2001). La estructura cristalográfica de las DGCs funcionales ha permitido la identificación de los aminoácidos claves en la unión de sustrato y catálisis (Figura 1) (Chan y col., 2004; Wassmann y col., 2007). Debido a que el dominio GGDEF sólo puede unir una molécula de GTP, coordinado con dos iones Mg^{+2} , las DGCs son funcionales como dímeros (Wassmann y col., 2007), aunque existen DGCs que funcionan como trímeros o tetrámeros (Chan y col., 2004; Ryjenkov y col., 2005).

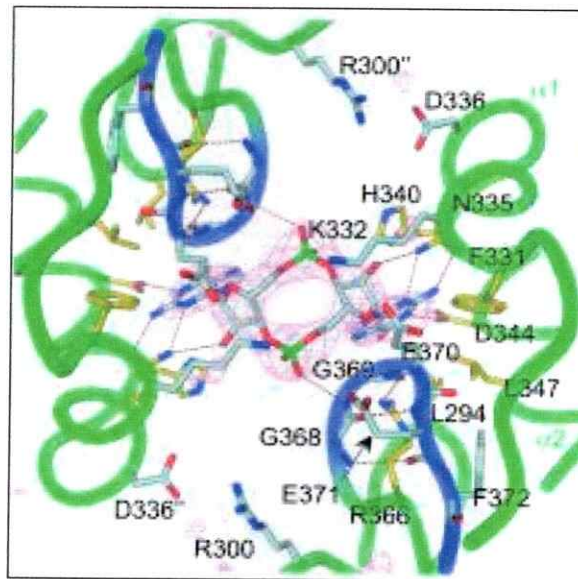


Figura 1. Aminoácidos clave involucrados en la actividad DGC del dominio GGDEF de la proteína PleD (*Caulobacter crescentus*). Se muestra el sitio activo de cada dominio en conjunto con c-di-GMP, en la misma orientación que tendrían las moléculas de GTP. La numeración de los aminoácidos corresponde a la secuencia primaria de PleD. Imagen tomada de Chan y col., 2004.

La mayoría de las DGCs funcionales presentan dos sitios de unión a c-di-GMP denominado sitios de inhibición primario (Ip) y secundario (Is). Algunas DGCs funcionales sólo poseen uno de estos sitios de regulación alostérica. El sitio regulador Ip

incluye un motivo RxxD (Arg-x-x-Glu) el cual, al unir c-di-GMP, inhibe la actividad DGC en forma no-competitiva, evitando un agotamiento de GTP (Chan y col., 2004; Christen y col., 2006).

1.2.1.2. Fosfodiesterasas.

La degradación de c-di-GMP es llevada a cabo por dos grupos de enzimas con actividad PDE cuya actividad depende de dominios que presentan en sus secuencias primarias los motivos EAL (Glu-Ala-Leu) (Römling y col., 2005) o HD-GYP [(His-Asp)-(Gly-Tyr-Pro)] (Dow y col., 2006).

Las PDEs con dominio EAL degradan el c-di-GMP a pGpG, el cual se degrada posteriormente a GMP (Schmidt y col., 2005). Al igual que en el dominio GGDEF, se ha determinado los aminoácidos clave para la unión del sustrato y la catálisis mediante cristalografía y mutagénesis sitio-dirigida (Figura 2) (Rao y col., 2008; Tchigvintsev y col., 2010). La actividad PDE del dominio EAL es dependiente de la unión de Mg^{+2} o Mn^{+2} al sitio activo y se reprime en la presencia de Ca^{+2} o Zn^{+2} (Bobrov y col., 2005; Tamayo y col., 2005; Tchigvintsev y col., 2010).

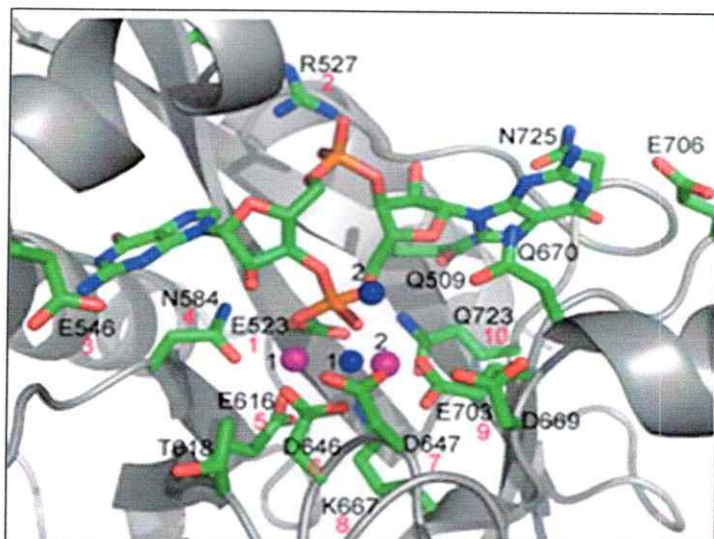


Figura 2. Aminoácidos claves involucrados en la actividad del dominio EAL de la proteína Tbd1265 (*Thiobacillus denitrificans*). Se muestra el sitio activo del dominio EAL en conjunto con el c-di-GMP. Las esferas magenta representan iones Mg^{+2} , mientras que las esferas azules son moléculas de agua. La numeración de aminoácidos corresponde a la secuencia primaria de Tbd1265. Los números magenta denotan a los aminoácidos más conservados en dominios EAL activos según Tchigvintsev y col., 2010.

El dominio HD-GYP fue predicho como posible PDE específica para c-di-GMP mediante análisis bioinformáticos (Galperin y col., 2001). La actividad PDE fue determinada en experimentos con *Xanthomonas campestris* (Ryan y col., 2006). Las PDEs con dominio HD-GYP, a diferencia de las PDEs con dominio EAL, degradan el c-di-GMP directamente hasta GMP (Dow y col., 2006; Ryan y col., 2006; Ryan y col., 2009). Aunque existen escasos datos sobre PDEs del tipo HD-GYP, recientemente se ha determinado la estructura de un dominio HD-GYP no convencional (Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100) que conserva algunos de los aminoácidos claves que se encuentran en los dominios activos (Lovering y col., 2011).

1.2.1.3. Regulación de la actividad DGC o PDE.

La regulación de la actividad de las proteínas DGC o PDE se da a nivel de i) la expresión génica, ya sea a nivel de la transcripción o la traducción (Jonas y col., 2009), ii) la compartimentalización de las proteínas (Duerig y col., 2009) o iii) la actividad catalítica por la acción de dominios sensores y reguladores (Römling y col., 2005; Römling y Amikam, 2006; Barraund y col., 2009; Hengge, 2009; Römling y Simm, 2009). Por otro lado, los análisis bioinformáticos revelan que las proteínas con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP suelen estar asociados a diversos dominios sensores y reguladores, entre los que destacan el dominio PAS, que sensa los niveles de O₂ o el potencial redox (Chang y col., 2001), el dominio GAF, que une nucleótidos monocíclicos (Hurley, 2003) y el dominio regulador REC (Aldridge y col., 2003; Hickman y col., 2005).

1.2.1.4. Transducción de señales y efectos fisiológicos.

La concentración intracelular de c-di-GMP regula diversos fenotipos en las bacterias. Entre los fenotipos que se encuentran regulados por los niveles intracelulares de este segundo mensajero se encuentran procesos como la motilidad (Ryjenkov y col., 2006; Wolfe y Visick, 2008), la adhesión a superficies (Thormann y col., 2006; Claret y col., 2007), la secreción de EPS (Ross y col., 1987; Weinhouse y col., 1997; Merighi y col., 2007), la formación de biopelículas (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004; Thormann y col., 2006; Nakhamchick y col., 2008), la agregación celular (Römling y col., 2000), la producción de factores de virulencia en patógenos de plantas o animales

(Kulasakara y col., 2006; Ryan y col., 2007; Tamayo y col., 2007; McCarthy y col., 2008; Tamayo y col., 2008; Lai y col., 2009), el desarrollo y la diferenciación celular en *Caulobacter crescentus* (Duerig y col., 2009) o *Streptomyces coelicolor* (Tran y col., 2011), la supervivencia durante el ciclo biológico en *Borrelia burgdorferi* (Kostick y col., 2011; Sultan y col., 2011), el metabolismo secundario en *Streptomyces coelicolor* (Tran y col., 2011) y la resistencia a condiciones de estrés en *Mycobacterium smegmatis* (Kumar y Chatterji, 2008) o *Pseudomonas aeruginosa* (Klebensberger y col., 2008).

La señalización mediante c-di-GMP se caracteriza por la multiplicidad de proteínas involucradas en su metabolismo (Hengge, 2009) así como la diversidad en la naturaleza, función y motivos de unión a c-di-GMP de los receptores (Ryan y col., 2012) (Figura 3). Entre los receptores de c-di-GMP identificados hasta el momento se encuentran proteínas con dominio PilZ (Amikam y Galperin, 2006; Benach y col., 2007; Pratt y col., 2007; Ramelot y col., 2007), la proteínas de membrana pelD (Friedman y Kolter, 2004) y LapD (Newell y col., 2009), los reguladores transcripcionales FleQ (Hickman y Harwood, 2008), VpsT (Krasteva y col., 2010) y Clp (Tao y col., 2010; Chin y col., 2010) y dos estructuras ribonucleicas denominadas riboswitches GEMM (Sudarsan y col., 2008; Kulshina y col., 2009; Smith y col., 2009). En la actualidad se siguen descubriendo nuevos tipos de receptores (Sondermann y col., 2012). Los receptores difieren tanto en la naturaleza como en el motivo de unión a c-di-GMP. El c-di-GMP puede ejercer su función a nivel de la transcripción (Hickman y Harwood, 2008; Chin y col., 2010; Krasteva y col., 2010), la traducción (Sudarsan y col., 2008), la actividad (Merighi y col., 2007), la secreción (Monds y col., 2007) o la estabilidad de la

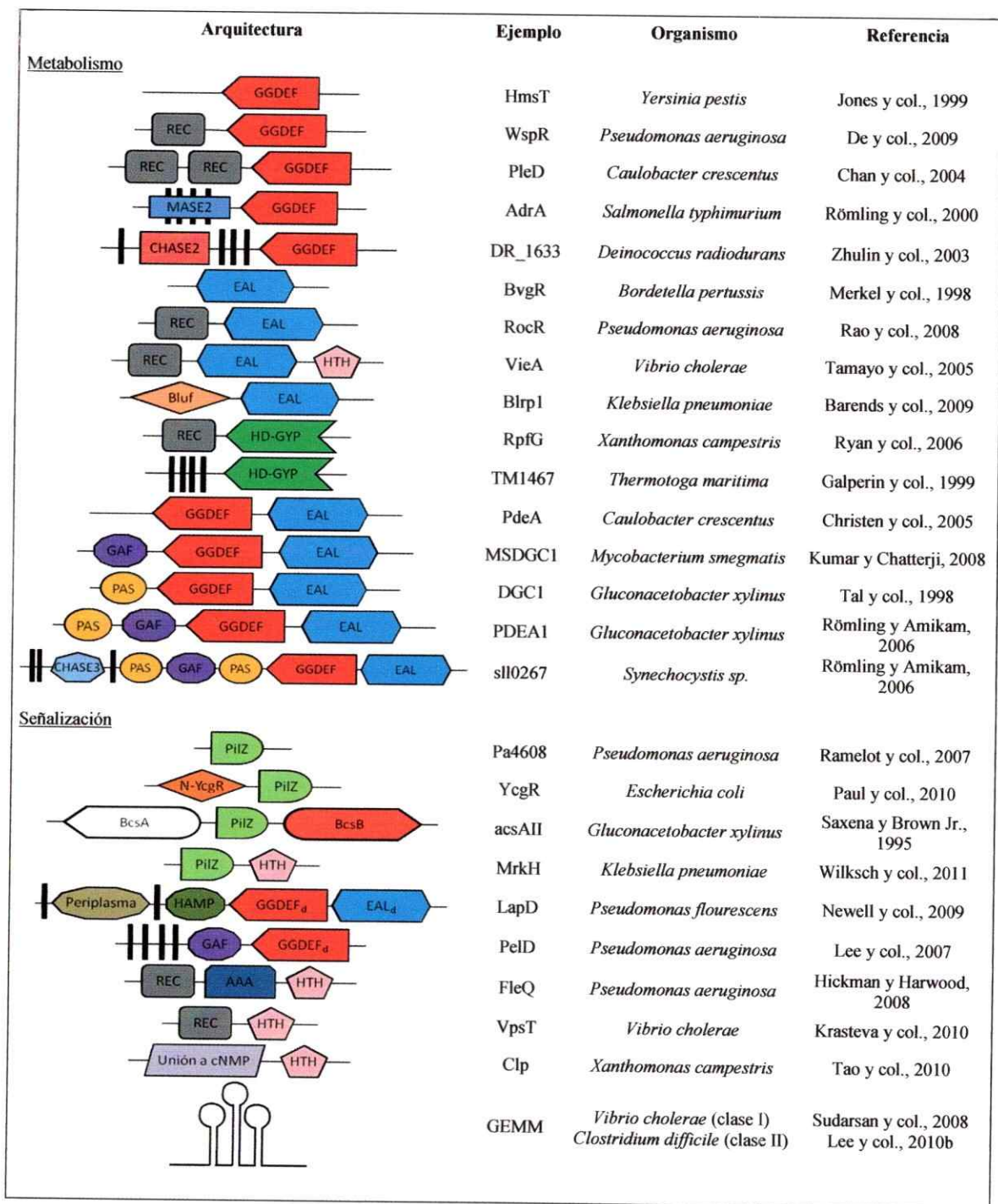


Figura 3. Diversidad estructural existente en algunos de los componentes que participan en el metabolismo y vía de señalización del c-di-GMP en diversas bacterias. Los dominios DGC y PDE pueden encontrarse acoplados a dominios íntegros de membrana, dominios sensibles a gases, potencial redox o luz, dominios aceptores de fosfato o dominios de unión a DNA. Las moléculas receptoras de c-di-GMP incluyen dominios DGC y PDE degenerados, dominios acoplados a enzimas, diferentes clases de factores de transcripción y estructuras ribonucleicas ubicadas en las regiones no traducidas de algunos RNA mensajeros. Los dominios no están dibujados a escala.

proteína (Duerig y col., 2009). A pesar de la investigación exhaustiva, muchos de los detalles de esta vía de señalización son desconocidos, principalmente a nivel de las señales que afectan la actividad DGC y PDE o como se transducen los niveles intracelulares de c-di-GMP a cambios fisiológicos, debido a que el número de receptores identificados no es suficiente para cubrir todos los fenotipos que son regulados por c-di-GMP. Los análisis bioinformáticos para identificar posibles receptores codificados en los genomas han llegado a un punto muerto, debido a que no existen motivos comunes de unión (Düvel y col., 2012). En una aproximación para identificar otras proteínas que interaccionarían con el c-di-GMP, Düvel y col. (2012) utilizaron una columna de afinidad con un análogo de c-di-GMP unido a la matriz. El análisis de extractos crudos de *Pseudomonas aeruginosa*, se identificaron proteínas con dominio PilZ, proteínas con dominios GGDEF y EAL degenerados, así como proteínas anteriormente no identificadas que participan en los procesos de metabolismo energético, biosíntesis, factores de transcripción y proteínas hipotéticas.

1.2.1.4.1. Dominio PilZ

El dominio PilZ fue identificado inicialmente en el extremo C-terminal de la celulosa sintasa de *Gluconacetobacter xylinus*, por lo que se propuso como sitio de unión a c-di-GMP, ya que se sabía que la adición de c-di-GMP favorecía la síntesis de celulosa (Ross y col., 1985). Esta hipótesis fue comprobada posteriormente mediante análisis bioinformáticos y técnicas experimentales (Amikam y Galperin, 2006; Ramelot y col., 2007). La unión a c-di-GMP es posible gracias a los motivos RxxxR y

(D/N)xSxxG presentes en el extremo N-terminal del dominio (Benach y col., 2007; Schirmer y Jenal, 2009).

Los dominios PilZ ejercen su función a nivel de la regulación de la actividad enzimática (Weinhouse y col., 1997), la interacción con complejos proteicos (Ryjenkov y col., 2006; Merighi y col., 2007; Paul y col., 2010) o alteración de la actividad transcripcional (Wilksch y col., 2011). Proteínas con dominio PilZ regulan procesos como la motilidad (Ryjenkov y col., 2006; Paul y col., 2010), la biosíntesis de alginato (Merighi y col., 2007), celulosa (Weinhouse y col., 1997) o fimbrias (Wilksch y col., 2011), la virulencia (McCarthy y col., 2008) y la formación de biopelículas (Pratt y col., 2007).

1.2.1.4.2. PelD

PelD es una proteína reguladora de membrana, perteneciente al operón *pel* presente en *P. aeruginosa*, cuya función se encuentra relacionada con la regulación positiva de la síntesis de exopolisacáridos *pel* (Friedman y Kolter, 2004). Presenta un motivo de unión RxxD, similar al sitio Ip presente en proteínas GGDEF, por lo cual se ha sugerido que el dominio de unión a c-di-GMP de PelD es un dominio GGDEF inactivo (Lee y col., 2007).

1.2.1.4.3. LapD

LapD es una proteína de membrana interna que participa en la adhesión celular y formación de biopelículas al mantener a la adhesina LapA en la superficie. Posee un dominio periplasmático, un dominio regulador negativo denominado HAMP, un dominio GGDEF y un dominio EAL (Newell y col., 2009). Los dominios GGDEF y EAL se encuentran degenerados. Al unir c-di-GMP a través del dominio EAL, el dominio HAMP cambia su conformación y permite la activación del dominio periplasmático. El dominio periplasmático activado se une e inactiva a la proteasa periplasmática LapG, evitando el clivaje de LapA y asegurando la unión a la superficie (Newell y col., 2011).

1.2.1.4.4. FleQ

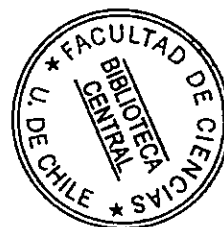
FleQ, descubierto también en *P. aeruginosa*, es el primer caso descrito de un regulador transcripcional cuya función se encontraba regulada por los niveles de c-di-GMP (Hickman y Harwood, 2008). FleQ reprime la expresión de los genes relacionados a la síntesis de exopolisacáridos e induce la expresión de los genes relacionados con motilidad. Al unir c-di-GMP, mediante el dominio AAA, FleQ pierde afinidad por las zonas promotoras, lo cual reprime la motilidad e induce la síntesis de los EPS.

1.2.1.4.5. Clp

Secuencias homólogas de Clp han sido descubiertas en los genomas de las bacterias patógenas *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xylella fastidiosa* y *Stenotrophomonas maltophilia*. Clp es un regulador transcripcional de la familia CRP/FNR que posee identidad de secuencia y similitud estructural con la proteína de unión a AMP cíclico CRP, pero posee afinidad para c-di-GMP con una K_d de 0,16 μM y 0,22 μM en *X. campestris* y *S. maltophilia*, respectivamente (Tao y col., 2010). Uno de los aminoácidos clave para la interacción de Clp con c-di-GMP es un ácido glutámico (E99 en Clp) presente en el dominio de unión a mensajeros nucleotídicos cíclicos, el cual en CRP es una serina (S83) (Tao y col., 2010). A diferencia de otros reguladores tipo-CRP, Clp se encuentra unido a secuencias promotoras cuando no une un ligando. La unión del c-di-GMP a Clp regula en forma negativa procesos relacionados a la virulencia, como síntesis de exopolisacáridos, producción de celulasas extracelulares y síntesis de la poligalacturonato liasa en el caso de *X. campestris* (Tao y col., 2010; Chin y col., 2010) y *X. axonopodis* (Leduc y Roberts, 2009).

1.2.1.4.6. VpsT

La proteína VpsT descubierta en *Vibrio cholerae*, aunque existen homólogos en otros miembros del mismo género, es un regulador transcripcional que regula en forma positiva la expresión de los genes involucrados con la síntesis de los exopolisacáridos *vps* y reprime la motilidad. Pertenece a la misma clase de reguladores maestros a la que



pertenece el regulador de formación de biopelículas CsgD de *E. coli* y *Salmonella*. A diferencia de CsgD, VpsT es capaz de unir c-di-GMP (K_d de 3,2 μM) mediante el motivo W[F/L/M][T/S]R. Al unir c-di-GMP, VpsT dimeriza por acción de un dominio REC degenerado y permite la interacción con las secuencias blanco en el DNA mediante un dominio HTH (Krasteva y col., 2010). La expresión de VpsT es reprimida a altos niveles celulares por acción del regulador de Quorum Sensing HapR, que regula en forma negativa los procesos de virulencia y formación de biopelículas (Waters y col., 2008; Srivastava y col., 2011).

1.2.1.4.7. Receptores del tipo estructura nucleotídica

El riboswitch GEMM es un dominio estructural ribonucleico, el cual se encuentra en la región 5' no codificante de ciertos RNAs mensajeros, que regula en forma positiva o negativa la expresión post-transcripcional en respuesta a los niveles intracelulares de c-di-GMP, ya sea por cambios en su estructura tridimensional, estabilidad o procesamiento (Sudarsan y col., 2008; Kulshina y col., 2009; Lee y col., 2010b). Se compone de dos estructuras: una región de unión a ligando o aptámero y una región efectora o plataforma de expresión (Roth y Breaker, 2009). En la actualidad se han descubierto dos clases de riboswitches, denominados riboswitches de clase I y clase II, los cuales poseen diferencias estructurales y distintas afinidades por c-di-GMP. Los riboswitches clase I poseen una K_d de 10 pM (Smith y col., 2009), mientras que los riboswitches de clase II poseen una K_d cuyo valor varía entre 200 pM y 2 nM (Smith y col., 2011).

1.3. Biolixiviación y Biopelículas.

La biolixiviación se define como el proceso natural de lixiviación o solubilización de minerales insolubles basado en el metabolismo energético de algunos microorganismos que obtienen la energía necesaria para realizar sus funciones vitales a partir de la oxidación de compuestos azufrados y/o ferrosos presentes en los concentrados mineros. Este proceso es aplicado en la minería para la obtención de minerales valiosos como cobre u oro en depósitos de baja ley (Rawlings y col., 2003; Rawlings, 2005). Está descrito que los procesos de adhesión al sustrato mineral oxidable y la formación de biopelículas son procesos claves para la proliferación microbiana y la disolución del mineral (Gehrke y col., 1998). La razón de la importancia de la formación de biopelículas en biolixiviación se debe a que el mecanismo de interacción entre sustrato oxidable y microorganismo es principalmente indirecto (Schippers y Sand, 1999; Sand y col., 2001): la interfase entre EPS y mineral es el sitio principal donde ocurre la disolución de los sulfuros insolubles a compuestos reducidos de azufre e ión ferroso (Rawlings, 2004; Africa y col., 2012), con la subsecuente liberación de metales. Esto se debe a que la matriz de EPS secuestra el ión férrico producido por microorganismos hierro-oxidantes, aumentando su concentración local y favoreciendo el ataque químico de este ión sobre el mineral (Sand y Gehrke, 2006).

A pesar de la gran diversidad de bacterias y arqueas que participan en el proceso (Goebel y Stackebrandt, 1994), los estudios de formación de biopelículas en microorganismos biomineros se han centrado en la bacteria oxidante de hierro y azufre

Acidithiobacillus ferrooxidans (Gehrke y col., 1998; Gehrke y col., 2001; Sand y Gehrke, 2006; Africa y col., 2012), y en menor grado en bacterias hierro-oxidantes del género *Leptospirillum* (Moreno-Paz y col., 2010; Africa y col., 2012).

Dado que se conoce más sobre el genoma y fisiología de *At. ferrooxidans* que de cualquier otra bacteria biominera, se pudieron describir algunos de los mecanismos moleculares que regulan la formación de biopelículas en esta bacteria (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2007; Ruiz y col., 2007; Ruiz y col., 2012). Posteriormente, se describió la existencia de una vía del c-di-GMP funcional en *At. ferrooxidans* y en la bacteria oxidante de azufre relacionada *Acidithiobacillus caldus* (Ruiz y col., 2007; Castro y col., 2009; Ruiz y col., 2012). A pesar de pertenecer al mismo género, poseen grandes diferencias entre sí respecto al número de genes que codifican proteínas relacionadas al metabolismo y señalización del c-di-GMP. El genoma de *At. ferrooxidans* ATCC 23270 codifica 5 proteínas con posible actividad DGC y/o PDE y 2 proteínas con dominio de unión a c-di-GMP PilZ (Ruiz y col., 2007; Ruiz y col., 2012), mientras que el genoma de *At. caldus* ATCC 51756 codifica 18 proteínas con probable actividad DGC y/o PDE y 8 proteínas con dominio PilZ (Castro y col., 2009).

Dado a la existencia de una vía QS funcional en *At. ferrooxidans* (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2007) y de una vía del c-di-GMP funcional en *At. ferrooxidans* y *At. caldus*, nuestro laboratorio decidió expandir la búsqueda de mecanismos moleculares que controlan la formación de biopelículas en otra bacteria relacionada y miembro del consorcio de biolixiviación: *Acidithiobacillus thiooxidans*. *At. thiooxidans* es una γ -

proteobacteria Gram-negativa, acidófila (pH 0,5-5,5) y quimiolitotrófica que obtiene su energía metabólica a través de la oxidación de azufre elemental, compuestos reducidos de azufre, como tiosulfato o tetratiolato (Kelly y Wood, 2000) y algunos sulfuros metálicos como covelita (CuS), galena (PbS) y esfalerita (ZnS) (Pistorio y col., 1994; Schippers y Sand, 1999). A diferencia de otros miembros del género *Acidithiobacillus*, existe un número mucho más limitado de trabajos disponibles con respecto a *At. thiooxidans*. Los trabajos se encuentran enfocados en el metabolismo (Ramírez y col., 2009), la lixiviación de minerales (Xia y col., 2010), la capacidad de disolución de cationes metálicos en suelos contaminados (Wang y col., 2007), estudios en biocomunidades (Urbietta y col., 2012) y finalmente análisis bioquímicos de enzimas relacionadas al metabolismo de compuestos reducidos de azufre (Nakamura y col., 2001).

Con respecto a la formación de biopelículas, los estudios indican que esta bacteria, al igual que otros miembros del género *Acidithiobacillus*, es capaz de formar biopelículas sobre la superficie del mineral (Gehrke y col., 1998; Barreto y col., 2005; Harneit y col., 2006; Valdes y col., 2011). A pesar de la capacidad de formar estas biopelículas, los mecanismos moleculares que regulan este proceso siguen siendo desconocidos en esta bacteria.

A diferencia de *At. ferrooxidans* y *At. caldus*, no existen estudios sobre la vía del c-di-GMP en *At. thiooxidans*, por lo que en este trabajo se propone determinar la existencia de una vía del c-di-GMP funcional en esta bacteria biominera. Durante el

desarrollo de esta tesis, basado en la secuenciación de 164 contigs, se determinó la secuencia total del genoma de *At. thiooxidans* ATCC 19377 (Valdes y col., 2011). El análisis genómico indicó la presencia de genes que codificarían proteínas relacionadas a la síntesis de exopolisacáridos y la formación de biopelículas, así como la existencia de genes que codifican proteínas relacionadas al metabolismo del c-di-GMP. Previo al desarrollo de esta tesis, los análisis bioinformáticos preliminares a secuencias genómicas parciales de *At. thiooxidans* ATCC 19377 encontraron los primeros genes que codificarían proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP y la transducción de señales de este mensajero (Castro y col., 2009; Díaz, 2010). Estos putativos genes codificarían para 4 proteínas con dominio GGDEF, una proteína con dominio EAL, 7 proteínas con dominios GGDEF/EAL y 7 proteínas con dominio PilZ de unión a c-di-GMP.

Los análisis iniciales de la expresión transcripcional mediante RT-PCR y PCR en tiempo real mostraron que algunos de los genes presentaron diferencias en la transcripción que eran dependientes del sustrato energético y del período de incubación. El nivel de transcrito del gen *AthiA1_08179* (denominado como 83-31 en Díaz, 2010), que codifica una putativa proteína con actividad PDE, resultó ser aproximadamente 2 veces mayor en células crecidas en tiosulfato que en azufre elemental. A medida que las células pasaban de fase exponencial a fase estacionaria, se observó una disminución del número de transcrito de los transcritos codificantes por un valor de aproximadamente 10 veces.

La metodología de trabajo incluyó un análisis bioinformático más completo para encontrar y analizar todos los posibles genes que codificarían componentes de la vía metabólica y de señalización de este segundo mensajero, experimentos de RT-PCR para comprobar que existe expresión transcripcional de los putativos ORFs, extracción de fracciones enriquecidas en nucleótidos a partir de células de *At. thiooxidans* para identificar c-di-GMP y ensayos de complementación heteróloga en cepas mutantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium con genes clonados a partir del genoma de *At. thiooxidans* mediante un análisis fenotípico de morfología de colonia y cambios en la secreción del EPS.

1.4. Hipótesis General

Los previos antecedentes en base a los análisis bioinformáticos y de expresión transcripcional indicarían que *Acidithiobacillus thiooxidans* posee una vía del c-di-GMP funcional. Las diguanilato ciclasas identificadas en el genoma de esta bacteria deberían producir c-di-GMP, el cual regularía el proceso de formación de biopelículas.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Estudiar la funcionalidad de los componentes moleculares que participan en la síntesis y degradación del segundo mensajero c-di-GMP en *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463.

1.5.2. Objetivos específicos

1.5.2.1. Predecir la funcionalidad mediante análisis bioinformáticos de los putativos dominios involucrados en el metabolismo y señalización del c-di-GMP.

1.5.2.2. Determinar la expresión transcripcional de los putativos genes en células de *At. thiooxidans* mediante experimentos de RT-PCR.

1.5.2.3. Medir los niveles de c-di-GMP a partir de extractos nucleotídicos en células de *At. thiooxidans* crecidos en azufre elemental, tiosulfato o tetrionato.

1.5.2.4. Determinar la funcionalidad de los putativos genes mediante ensayos de complementación heteróloga en cepas mutantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas y condiciones de cultivo

La descripción de las cepas se observa con más detalle en la tabla A1 (Anexo 1, página 67). La cepa DSM 9463 de *Acidithiobacillus thiooxidans* fue crecido en medio DSMZ-71 con tiosulfato o tetrionato como fuente energética (KH_2PO_4 3 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g/l, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l o $\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 5 g/l, pH 4,4-4,7) (Ramírez y col., 2004) o en medio 9K modificado con azufre elemental como fuente energética ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g/l, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,04 g/l, S^0 en perlas 50 g/l, pH 2,5 ajustado con H_2SO_4 concentrado) (Amaro y col., 1991) a una temperatura de 30°C con agitación lateral. La concentración inicial de células utilizada para todos los cultivos fue de aproximadamente 10^7 células/ml. El crecimiento se monitoreó mediante el uso de una cámara de conteo Petroff-Hausser.

Las cepas de *Escherichia coli* JM109 y LMG194 y *Salmonella Typhimurium* UMR1 (Römling y col., 1998), AdrA1f (Römling y col., 2000) y MAE282 (Kader y col., 2006) fueron crecidas rutinariamente a 37°C en medio LB (Tryptona 10 g/l, Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, pH 7,0). Para medio sólido, se añadió 1,5% de agar. La concentración de los antibióticos utilizados fue: Ampicilina (100 µg/ml), Kanamicina (30 µg/ml) y Cloranfenicol (20 µg/ml).

2.2. Análisis Bioinformático

Las secuencias de los fragmentos de genoma de la cepa tipo ATCC 19377 fueron proveídas por el Centro de Bioinformática y Biología del Genoma, Universidad Andrés Bello. Los genes candidatos fueron predichos utilizando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los resultados positivos obtenidos fueron visualizados mediante el programa de anotación Artemis (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>). Los dominios presentes en las secuencias de las proteínas candidatas fueron identificados mediante NCBI Conserved Domain Search, Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) y Prosite (<http://prosite.expasy.org/>). La identificación de dominios transmembrana fue realizada con TMHMM Server v. 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/). Los alineamientos entre los dominios identificados fueron realizados mediante el programa de alineamiento ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Las figuras de los alineamientos fueron realizadas mediante Esript 2.2 (<http://esript.ibcp.fr/ESPrpt/ESPrpt/>). Las estructuras secundarias de pleD, Bd1817, Tbd-1265 y Pa4068 fueron obtenidos del Protein Data Bank (PDB).

2.3. RT-PCR

Para determinar si los putativos genes se expresaban se procedió a un experimento de RT-PCR. Para la extracción del RNA total se cosecharon células en fase exponencial media. La extracción de RNA se realizó mediante un protocolo modificado de extracción con Trizol® (Invitrogen), en base al protocolo de extracción con fenol

caliente (Ruiz y col., 2007; Castro y col., 2009; Ruiz, 2010). El RNA obtenido se trató mediante digestión con DNasa I (Roche®) previo a la síntesis de cDNA. El cDNA se sintetizó con 800 ng de RNA purificado y 200 ng de hexámeros aleatorios como partidores en agua libre de nucleasas. Para la reacción de RT-PCR se utilizó como templado 100 ng de DNA genómico de *At. thiooxidans* o 1 µl de cada solución 1/20 de cDNA sintetizado a partir de RNA purificado en un volumen final de reacción de 25 µl al cual se le añadió dNTPs 80 µM cada uno, DMSO 5% v/v, partidores 0,5 µM de cada uno (Tabla A2; Anexo 2, página 68), solución amortiguadora de reacción con (NH₄)₂SO₄ Fermentas®, MgCl₂ 2,5 mM y 0,5 U de Taq DNA polimerasa recombinante Fermentas®. El programa de la reacción fue el siguiente: 3 min a 95 °C, seguido por 38 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C y una extensión final de 3 min a 72 °C. Los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa al 1,5% p/v.

2.4. Construcción de plamidios

Previo al diseño de los partidores, todos los genes candidatos fueron analizados para determinar los sitios de restricción presentes en sus secuencias mediante el programa NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Los diferentes genes codificantes para DGCs o PDEs fueron clonados a partir de DNA genómico mediante PCR usando el sistema High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas®). La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl al cual se le añadió DMSO 5% v/v, dNTPs 0,2 mM c/u, solución amortiguadora de reacción, MgCl₂ 1,5 mM, partidores 0,6 µM c/u (Tabla A2; Anexo 2, página 68), DNA genómico 100 ng. El programa de reacción utilizado fue de 3 min a 94 °C seguido de 25-35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60-65°C, 1 min/kb a

72°C, seguido por una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa 0,5-1% p/v, según el tamaño del fragmento a amplificar y posteriormente purificados a partir del gel mediante el kit Wizard (Promega®). Las purificaciones fueron cuantificadas y ligadas en el vector de amplificación pGEM-T Easy (Promega®). La amplificación se realizó en *E. coli* JM109. A los clones seleccionados se les realizó una extracción de DNA plasmidial mediante una miniprep con el kit de extracción Wizard® Plus SV (Promega®). Los plasmidios extraídos fueron cuantificados, dializados en una membrana de nitrocelulosa en contra de agua nanopura y sometidos a una doble digestión para liberar el fragmento. Los fragmentos digeridos fueron purificados a partir de geles de agarosa 0,5% p/v y ligados mediante T4 DNA ligasa al vector de expresión pBAD24 digerido con la misma combinación de enzimas. La amplificación de las construcciones pBAD24 se realizó en *E. coli* JM109. La identidad de las distintas construcciones fue verificada mediante secuenciación (MACROGEN®).

2.5. PCR de colonia

Para determinar en primera instancia la presencia de los fragmentos insertos, se procedió a realizar PCR de colonia. Como fuente de DNA blanco, un fragmento de colonia de *E. coli* JM109 transformada con pGEM-T Easy o pBAD24 fue resuspendido en un volumen de 100 µl de agua nanopura estéril. En un volumen de reacción de 25 µl se añadió DMSO 5%, amortiguador de reacción 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 80 µM c/u, 0,6 µM de cada partidor (secuencias en Tabla A2), 2 µl de suspensión bacteriana y 0,5 U de Taq DNA polimerasa. El programa de reacción fue de 5 min a 95°C, seguido de 35

ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55°C, 1 min/kb a 72°C, seguido por una extensión final de 15 min a 72 °C.

2.6. Análisis funcional de DGCs y PDEs

Para determinar la funcionalidad de los genes codificantes para DGCs o PDEs se procedió a realizar un análisis fenotípico en *S. Typhimurium* (García y col., 2004). Este ensayo está basado en un cambio en la producción de EPS, los que en *Salmonella* corresponden principalmente a celulosa y fimbrias. Una producción alta de estos EPS genera un fenotipo de colonia denominado rdar (rough, dry and red) que puede visualizarse con la adición de Rojo Congo o Calcofluor al medio (García y col., 2004). Las construcciones pBAD24 seleccionadas mediante PCR de colonia y secuenciación fueron introducidas mediante electroporación en las cepas mutantes AdrA1f (AdrA⁻) y MAE282 (YciR⁻) de *S. Typhimurium* y posteriormente seleccionadas mediante resistencia a antibióticos. El ensayo fenotípico realizado consistió de 3 µl de cultivo de noche diluido a una misma densidad óptica para todas las muestras depositados en el centro de una placa de medio LB sin NaCl con Rojo Congo (40 µg/ml) y Azul de Coomassie (10 µg/ml) (Kader y col., 2006) o con Calcofluor (25 µg/ml) (García y col., 2004) suplementada con Arabinosa (0,2% p/V) y Ampicilina (100 µg/ml). La ampicilina se omitió en el caso de las cepas sin transformar. Para las cepas derivadas de AdrA1f, el medio se suplementó adicionalmente con Kanamicina (30 µg/ml), mientras que para el caso de las cepas MAE282, el medio fue suplementado con Cloranfenicol (20 µg/ml). Las placas fueron incubadas a 30°C en la oscuridad.

2.7. Detección y cuantificación de c-di-GMP

La detección de c-di-GMP en *At. thiooxidans* se realizó a partir de células crecidas en azufre elemental, tiosulfato o tetratiónato como fuente energética. En el caso del azufre elemental, se utilizaron células planctónicas y adheridas. Las células fueron recolectadas en fase exponencial tardía por centrifugación a partir de un litro de cultivo. Las células recolectadas se lavaron dos veces con una solución diluida de H₂SO₄ (pH 1,5), seguido por dos lavados con agua nanopura, centrifugando a 7500 g por tres minutos cada vez. Luego se determinó la masa húmeda del sedimento celular. Las células fueron resuspendidas en 700 µl de agua nanopura con 1mg/ml de lisozima y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Las células se centrifugaron a 4°C y finalmente se resuspendieron en 700 µl de tampón de sonicación Tris 30 mM pH 8,5 (HCl) (Ruiz, 2010; Ruiz y col., 2012). La ruptura celular se realizó mediante diez ciclos de sonicación en hielo durante 40 segundos. Los extractos fueron centrifugados durante 30 minutos a 16000 g a 4°C para eliminar los restos celulares. Una muestra del lisado se apartó para determinar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Al lisado celular se añadió 350 µl de HClO₄ 1,2 M (0,4 M concentración final) y posteriormente se neutralizó a pH 6,0 con K₂CO₃ 1,6 M (Antoniani y col., 2010). Los sobrenadantes fueron centrifugados a 16000 g a 4°C durante 10 minutos y posteriormente filtrados. Los extractos fueron congelados en nitrógeno líquido y secados mediante liofilización. El liofilizado fue mezclado con solución amortiguadora de KH₂PO₄ (pH 6,0) e inyectado a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a espectrometría de masas (MS) con polaridad positiva (Scripps Center for Metabolomics

and Mass Spectrometry, La Jolla, San Diego, California, E.E.U.U.). La especie molecular m/z 691 equivalente a ion molecular del c-di-GMP fue sometida a un análisis MS/MS para detectar las especies m/z 135 y m/z 152 (Spangler y col., 2010).

La extracción de c-di-GMP desde células adheridas en perlas de azufre se realizó en base a como está descrito en Ruiz y col., 2012. Brevemente, las perlas de azufre fueron lavadas tres veces con medio de cultivo 9K para eliminar las células planctónicas. Las perlas se incubaron en medio 9K con Triton X-100 0,05% a temperatura ambiente y se agitó mediante vortex para liberar las células adheridas. Las células se recuperaron por centrifugación y se sometieron al tratamiento descrito anteriormente.

RESULTADOS

3.1. Identificación de putativos genes involucradas en la vía del c-di-GMP en *At. thiooxidans*.

Una búsqueda de genes que codificaran putativas proteínas DGC o PDE realizada mediante análisis bioinformáticos de las secuencias genómicas parciales de *At. thiooxidans* ATCC 19377 permitió identificar 25 genes candidatos (Tabla 2), los cuales codificarían nueve proteínas con dominio GGDEF solo, tres proteínas con dominio EAL solo, doce proteínas con ambos dominios GGDEF y EAL, y una proteína con dominio HD-GYP. Una búsqueda de dominios proteicos involucrados a la transducción de señales identificó dominios sensores PAS y GAF, dominios reguladores de tipo REC, dominios de tipo globina que unirían grupos hemo, dominios íntegros de membrana del tipo MASE1 (Nikolskaya y col., 2003), así como segmentos transmembrana (TM) (Tabla 2). En algunos genes no fue posible encontrar dominios sensores, lo cual no significa que no tengan actividad regulada. Además de los genes involucrados en el metabolismo del c-di-GMP, también fueron identificados nueve genes que codificarían proteínas transductoras con el dominio PilZ de unión a c-di-GMP (Tabla 3). De los nueve genes, cinco codificarían proteínas que participan en el ensamble del pili, dos genes codificarían proteínas hipotéticas, un gen codificaría un putativo YcgR, que regularía la motilidad y un gen codificaría para una proteína que sería la subunidad catalítica del complejo celulosa sintasa. También se identificó un gen que codificaría una proteína homóloga a PelD.



Tabla 2. Identificación de genes que codifican putativas DGCs y PDEs en el genoma de *At. thiooxidans* ATCC 19377. Se destacan en **negrita** los nuevos ORFs putativos identificados durante el desarrollo de esta tesis.

Dominio	Gen	Arquitectura
GGDEF	<i>AthiA1_03313</i>	PAS-GGDEF
	<i>AthiA1_05539</i>	PAS-PAS-GGDEF
	<i>AthiA1_07707</i>	GGDEF
	<i>AthiA1_08189</i>	HDOD-REC-GGDEF
	<i>AthiA1_08219</i>	GGDEF
	<i>AthiA1_08224</i>	GGDEF
	<i>AthiA1_09870</i>	TM-GGDEF
	<i>AthiA1_13201</i>	GAF-PAS-GGDEF
	<i>AthiA1_15675</i>	TM-GAF-GGDEF
EAL	<i>AthiA1_08184</i>	EAL-HDOD
	<i>AthiA1_09875</i>	EAL
	<i>AthiA1_12974</i>	EAL
GGDEF/EAL	<i>AthiA1_00152</i>	GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_00157</i>	MASE1-GAF-GAF-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_01972</i>	TM-Per-TM-GAF-PAS-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_01982</i>	GAF-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_04113</i>	GAF-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_06856</i>	GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_07018</i>	GLOBINA-GAF-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_08179</i>	TM-TM-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_10484</i>	GLOBINA-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_12969</i>	GAF-GGDEF-EAL
	<i>AthiA1_14219</i>	GAF-GGDEF-EAL
<i>AthiA1_14626</i>	GGDEF-EAL	
HD-GYP	<i>AthiA1_13196</i>	REC-(HD-GYP)

* DGC: diguanilato ciclasa; PDE: fosfodiesterasa; TM: segmento transmembrana; Per: dominio periplasmático.

Tabla 3. Genes codificantes para putativas proteínas con el dominio de unión a c-di-GMP PilZ identificados en *At. thiooxidans* ATCC 19377. Se destacan en negrita los nuevos ORFs putativos identificados durante el desarrollo de esta tesis.

Gen	BLAST hit
<i>AthiA1_01442</i>	hypothetical protein ACA_2353 [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
<i>AthiA1_01992</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. ferrooxidans</i> ATCC 53993]
<i>AthiA1_05499</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
<i>AthiA1_06526</i>	Cellulose synthase [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
<i>AthiA1_08174</i>	hypothetical protein ACA_0268 [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
<i>AthiA1_08474</i>	YcgR protein [<i>Stenotrophomonas</i> sp. SKA14]
<i>AthiA1_08821</i>	type IV pilus assembly PilZ [<i>At. ferrivorans</i> SS3]
<i>AthiA1_10469</i>	type IV pilus assembly PilZ [<i>At. caldus</i> ATCC 51756]
<i>AthiA1_14214</i>	type IV pilus assembly PilZ protein [<i>At. ferrooxidans</i> ATCC 53993]

Una vez identificados los genes, se procedió a realizar un análisis del contexto genómico. Entre los genes que se encuentran en la vecindad, se encontraron genes que codifican proteínas relacionadas al metabolismo central, metabolismo de azúcares, en particular de exopolisacáridos, proteínas que interaccionan con ácidos nucleicos y proteínas relacionadas a la síntesis y regulación del aparato flagelar (Figura 4).

3.2. Predicción de la funcionalidad de las putativas proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP y su transducción de señal en *At. thiooxidans*.

En los últimos años se han identificado los aminoácidos claves para la función catalítica tanto para proteínas DGC (Chan y col., 2004; Wassmann y col., 2007) como para proteínas PDE (Rao y col., 2008). Por lo tanto, las secuencias primarias de los putativos dominios GGDEF y EAL identificados en *At. thiooxidans* fueron analizadas y alineadas con las secuencias de dominios equivalentes de proteínas caracterizadas bioquímicamente.

Los putativos dominios GGDEF fueron alineados con la secuencia de los dominios GGDEF de las proteínas DGC funcionales pleD (*Caulobacter crescentus* CB15), AdrA (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2) y WspR (*Pseudomonas fluorescens*). El análisis de las secuencias muestra que 15 de los 21 putativos dominios GGDEF identificados poseen la totalidad de los aminoácidos claves para la unión del sustrato y la catálisis (Figura 5). La mayoría de los dominios poseen los sitios de inhibición alostérica primario (Ip) y secundario (Is). Esta evidencia indica que la mayoría de los dominios GGDEF deberían ser funcionales, por lo tanto estas proteínas tendrían actividad DGC. El dominio GGDEF identificado en el gen *AthiA1_08179* carece de los aminoácidos presentes en los sitios reguladores primario y secundario. Además, carece de dos aminoácidos ionizables que son clave para la actividad catalítica: el equivalente al residuo K332 de PleD (para todos los residuos equivalentes en DGCs), el cual estabiliza la carga del grupo fosfato saliente, y el residuo equivalente a H340, que interacciona con el sustrato GTP (Wassmann y col., 2007). Esta evidencia sugiere que el gen *AthiA1_08179* codifica una proteína con dominio GGDEF inactivo. El producto del gen *AthiA1_01982* tiene un motivo GGDEF modificado, en el cual la primera Glicina es reemplazada por una Alanina (AGDEF), aunque este cambio no afectaría de manera significativa el acomodamiento de los fosfatos β y γ del GTP en el sitio activo. Aun así, se ha predicho experimentalmente que este dominio no sería activo (Ausmees y col., 2001). Los dominios GGDEF que se encuentran codificados en los ORFs *AthiA1_00152*, *AthiA1_06856*, *AthiA1_07707* y *AthiA1_14626* se encuentran incompletos en mayor o menor grado hacia el extremo N-terminal o el extremo C-terminal. Esta evidencia indicaría que estos dominios GGDEF son inactivos.

La comparación de los putativos dominios GGDEF en base a la longitud del dominio identificado, la presencia del motivo GGDEF, la presencia de los aminoácidos clave en la función catalítica y la existencia del sitio de inhibición primario predice que 15 de los 21 putativos dominios GGDEF de *At. thiooxidans* son catalíticamente activos y pueden ser modificados alostéricamente por los niveles intracelulares de c-di-GMP (Tabla 4).

Tabla 4. Predicción bioinformática de la funcionalidad de los putativos dominios GGDEF identificados en *At. thiooxidans* ATCC 19377.

Gen	Arquitectura	Extensión	GGDEF	Aa claves	Ip	Función DGC
<i>AthiA1_03313</i>	GGDEF	+	+	+	+	+
<i>AthiA1_05539</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_07707</i>		-	-	-	-	-
<i>AthiA1_08189</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_08219</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_08224</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_09870</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_13201</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_15675</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_00152</i>	GGDEF/ EAL	-	+	-	+	-
<i>AthiA1_00157</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_01972</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_01982</i>		+	-	+	+	-
<i>AthiA1_04113</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_06856</i>		-	+	+	-	-
<i>AthiA1_07018</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_08179</i>		+	+	-	-	-
<i>AthiA1_10484</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_12969</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_14219</i>		+	+	+	+	+
<i>AthiA1_14626</i>	-	+	-	+	-	

*Extensión: longitud del dominio identificado (± 180 aminoácidos); GGDEF: presencia del motivo; Aa claves: presencia de los aminoácidos clave para la actividad catalítica descritos en la literatura; Ip: presencia del dominio de inhibición primario; DGC: diguanilato ciclasa.

Para determinar la existencia de los aminoácidos clave en la actividad PDE, los dominios EAL identificados fueron alineados con las secuencias de los dominios EAL funcionales de las proteínas Tbd-1265 (*Thiobacillus denitrificans* ATCC 25259), YciR (*S. enterica* serovar Typhimurium LT2) y RocR (*P. aeruginosa* PAO1) (García y col., 2004; Rao y col., 2010; Tchigvintsev y col., 2010) y con los dominios EAL inactivos de las proteínas YkuI (*Bacillus subtilis*) y FimX (*P. aeruginosa* PAO1) (Tchigvintsev y col., 2010). De los 15 dominios EAL identificados, 14 conservan todos los aminoácidos clave para la unión del sustrato y catálisis. El dominio EAL restante codificado por el gen *AthiA1_08184* sería inactivo, ya que carece del motivo EAL y varios aminoácidos cargados (Figura 6).

La identificación de los aminoácidos clave para la actividad catalítica de los dominios HD-GYP se encuentra en pleno desarrollo. Se realizó la comparación entre el putativo HD-GYP identificados con la secuencia de RpfG (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004), una proteína HD-GYP funcional (Ryan y col., 2006) y Bd1817 (*Bdellovibrio bacteriovorus* HD100), la única proteína HD-GYP con estructura tridimensional determinada (Lovering y col., 2011), así como otros dominios HD-GYP presentes en diferentes grupos de bacterias. La comparación de secuencias mostró la presencia de varios motivos y aminoácidos cargados conservados que participarían en la unión del sustrato e hidrólisis del c-di-GMP (Figura 7). Esto indicaría que el gen *AthiA1_13196* codificaría una PDE funcional.

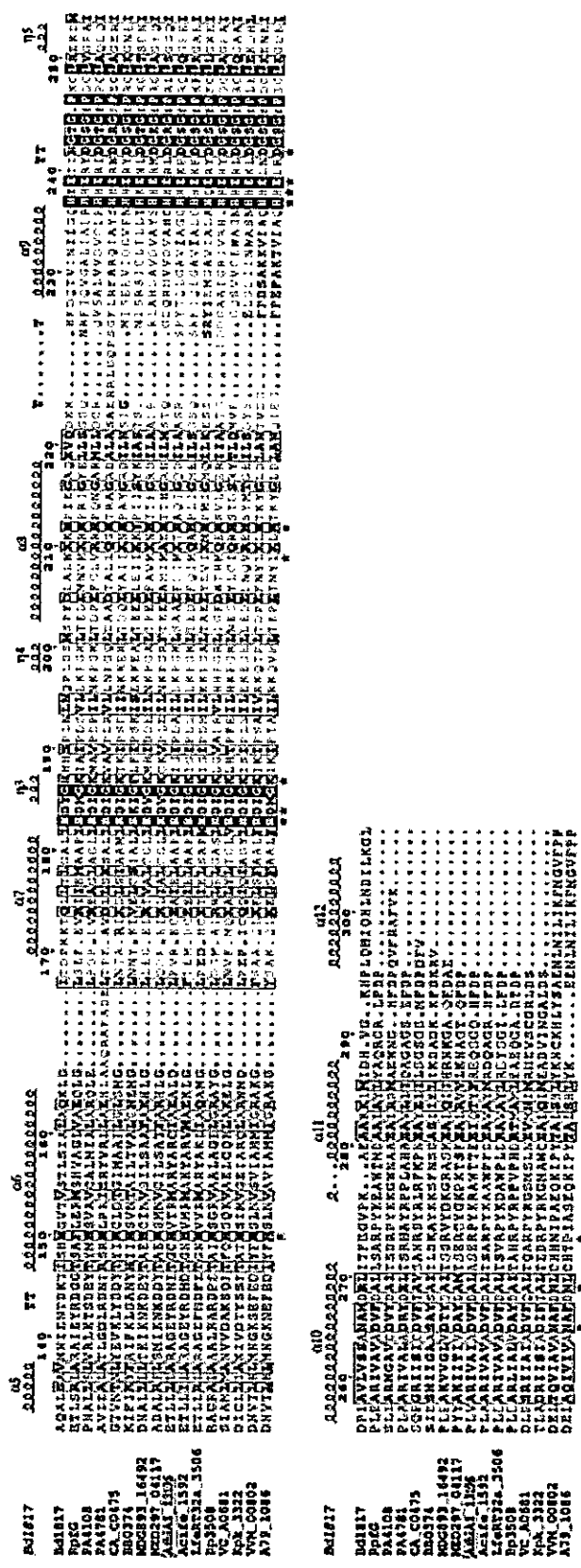


Figura 7. Alineamiento del putativo dominio HD-GYP identificado en *At. thiooxidans* ATCC 19377. El dominio correspondiente a *At. thiooxidans* se encuentra marcado. Los residuos idénticos se muestran en negro, mientras que los residuos similares se observan en negrita. Los aminoácidos marcados con una estrella participarían en la unión de sustrato y/o catálisis. Sobre los alineamientos se observa la estructura del dominio. Bdl1817 (*Bdellovibrio bacteriovorus* HD100), RpfG (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004), PA4108 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1), PA4781 (*P. aeruginosa* PAO1), Acife_1592 (*Acidithiobacillus ferrooxidans*), MDG893_16492 (*Marinobacter algicola* DG893), MED297_04117 (*Reinekea blandensis* MED297), CA_C0475 (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824), BB0374 (*Borrelia burgdorferi* B31), Bp3508 (*Bordetella pertussis* Tohama D), Kpk_3322 (*Klebsiella pneumoniae* 342), VVM_00802 (*Vibrio vulnificus* MO6-24/O), A79_1086 (*Vibrio parahaemolyticus* AQ3810), VC_0681 (*Vibrio cholerae* O1 biovar el Tor N16961).

La predicción de la actividad PDE de los dominios EAL identificados se basó en la presencia de los aminoácidos clave para la unión del sustrato y catálisis (Tabla 5). En base a esta categoría de clasificación, se predice que 14 de los 15 dominios EAL identificados en *At. thiooxidans* son catalíticamente activos. Por otro lado, la predicción de funcionalidad del dominio HD-GYP no es posible de realizar mediante un análisis bioinformático, ya que la determinación de los aminoácidos clave es un tema que se encuentra en investigación.

Tabla 5. Predicción bioinformática de la funcionalidad de los putativos dominios EAL identificados en *At. thiooxidans* ATCC 19377.

Gen	Arquitectura	EAL	Aa claves	Función PDE
<i>AthiA1_08184</i>	EAL	-	-	-
<i>AthiA1_09875</i>		+	+	+
<i>AthiA1_12974</i>		+	+	+
<i>AthiA1_00152</i>	GGDEF/ EAL	+	+	+
<i>AthiA1_00157</i>		+	+	+
<i>AthiA1_01972</i>		+	+	+
<i>AthiA1_01982</i>		+	+	+
<i>AthiA1_04113</i>		+	+	+
<i>AthiA1_06856</i>		+	+	+
<i>AthiA1_07018</i>		+	+	+
<i>AthiA1_08179</i>		+	+	+
<i>AthiA1_10484</i>		+	+	+
<i>AthiA1_12969</i>		+	+	+
<i>AthiA1_14219</i>		+	+	+
<i>AthiA1_14626</i>		+	+	+

*EAL: presencia del motivo en el dominio identificado; Aa claves: presencia de los aminoácidos clave para la actividad catalítica del dominio descritos en la literatura; PDE: fosfodiesterasa.

Los putativos dominios PilZ identificados en *At. thiooxidans* fueron alineados con la secuencias aminoacídicas de los dominios PilZ de Pa4608 (*P. aeruginosa* PAO1) e YcgR (*E. coli* K-12), dos proteínas con dominio PilZ ha sido descrito como funcional (Ryjenkov y col., 2006; Ramelot y col., 2007). Siete de los nueve dominios PilZ presentaron los motivos canónicos RxxxR y (D/N)xSxxG, los cuales son los motivos que se encuentran involucrados en la unión del c-di-GMP (Figura 8). El dominio PilZ del producto del gen *AthiA1_14214* presenta una sustitución de serina por treonina en el segundo motivo, quedando DxTxxG. Este cambio no debería afectar la interacción con el c-di-GMP debido a que se conserva el grupo hidroxilo de la cadena lateral, permitiendo la interacción por puentes de hidrógeno. El dominio PilZ codificado por el gen *AthiA1_08821* se encuentra poco conservado y se predice como inactivo.

3.3. Análisis transcripcional del conjunto de genes identificados.

Para determinar que *At. thiooxidans* posee una vía del c-di-GMP funcional, es necesario determinar a lo menos que los putativos genes involucrados en esta vía se están expresando. La expresión transcripcional cualitativa se determinó en células crecidas en fase exponencial media, debido al bajo título celular que alcanzan los Acidithiobacillales en cultivo. El análisis de RT-PCR indica que bajo las condiciones de estudio, 19 de los 25 putativos genes que codifican DGCs y PDEs se expresan en *At. thiooxidans* (Figura 9; Tabla 6).

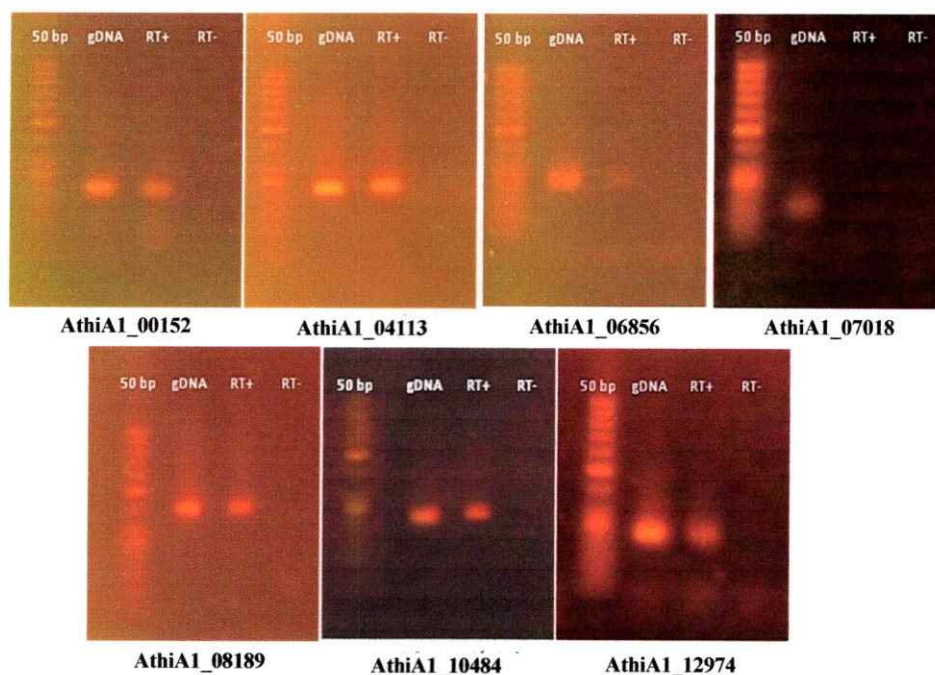


Figura 9. Análisis cualitativo de la expresión transcripcional de los putativos genes GGDEF y EAL encontrados en *At. thiooxidans*. Se presentan algunos de los resultados obtenidos bajo una misma condición de estudio. 50 bp: marcador de tamaño; gDNA: control positivo utilizando DNA genómico; RT+: reacción con transcriptasa reversa; RT-: reacción sin transcriptasa reversa.

Tabla 6. Resumen de resultados de los experimentos de RT-PCR.

Gen	Dominio	RT (A)	RT (TS)	Gen	Dominio	RT (A)	RT (TS)
<i>AthiA1_03313</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_00152</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_05539</i>	GGDEF	+	ND	<i>AthiA1_00157</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_07707</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_01972</i>	GGDEF/EAL	ND	ND
<i>AthiA1_08189</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_01982</i>	GGDEF/EAL	ND	ND
<i>AthiA1_08219</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_04113</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_08224</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_06856</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_09870</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_07018</i>	GGDEF/EAL	+	ND
<i>AthiA1_13201</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_08179</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_15675</i>	GGDEF	+	+	<i>AthiA1_10484</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_08184</i>	EAL	+	+	<i>AthiA1_12969</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_09875</i>	EAL	+	+	<i>AthiA1_14219</i>	GGDEF/EAL	+	+
<i>AthiA1_12974</i>	EAL	+	+	<i>AthiA1_14626</i>	GGDEF/EAL	ND	ND
<i>AthiA1_13196</i>	HD-GYP	ND	ND				

ND: No detectado bajo nuestras condiciones experimentales; A: azufre; TS: tiosulfato

3.4. Extracción de c-di-GMP a partir de *At. thiooxidans*.

Para comprobar la existencia de una vía del c-di-GMP funcional en cualquier bacteria es de vital importancia comprobar que esta bacteria produce c-di-GMP, para lo cual es necesario obtener extractos celulares e posteriormente enriquecer la fracción nucleotídica. Los niveles totales de c-di-GMP son muy dependientes de la fase de crecimiento y las condiciones de cultivo inicial, así como de la bacteria a estudiar (Weinhouse y col., 1997; Hickman y Harwood, 2008; Ryan y col., 2009; Ruiz y col., 2012), por lo que es necesario estandarizar varios parámetros. La extracción de nucleótidos fue realizada a partir de células crecidas en tiosulfato, tetrionato o azufre elemental. Para los cultivos en azufre se procedió a realizar extracciones desde células planctónicas y células adheridas (Ruiz y col., 2012).

Debido a la imposibilidad técnica de realizar las mediciones en el Centro de Estudios para el desarrollo de la Química (CEPEDEQ, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile), nos vimos obligados a optar por entregar las mediciones a un servicio externo (Scripps Center for Metabolomics and Mass Spectrometry, La Jolla, San Diego, California, E.E.U.U.).

Previo a la cuantificación de extractos biológicos se procedió a realizar una curva de calibración con soluciones de c-di-GMP de concentraciones conocidas (Figura 10). Una vez esta curva determinada, se procedió a la medición de la concentración de c-di-GMP total en las diferentes muestras biológicas obtenidas a partir de células crecidas en azufre, tiosulfato o tetrionato. Todas las muestras presentaron un valor que

se encontraba por debajo del límite inferior de la curva de calibración. Fue imposible averiguar todos los parámetros necesarios de los experimentos para validar estos resultados. A pesar de estos resultados débiles, los análisis de HPLC de las muestras previo a MS arrojaron tiempos de retención similares a los determinados con las soluciones estándares (Tabla 7). Un análisis de los iones producidos de estas fracciones mostró una respuesta para los iones producidos por MS con polaridad positiva para c-di-GMP (el ión molecular con una relación masa/carga (m/z) de 691 se fragmenta en dos especies con relación m/z de 135 y 152) (Tabla 8, Figura 11) (Spangler y col., 2010). Estos resultados arrojan de una forma aún muy preliminar, que la bacteria biominera *At. thiooxidans* produce c-di-GMP.

3.5. Ensayos funcionales mediante complementación heteróloga en cepas mutantes de *Salmonella*.

El análisis obtenido por espectrometría de masas indica que bajo las condiciones de cultivo utilizadas, *At. thiooxidans* posee una actividad DGC que es detectable. La siguiente etapa experimental posee el objetivo de comprobar la funcionalidad de algunas de las proteínas identificadas. Debido a que no es posible utilizar ingeniería genética tradicional para realizar mutaciones de los putativos genes codificantes para DCG o PDE, se procedió a realizar ensayos de complementación heteróloga en las cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium AdrA1f (mutante en la DGC AdrA) y MAE282 (mutante en la PDE YciR). La funcionalidad se determinó mediante un análisis fenotípico por absorción de Calcofluor (García y col., 2004).

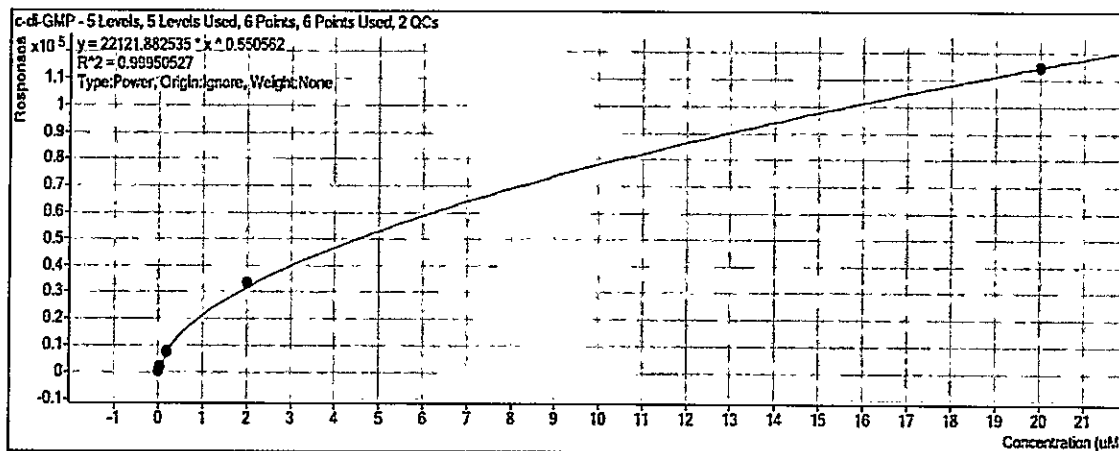


Figura 10. Curva de calibración de c-di-GMP utilizada en espectrometría de masas. Se prepararon soluciones de estándar de c-di-GMP cuyo rango de concentración fue desde 2 nM a 20 µM.

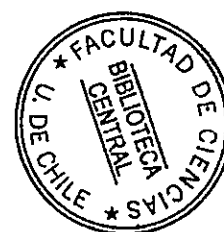
Tabla 7. Resumen de la determinación de c-di-GMP por MS.

Muestra	RT	Response	Concentración (µM)
2 nM	3,980	374	0,0006
20 nM	3,994	2030	0,0131
200 nM	4,000	9678	0,2228
2 µM	4,007	33577	2,1338
20 µM	4,014	114931	19,9430
Azufre adherido	4,088	46	NC
Azufre planctónico	4,094	20	NC
Tetrationato	4,101	10	NC
Tiosulfato	4,101	19	NC

NC: no cuantificable

Tabla 8. Presencia de especies iónicas moleculares en los análisis de MS/MS con polaridad positiva.

Muestra	m/z 135	m/z 152
c-di-GMP estándar	+	+
Azufre	+	+
Tiosulfato	+	+
Tetrationato	+	+



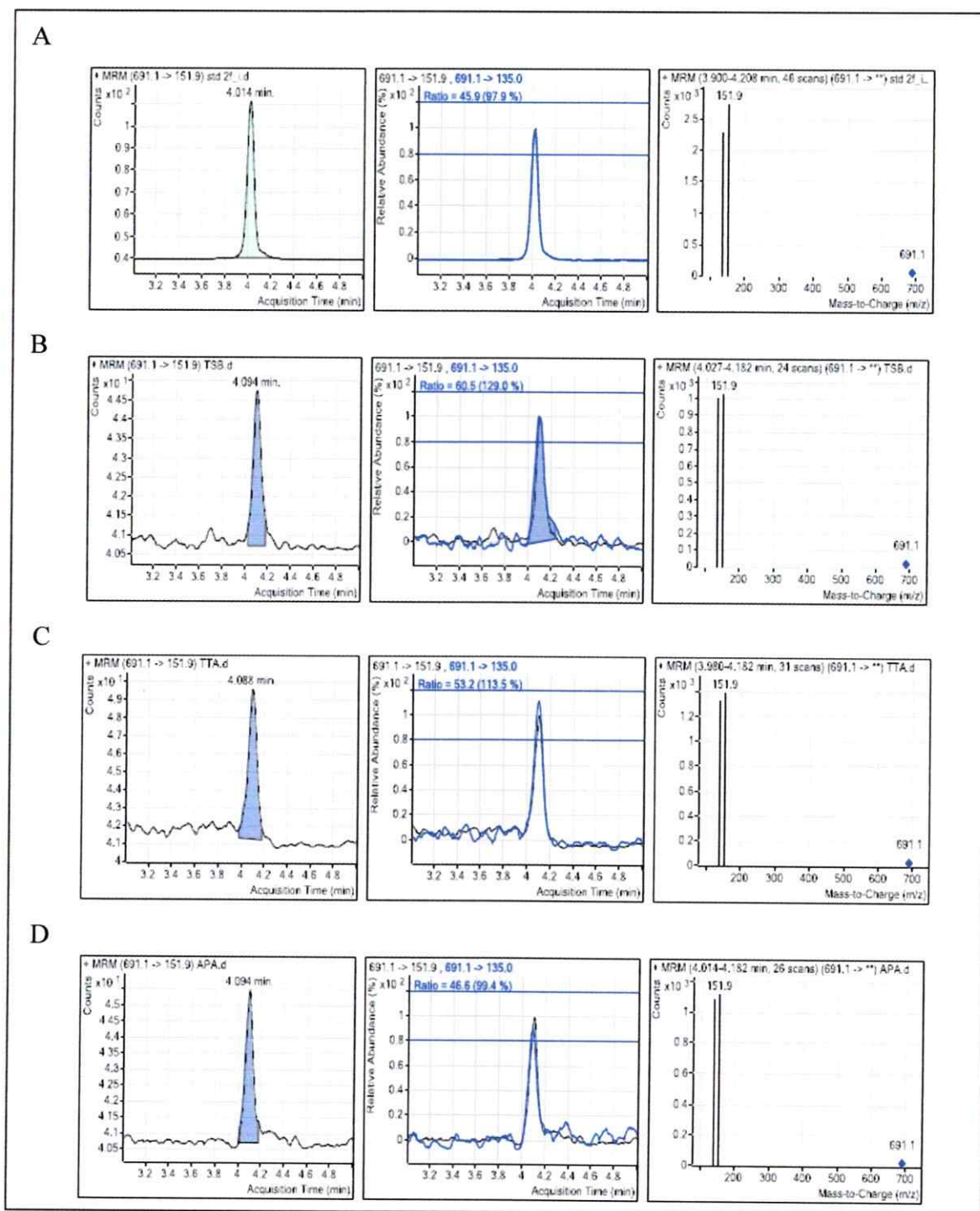


Figura 11. Análisis por MS/MS de soluciones de c-di-GMP. **A.** Análisis de una solución estándar de c-di-GMP a una concentración de 2 nM. **B.** Análisis de un extracto de *At. thiooxidans* crecido en tiosulfato. **C.** Análisis de un extracto de *At. thiooxidans* crecido en tetrationato. **D.** Análisis de un extracto de *At. thiooxidans* crecido en azufre. Todas las muestras presentaron tiempos de retención y especies iónicas similares a las obtenidas con las soluciones estándares.

De los 15 dominios GGDEF que fueron predichos funcionales, se escogió a los contenidos en los genes *AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224* y *AthiA1_15675*, los cuales codifican putativas proteínas DGC con dominio GGDEF solo con arquitectura simple. Los vectores que codifican para los genes *AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224* y *AthiA1_15675* favorecieron la formación del fenotipo rdar, el cual se caracteriza por la alta producción de sustancias extracelulares como celulosa y fimbrias (Kader y col., 2006). Debido a que la síntesis y la secreción de estos exopolímeros es regulado en forma positiva por los niveles de c-di-GMP, se concluyó que estos genes codifican proteínas que son DGC funcionales (Figura 12). Para comprobar que los cambios fenotípicos eran atribuidos a la expresión de los genes, se repitió el ensayo en presencia de glucosa, la cual reprime el sistema de expresión del vector pBAD24. Con la adición de glucosa se revirtieron los resultados obtenidos, enfatizando que los fenotipos observados se deben a la acción de estas DGCs.

Durante estos experimentos se transformaron cepas mutantes con putativos genes codificantes para proteínas con dominio PDE o proteínas con ambos dominios, los cuales fueron predichos como funcionales mediante el análisis bioinformático. Sin embargo, las cepas transformadas no presentaron un cambio fenotípico en ninguno de los casos. Este comportamiento fenotípico podría deberse a la especificidad regulatoria descrita para las proteínas PDE (García y col., 2004, Kader y col., 2006).

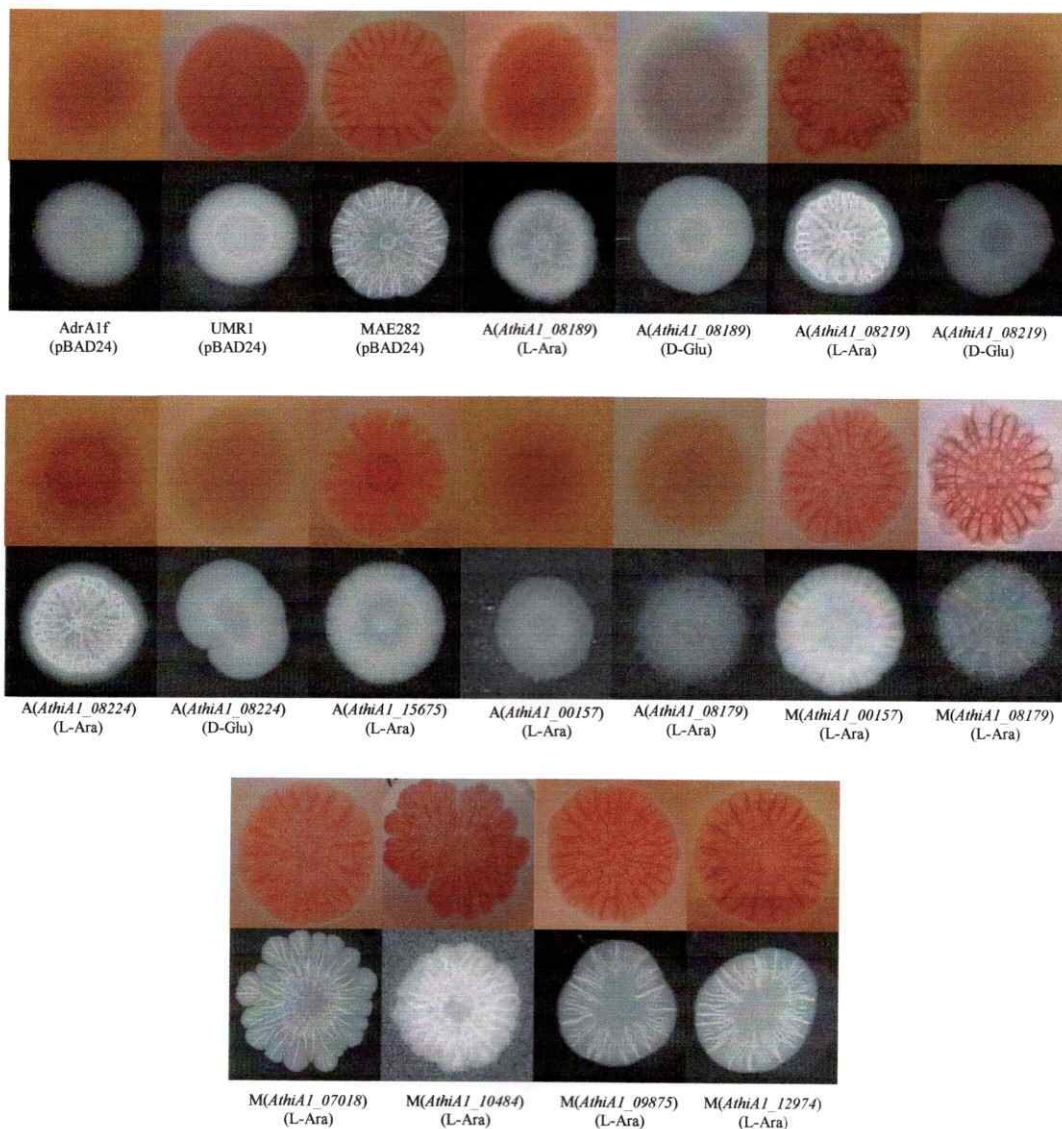


Figura 12. Complementación heteróloga en cepas mutantes AdrA1f (A) y MAE282 (M) de *Salmonella*. Los putativos genes fueron amplificados por PCR y ligados a los vectores de expresión pBAD24. El ensayo se realizó en medio LB sin sal suplementado con 0,2% de L-Arabinosa y 40 $\mu\text{g/ml}$ de Rojo Congo (cuadros rojos) o 25 $\mu\text{g/ml}$ de Calcofluor (cuadros negros). La represión de los fenotipos alterados se realizó reemplazando la arabinosa con D-Glucosa. Los genes *AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224* y *AthiA1_15675* codifican proteínas DGC funcionales en *Salmonella*. El fenotipo de las cepas sin transformar fue idéntico al fenotipo de las cepas transformadas con el vector pBAD24 sin inserto.

DISCUSIÓN

En el marco de esta tesis se caracterizó la vía del c-di-GMP en la bacteria biominera *Acidithiobacillus thiooxidans*. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de una vía del c-di-GMP funcional en esta bacteria, la cual podría estar involucrada en la regulación de fenotipos como la síntesis de exopolisacáridos, la formación de biopelículas y la motilidad, tal como ha sido descrito en otras bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004).

4.1. Análisis *in silico* de los elementos moleculares que conforman la vía del c-di-GMP de *At. thiooxidans*.

Una vez que se obtuvieron posibles genes candidatos que codificaran proteínas relacionadas al metabolismo (Tabla 2, página 30) y señalización (Tabla 3, página 31) del c-di-GMP en *At. thiooxidans*, se procedió a comparar el número de putativos ORFs con respecto a las otras bacterias del género *Acidithiobacillus* caracterizadas previamente en nuestro laboratorio (Ruiz y col., 2007; Castro y col., 2009; Díaz, 2010; Ruiz y col., 2012; esta Tesis; Tesis Doctorado Matías Castro, 2013). De las tres especies de *Acidithiobacillus*, *At. thiooxidans* es aquella que presenta el número mayor de genes codificantes para proteínas DGC/PDE y proteínas con dominio PilZ, mientras que *At. ferrooxidans* presenta el menor número. Además, *At. thiooxidans* es la única en la cual fue posible identificar un gen codificante para una PDE con dominio HD-GYP (Tabla 9)

(Ruiz y col., 2007, Castro y col., 2009; Díaz, 2010; Ruiz y col., 2012; esta Tesis; Tesis Doctorado Matías Castro, 2013).

Tabla 9. Comparación entre miembros de *Acidithiobacillus*.

BACTERIA	GGDEF	EAL	GGDEF/ EAL	HD-GYP	PilZ	PeID
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	-	1	4	-	2	-
<i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756	9	3	6	-	8	1
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ATCC 19377	9	3	12	1	9	1

El análisis bioinformático predijo que quince de los veintiún dominios GGDEF totales y catorce de los quince dominios EAL de *At. thiooxidans* poseen los aminoácidos clave para la actividad catalítica DGC (Figura 5, página 34) (Chan y col., 2004; Wassmann y col., 2007) y PDE (Figura 6, página 36) (Rao y col., 2008; Tchigvintsev y col., 2010), respectivamente. Además, reveló que el dominio HD-GYP identificado posee los aminoácidos clave para su actividad (Figura 7, página 37) (Lovering y col., 2011). Con respecto a los dominios PilZ, ocho de los nueve dominios identificados poseen los motivos de unión a c-di-GMP identificados en otros dominios PilZ funcionales (Figura 8, página 39) (Ryjenkov y col., 2006; Ramelot y col., 2007). En bacterias que han sido caracterizadas por tener una vía del c-di-GMP funcional, se encuentra descrito que existen dominios que han perdido algunos de los aminoácidos clave para la actividad catalítica (Römling y col., 2005; Hengge, 2009). Estos dominios catalíticos inactivos se han conservado por el hecho de que han adquirido la capacidad de comportarse como dominios efectores que permiten la transducción de señales (Lee y

col., 2007; Newell y col., 2009) o dominios regulatorios de la actividad catalítica de la proteína (Christen y col., 2005). Esta es una posibilidad que sería aplicable a los seis dominios GGDEF (Tabla 4, página 35) y un dominio EAL (Tabla 5, página 39) inactivos identificados en *At. thiooxidans*.

4.2. Funcionalidad de la vía del c-di-GMP de *At. thiooxidans*.

Luego de los antecedentes obtenidos por el análisis bioinformático, se desarrollaron tres aproximaciones experimentales para corroborar la funcionalidad de la vía del c-di-GMP en *At. thiooxidans*: i) la detección de la expresión transcripcional mediante RT-PCR, ii) la detección y cuantificación de c-di-GMP en extractos enriquecidos en nucleótidos de *At. thiooxidans*, iii) el desarrollo de ensayos de funcionalidad proteica mediante complementación heteróloga en *Salmonella* serovar Typhimurium.

4.2.1. RT-PCR.

Para comprobar la funcionalidad de esta vía en *At. thiooxidans*, es necesario demostrar que los putativos genes identificados en el metabolismo del c-di-GMP se expresen. Se escogió la fase exponencial media de crecimiento, debido a que existe una mayor tasa de síntesis de RNA, por lo que es posible obtener una mayor cantidad de RNA en buen estado por masa celular. Bajo las condiciones de estudio seleccionadas, se demostró que 19 de los 25 putativos genes relacionados al metabolismo del c-di-GMP se expresan (Figura 9 y Tabla 6, página 42). Para obtener un buen perfil transcripcional de

los genes relacionados a la vía del c-di-GMP, es necesario realizar experimentos bajo otras condiciones de crecimiento para determinar si existe una diferencia cuantitativa en la expresión transcripcional, como la diferencia entre células planctónicas y células adheridas, o entre células en fase exponencial o fase estacionaria temprana.

4.2.2. Detección de c-di-GMP.

Como se dijo anteriormente, los niveles intracelulares de este segundo mensajero son dependientes de las condiciones ambientales y el tipo de bacteria, por lo que es necesario estandarizar inicialmente muchos parámetros. En general, las bacterias producen c-di-GMP en el orden de los picomoles, por lo que es necesario trabajar con una gran cantidad de biomasa inicial. Los resultados obtenidos por los experimentos de espectrometría de masas, aunque muy preliminar, sugieren que *At. thiooxidans* tiene una actividad DGC. La comunicación con Scripps Center for Metabolomics and Mass Spectrometry (La Jolla, San Diego, California, E.E.U.U.) fue difícil, por lo que fue no fue posible obtener todos los parámetros experimentales durante el desarrollo de esta tesis, incluyendo el hecho de que en su curva de calibración no incorporaron concentraciones de c-di-GMP entre los 2 μM y los 20 μM .

El análisis de los cromatogramas muestra un corrimiento en el tiempo de retención. Sólo existe un artículo que describe el comportamiento del c-di-GMP en los análisis por cromatografía, el cual es dependiente de la concentración de c-di-GMP y la concentración de sal de la fase móvil (Hyodo y col., 2005). En base a estos resultados se procedió a realizar los experimentos de complementación heteróloga.

4.2.3. Complementación heteróloga en *Salmonella*.

Dado la existencia de una posible actividad DGC en *At. thiooxidans*, se procedió a realizar ensayos de complementación en cepas mutantes de *Salmonella*, ya que la manipulación genética de estas bacterias acidófilas es extremadamente difícil y muy poco reproducible. Se utilizaron tres clases de cepas para probar la funcionalidad de la vía metabólica: una cepa silvestre (UMR1), una cepa mutante en una DGC (AdrA1f) y una cepa mutante en una PDE (MAE282). La complementación de la cepa DGC⁻ con los genes *AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224* y *AthiA1_15675*, codificando proteínas DGC con dominio GGDEF solo, restauró el fenotipo rugoso de la cepa mutante de *Salmonella*, lo que permite concluir que estas DGCs son funcionales (Figura 12, página 46). La existencia de una actividad DGC hace suponer que *At. thiooxidans* posee una actividad PDE. Se descartó el dominio HD-GYP debido a no tener un modelo adecuado de estudio. Cuando se transformó la cepa PDE⁻ con los vectores que codificaban las putativas PDE *AthiA1_09875* o *AthiA1_12974*, las cuales fueron predichas como PDEs funcionales, no fue posible obtener resultados positivos de complementación. Tampoco fue posible obtener complementación de función, ya sea DGC o PDE con los genes codificando proteínas con ambos dominios DGC y PDE. Dado que todos los dominios EAL de *At. thiooxidans* que se encuentran en proteínas con dominios DGC y PDE fueron predichos como funcionales, es probable que se encuentren bajo el mismo tipo de especificidad regulatoria descrita para las proteínas PDE. La actividad PDE es regulada a múltiples niveles, ya sea a nivel de la transcripción, la traducción y/o la actividad de las proteínas, a un nivel espacial y/o

temporal dentro de la célula (García y col., 2004, Kader y col., 2006). A diferencia de la actividad DGC, que poseen funciones redundantes, la detección de la actividad PDE *in vivo* requeriría de la sobreexpresión de estas proteínas en el sistema heterólogo adecuado.

4.3. Rol de la vía del c-di-GMP en *At. thiooxidans*.

Para comprender la importancia de esta vía en *At. thiooxidans* es necesario entender el ciclo de vida y la fisiología en esta bacteria. *At. thiooxidans* es una bacteria quimiolitotrofa que obtiene su energía metabólica a través de la oxidación de azufre elemental o compuestos reducidos de azufre (Kelly y Wood, 2000). En condiciones naturales los sustratos oxidables se encuentran en un estado sólido insoluble, por lo tanto, para su utilización es necesario establecer un contacto estrecho entre bacteria y sustrato. El contacto bacteria-sustrato se optimiza por la formación de una biopelícula y por lo tanto, se optimiza el proceso de biolixiviación (Sand y col., 2001).

Dentro de los numerosos fenotipos bacterianos que son regulados por los niveles intracelulares de c-di-GMP, la síntesis de exopolisacáridos (Ross y col., 1987; Weinhouse y col., 1997; Friedman y Kolter, 2004; Merighi y col., 2007) y la motilidad (Ryjenkov y col., 2006; Paul y col., 2010) son los fenotipos que más se han estudiado. El control sobre estos fenotipos es clave para la formación de cualquier biopelícula bacteriana. Al igual que en otras bacterias Gram-negativa estudiadas, *At. thiooxidans* presenta los fenotipos de formación de biopelículas y de motilidad (Kelly y Wood, 2000;

Valdés y col., 2011), por lo que es probable que los niveles intracelulares de c-di-GMP estén involucrados en la regulación de estos fenotipos, tal como ocurre para otras bacterias.

4.3.1. *At. thiooxidans* y la síntesis de exopolisacáridos.

La síntesis de exopolisacáridos de distinta naturaleza es un proceso que se encuentra regulado en forma positiva por niveles intracelulares altos de c-di-GMP (Ross y col., 1987; Weinhouse y col., 1997; Friedman y Kolter, 2004; Merighi y col., 2007). El análisis del contexto genómico de los genes identificados en *At. thiooxidans* reveló que dos locus génicos ubicados en los contigs 46 y 52 de *At. thiooxidans* codifican en total de trece proteínas relacionadas a la síntesis de exopolisacáridos. En el locus ubicado en el contig 46 se identificó un gen codificando una proteína con dominio PilZ (*AthiA1_05499*) y un gen que codifica una proteína con dominio GGDEF solo (*AthiA1_05539*). En el locus ubicado en el contig 52 se identificó un gen que codifica una proteína con dominio PilZ (*AthiA1_06526*) y un gen codificante para una proteína con dominios GGDEF y EAL (*AthiA1_06856*) (Figura 4, página 32). La mayoría de los genes relacionados al metabolismo de los exopolisacáridos identificados codifican proteínas con actividad Glicosil-transferasa.

El producto del ORF *AthiA1_06526* codifica una proteína con dominio PilZ, cuyo análisis mediante el algoritmo BLAST identificó como la subunidad A del complejo celulosa sintasa denominada en otras bacterias como BcsA o CelA. Los homólogos de BcsA identificados en *G. xylinus* y *S. Typhimurium*, catalizan la reacción de síntesis de

celulosa a una tasa directamente proporcional al nivel intracelular de c-di-GMP (Weinhouse y col., 1997; Kader y col., 2006). El ORF *AthiA1_06526* se encuentra río arriba de tres genes que codifican una proteína tipo BcsB, una proteína hipotética y una enzima con actividad endoglucanasa, junto con proteínas de tipo transportador. El conjunto de genes sugiere la existencia de un operón codificando todos los componentes de un complejo celulosa sintasa funcional, por lo que *At. thiooxidans* podría secretar celulosa durante la adhesión sobre algún sustrato sólido.

El análisis inicial del genoma también identificó un gen que codifica una proteína homóloga a PelD. PelD en *P. aeruginosa* es un regulador positivo de la síntesis de exopolisacáridos de tipo Pel (Friedman y Kolter, 2004). La presencia de una proteína homóloga en *At. thiooxidans*, sugiere que esta bacteria podría sintetizar un exopolisacárido de tipo Pel.

La existencia de estos sistemas de síntesis de exopolisacáridos, identificado por el análisis bioinformático, sugiere que *At. thiooxidans* podría secretar estos polímeros durante la formación de biopelículas sobre la superficie del mineral.

4.3.2. Motilidad.

En diversas bacterias, la motilidad es un fenotipo que se regula por los niveles intracelulares de c-di-GMP (D'Argenio y Miller, 2004; Simm y col., 2004). El c-di-GMP regula en forma negativa los procesos de motilidad flagelar (Ryjenkov y col., 2006), ya

sea al nivel de la síntesis (Sudarsan y col., 2010) o funcionalidad del aparato flagelar (Ryjenkov y col., 2006; Paul y col., 2010).

Entrando en el contexto de *At. thiooxidans*, se encuentra descrito que esta bacteria presenta motilidad mediante flagelación polar (Kelly y Wood, 2000). El análisis del genoma revela la presencia de un locus completo, formado por los contigs 83 y 84, para la síntesis y regulación de la maquinaria flagelar. Dentro de este contexto genómico, se identificaron genes codificando tres proteínas con dominio GGDEF solo (*AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224*), una proteína con dominio EAL solo (*AthiA1_08184*), una proteína con dominios GGDEF y EAL (*AthiA1_08179*) y dos proteínas con dominio PilZ (*AthiA1_08174* y *AthiA1_08474*) (Figura 4, página 32).

Dentro de las proteínas PilZ codificadas por *At. thiooxidans*, el producto del ORF *AthiA1_08474* presenta similitud con proteínas regulatorias de actividad proteica del tipo YcgR. En *E. coli*, la unión de c-di-GMP al dominio PilZ de YcgR impide la rotación del flagelo, lo que suprime la motilidad a un nivel funcional (Paul y col., 2010). La existencia de un homólogo en *At. thiooxidans* sugiere que la motilidad a nivel funcional es inhibida a niveles elevados de c-di-GMP por la acción de este putativo YcgR.

Un análisis del putativo operón codificante para el aparato flagelar reveló la existencia de un gen que codifica un regulador transcripcional cuya secuencia aminoacídica es similar al regulador transcripcional FleQ. También se encontraron homólogos FleN, FleR y FleS, proteínas que interaccionan con FleQ, (Figura 4, página

32) (Hickman y Harwood, 2008). Descrito inicialmente en *P. aeruginosa*, FleQ es un regulador positivo de la motilidad y un represor de la expresión de genes relacionados a la síntesis de exopolisacáridos. La reversión en la regulación de estos fenotipos se logra cuando FleQ une c-di-GMP y se suelta del DNA blanco (Hickman y Harwood, 2008). La existencia de FleQ en *At. thiooxidans* revela la existencia de un posible mecanismo de control de la motilidad a nivel de la transcripción.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos por los diferentes experimentos realizados durante el desarrollo de esta tesis es posible concluir que:

1. La mayoría de los dominios GGDEF, EAL, HD-GYP y PilZ de *At. thiooxidans* se encuentran conservados a nivel de secuencia aminoacídica. Además, al nivel transcripcional, la mayoría de los putativos genes codificantes para DGCs y/o PDEs se expresan. Esto indicaría que existe una vía del c-di-GMP funcional.
2. Se caracterizó la actividad DGC mediante análisis de los extractos nucleotídicos por espectrometría de masas y ensayos de complementación heteróloga en cepas mutantes de *Salmonella* con los genes *AthiA1_08189*, *AthiA1_08219*, *AthiA1_08224* y *AthiA1_15675*. Los resultados de estos experimentos sugieren que *At. thiooxidans* produce c-di-GMP.
3. Dentro de los genes que codifican proteínas efectoras del c-di-GMP, se identificaron algunos genes que se encuentran dentro de dos putativos operones relacionados con la síntesis de exopolisacáridos, un operón para celulosa y otro para exopolisacárido tipo pel. Esto indica que la síntesis de estos polímeros podría estar regulada por los niveles intracelulares de c-di-GMP.

REFERENCIAS

- Africa C.J., van Hille R.P., Harrison S.T (2012).** Attachment of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferriphilum* cultured under varying conditions to pyrite, chalcopyrite, low-grade ore and quartz in a packed column reactor. Applied microbiology and biotechnology. DOI 10.1007/s00253-012-3939-x.
- Aldridge P., Paul R., Goymer P., Rainey P., Jenal U (2003).** Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. Molecular Microbiology 47: 1695-1708.
- Amaro A., Chamorro D., Seeger M., Arredondo R., Peirano I., Jerez C.A (1991).** Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. Journal of Bacteriology 173: 910-915.
- Amikam D., Galperin MY (2006).** PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. Bioinformatics (Oxford, England) 22: 3-6.
- Antoniani D., Bocci P., Maciag A., Raffaelli N., Landini P (2010).** Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. Applied Microbiology and Biotechnology 85: 1095-1104.
- Ausmees N., Mayer R., Weinhouse H., Volman G., Amikam D., Benziman M., Lindberg M (2001).** Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. FEMS Microbiology Letters 204: 163-167.
- Barends T.R., Hartmann E., Griese J.J., Beitlich T., Kirienko N.V., Ryjenkov D.A., Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I (2009).** Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. Nature 459: 1015-1018.
- Barraud N., Schleheck D., Klebensberger J. et al (2009).** Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Mediates Phosphodiesterase Activity, Decreased Cyclic Di-GMP Levels, and Enhanced Dispersal. Journal of Bacteriology 191: 7333-7342.
- Barreto, M., Jedlicki, E., Holmes, D.S. (2005).** A Gene Cluster for the Formation of Extracellular Polysaccharide (EPS) Precursors in the Chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Applied Environmental Microbiology 71: 2907-2909.
- Benach J., Swaminathan S.S., Tamayo R., Handelman S.K., Folta-Stogniew E., Ramos J.E., Forouhar F., Neely H., Seetharaman J., Camilli A., Hunt J.F (2007).** The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. The European Molecular Biology Organization Journal 26: 5153-5166.
- Bobrov A.G., Kirillina O., Perry R.D (2005).** The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. FEMS Microbiology Letters 247: 123-130.
- Branda S.S., Vik S., Friedman L., Kolter R (2005).** Biofilms: the matrix revisited. TRENDS in Microbiology 13: 20-26.
- Castro M., Ruiz L.M., Barriga A., Jerez C.A., Holmes D.S., Guilliani N (2009).** C-di-GMP Pathway in Biomining Bacteria. Advances Materials Research Volumes 71-73: 22AthiA1_0015226. In *International Biohydrometallurgy Symposium*. Bariloche, Argentina (2009).
- Chan C., Paul R., Samoray D., Amiot N.C., Giese B., Jenal U., Schirmer T (2004).** Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. Proceedings National Academy Sciences USA 101: 17084-17089.

- Chang A.L., Tuckerman J.R., Gonzalez G., Mayer R., Weinhouse H., Volman G., Amikam D., Benziman M., Gilles-Gonzalez M.A (2001).** Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a Heme-Based Sensor. *Biochemistry* 40: 34420-34426.
- Chin K.H., Lee Y.C., Tu Z.L., Chen C.H., Tseng Y.H., Yang J.M., Ryan R.P., McCarthy Y., Dow J.M., Wang A.H., Chou S.H (2010).** The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Molecular Biology* 396: 646-662.
- Christen M., Christen B., Folcher M., Schauerte A., Jenal U (2005).** Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *Journal of Biological Chemistry* 280: 30829-30837.
- Christen B., Christen M., Paul R., Schmid F., Folcher M., Jenoe P (2006).** Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 32015-32024.
- Claret L., Miquel S., Vieille N., Ryjenkov D.A., Gomelsky M., Darfeuille-Michaud A (2007).** The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 33275-33283.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M (1995).** Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology* 49: 711-745.
- Cotter P.A., Stibitz S (2007).** C-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion Microbiology* 10: 17-23. Review.
- D'Argenio D.A., Miller S.I (2004).** Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150: 2497-2502.
- Davey M.E., O'Toole G.A (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 847-867
- De N., Navarro M.V., Raghavan R.V., Sondermann H (2009).** Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *Journal of Molecular Biology* 393: 619-633.
- Díaz M (2010).** Estudio de los niveles de transcripción de los genes HD 83-19, HD 137-27 y EAL 83-31. que codifican putativas fosfodiesterasas pertenecientes a la vía del c-di-GMP en *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463. Seminario de Título en Ingeniería en Biotecnología Molecular. Departamento de biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Dow J.M., Fouhy Y., Lucey J.F., Ryan R.P (2006).** The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1378-1384. Review.
- Duerig A., Abel S., Folcher M., Nicollier M., Schewede T., Amiot N., Giese B., Jenal U (2009).** Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes and Development* 23: 93-104.
- Düvel J., Bertinetti D., Möller S., Schwede F., Morr M., Wissing J., Radamm L., Zimmermann B., Genieser H.G., Jänsch L., Herberg F.W., Häussler S (2012).** A chemical proteomics approach to identify c-di-GMP binding proteins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* 88: 229-236.
- Farah C., Vera M., Morin D., Haras D., Jerez C.A., Guiliani N (2005).** Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:7033-7040.
- Fleming H.C., Wingender J (2010).** The biofilm matrix. *Nature reviews Microbiology* 8: 623-633.

- Friedman L., Kolter R (2004).** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology* 186: 4457-4465.
- Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M., Spring D.R (2011).** Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chemical Reviews* 111: 28-67.
- Galperin M.Y., Natale D.A., Aravind L., Koonin E.V (1999).** A specialized version of the HD Hydrolase domain implicated in signal transduction. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 30AthiA1_0015705.
- Galperin M.Y., Nikolskaya A.N., Koonin E.V (2001).** Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letter* 203: 11-21.
- Galperin M.Y (2004).** Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology* 6: 552-567.
- Galperin M.Y., Higdon R., Kolker E (2010).** Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Molecular Biosystems* 6: 721-728.
- García B., Latasa C., Solano C., García del Portillo F., Gamazo C., Lasa I (2004).** Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular Microbiology* 54: 264-277.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W. (1998).** Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2743-2747.
- Goebel B.M., Stackebrandt E (1994).** Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1614-1621.
- Harneit K., Göksel A., Kock J., Klock J.H., Gehrke T., Sand W (2006).** Adhesion to sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83: 245-254.
- Hengge R (2009).** Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 7: 26AthiA1_0015273. Review.
- Hickman J.W., Tifrea D.F., Harwood C.S (2005).** A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings National Academy Sciences USA* 102: 14422-14427.
- Hickman J.W., Harwood C.S (2008).** Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology* 69: 376-389.
- Hurley J.H (2003).** GAF domains: cyclic nucleotides come full circle. *Science STKE* 164, pe1.
- Hyodo M., Sato Y., Hayakawa Y., Karaolis D.K (2005).** Chemical behavior of bis(3'-5')diguanylic acid in aqueous solutions. *Nucleic Acids Symposium Series* 49: 117-118.
- Jenal U., Malone J (2006).** Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annual Reviews of Genetic* 40: 385-407. Review.
- Jonas K., Melefors O., Römling U (2009).** Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiology* 4: 341-358.
- Jones H. A., Lillard J. W., Jr, Perry R. D (1999).** HmsT, a protein essential for expression of the haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis*. *Microbiology* 145: 2117-2128.
- Kader A., Simm R., Gerstel U., Morr M., Römling U (2006).** Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* 60: 602- 616.

- Kelly D.P., Wood A.P (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 511–516.
- Kirillina O., Fetherstone J.D., Bobrov A.G., Abney J., Perry R.D (2004). HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hsm-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. Molecular Microbiology 54: 75-78.
- Klebenschberger J., Lautenschlager K., Bressler D., Wingender J., Philipp B (2008). Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptative survival strategy. Environmental Microbiology 9: 2942-2955.
- Kostick J.L., Szkotnicki L.T., Rogers E.A., Bocci P., Raffaelli N., Marconi R.T (2011). The diguanylate cyclase, Rrp1, regulates critical steps in the enzootic cycle of the Lyme disease spirochetes. Molecular microbiology 81: 219-231.
- Krasteva P.V., Fong J.C., Shikuma N.J., Beyhan S., Navarro M.V., Yildiz F.H., Sondermann H (2010). *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. Science 327: 866-868.
- Kulasakara H., Lee V., Brencic A., Liberati N., Urbach J., Miyata S., Lee D.G., Neely A.N., Hyodo M., Hayakawa Y., Ausubel F.M., Lory S (2006). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. Proceedings National Academy Sciences USA 103: 2839-2844.
- Kulshina N., Baird N.J., Ferré-D'Amaré A.R (2009). Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. Nature Structural & Molecular Biology 16: 1212-1217.
- Kumar M., Chatterji D (2008). Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology 154: 2942-2955.
- Lai T.H., Kumagai Y., Hyodo M., Hayakawa Y., Rikihisa Y (2009). The *Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. Journal of Bacteriology 191: 693-700.
- Leduc J.L., Roberts G.P (2009). Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri. Journal of Bacteriology, 191:7121-7122.
- Lee V.T., Matewish J.M., Kessler J.L., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. Molecular Microbiology 65: 1474-1484.
- Lee H.S., Gu F., Ching S.M., Lam Y., Chua K.L (2010a). CdpA Is a *Burkholderia pseudomallei* Cyclic di-GMP Phosphodiesterase Involved in Autoaggregation, Flagellum Synthesis, Motility, Biofilm Formation, Cell Invasion, and Cytotoxicity. Infection and Immunity 78: 1832-1840.
- Lee E.R., Baker J.L., Weinberg Z., Sudarsan N., Breaker R.R (2010b). An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. Science 329: 845-848.
- Lovering A.L., Capeness M.J., Lambert C., Holey L., Sockett R.E (2011). The structure of an unconventional HD-GYP protein from *Bdellovibrio* reveals the roles of conserved residues in this class of Cyclic-di-GMP phosphodiesterases. mBio 2. doi: 10.1128/mBio.00163-11.
- McCarthy Y., Ryan R.P., O'Donovan K., He Y.Q., Jiang B.L., Feng J.X., Tang J.L., Dow J.M (2008). The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Molecular Plant Pathology 9: 819-824.

- Merighi M., Lee V.T., Hyodo M., Hayakawa Y., Lory S (2007).** The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 65: 876-895.
- Merkel T. J., Barros C., Stibitz, S (1998).** Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *Journal of Bacteriology* 180: 1682-1690.
- Monds R.D., Newell P.D., Gross R.H., O 'Toole G.A (2007).** Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesine LapA. *Molecular Microbiology* 63: 656-679.
- Moreno-Paz M., Gómez M.J., Arcas A., Parro V (2010).** Environmental transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. in their natural microbial community. *BMC Genomics* 11: 404-417.
- Nakamura K., Nakamura M., Yoshikawa H., Amano Y (2001).** Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* JCM7814. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65:102-108.
- Nakhmchick A., Wilde C., Rowe-Magnus D.A (2008).** Cyclic-di-GMP Regulates Extracellular Polysaccharide Production, Biofilm Formation, and Rugose Colony Development by *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4199-4209.
- Newell P.D., Monds R.D., O'Toole G.A (2009).** LapD is a bis-(3', 5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings National Academy Sciences USA* 106: 3461-3466.
- Newell P.D., Boyd C.D., Sondermann H., O'Toole G.A (2011).** A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *Plos Biology* 9: e1000587. doi:10.1371/journal.pbio.1000587.
- Nikolskaya A.N., Mulikidjanian A.Y., Beech I.B., Galperin M.Y (2003).** MASE1 and MASE2: two novel integral membrane sensory domains. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 5:11-16.
- Olivera-Nappa A., Picioreanu C., Asenjo J.A (2010).** Non-homogeneous biofilm modeling applied to bioleaching processes. *Biotechnology and bioengineering* 106: 660-676.
- Paul K., Nieto V., Carlquist W.C., Blair D.F., Harshey R.M (2010).** The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Molecular cell* 38: 128-139.
- Pistorio M., Curutchet G., Donati E., Tedesco P. (1994).** Direct zinc sulfide bioleaching by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Biotechnol. Lett.* 16: 419 - 424.
- Pratt J.T., Tamayo R., Tischler A.D., Camilli A (2007).** PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 12860-12870.
- Ramelot T.A., Yee A., Cort J.R., Semesi A., Arrowsmith C.H., Kennedy M.A (2007).** NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins* 66: 266-271.
- Ramirez R., Guilian N., Valenzuela L., Beard S., Jerez C.A (2004).** Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4491-4498.
- Ramirez M., Gómez J.M., Cantero D., Páca J., Halecký M., Kozliak E.I., Sobotka M (2009).** Hydrogen sulfide removal from air by *Acidithiobacillus thiooxidans* in a trickle bed reactor. *Folia Microbiol (Praha)* 54:409-414.

- Rao F., Yang Y., Qi Y., Liang Z.X (2008).** Catalytic mechanism of cyclic di-GMP specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 190: 3622-3631.
- Rawlings D.E., Dew D., du Plessis C (2003).** Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology* 21:38-44.
- Rawlings D.E (2005).** Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microbial Cell Factories* 4:13.
- Rivas M., Seeger M., Jedlicki E., Holmes D.S (2007).** Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied Environmental Microbiology* 73: 3225-3231.
- Römling, U., Bian, Z., Hammar, M., Sierralta, W.D., and Normark, S (1998).** Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *Journal of Bacteriology* 180: 722-731.
- Römling U., Rohde M., Olsen A., Normark S., Reinkoster J (2000).** AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella Typhimurium* at least two independent pathways. *Molecular Microbiology* 36: 10-23.
- Römling U., Gomelsky M., Galperin M.Y (2005).** C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology* 57: 629-639.
- Römling U., Rohde M., Olsen A., Normark S., Reinkoster J (2000).** AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behavior in *Salmonella Typhimurium* at least two independent pathways. *Molecular Microbiology* 36: 10-23.
- Römling U., Amikam D (2006).** Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion Microbiology* 9: 218-228. Review.
- Römling U., Simm R (2009).** Prevailing concepts of c-di-GMP signaling. *Contributions to microbiology* 16: 161-181.
- Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., van der Marel G.A., van Boom J.H. et al (1987).** Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325: 279- 281.
- Roth A., Breaker R.R (2009).** The structural and functional diversity of metabolite binding riboswitches. *Annual Reviews of Biochemistry*. 78, 305-334.
- Ruiz L.M., Sand W., Jerez C.A., Guiliani N (2007).** C-di-GMP pathway in *Acidithiobacillus ferrooxidans*: analysis of putative diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs) bifunctional proteins. *Advances Materials Research* Vol.20: 551-555.
- Ruiz LM, Valenzuela S., Castro M., Gonzalez A., Frezza M., Soullère L., Rohwerder T., Queneau Y., Doutheau A., Sand W., Jerez CA, Guiliani N (2008).** AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* 94: 133-137.
- Ruiz L.M (2010).** Papel del Quorum Sensing y de la vía c-di-GMP en la regulación del desarrollo de biopelícula en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Doctorado en Ciencias con Mención en Microbiología. Departamento de biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Ruiz L.M., Castro M., Barriga A., Jerez C.A., Guiliani N (2012).** The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Letters in Applied Microbiology* 54: 133-139.

- Ryan R.P., Fouhy Y., Lucey J.F., Crossman L.C., Spiro S., He Y.W., Zhang L.H., Heeb S., Camara M., Williams P., Dow J.M (2006). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings National Academy Sciences USA* 103: 6712–6717.
- Ryan R.P., Fouhy Y., Lucey J.F., Jiang B.L., He Y.Q., Feng J.X., Tang J.L., Dow J.M (2007). Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology* 63: 429-442.
- Ryan R.P., Lucey J., O'Donovan K., McCarthy Y., Yang L., Tolker-Nielsen T., Dow J.M (2009). HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 11: 1126–1136.
- Ryan R.P., Dow J.M (2010). Intermolecular interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence-related signal transduction in *Xanthomonas campestris*. *Virulence* 1: 404-408.
- Ryan R.P., Tolker-Nielsen T., Dow J.M (2012). When the PilZ don't work: effectors for cyclic di-GMP action in bacteria. *Trends in Microbiology* 20: 235-242.
- Ryjenkov D.A., Tarutina M., Moskvina O.V., Gomelsky M (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *Journal of Bacteriology* 187: 1792-1798.
- Ryjenkov D.A., Simm R., Romling U., Gomelsky M (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 30310–30314.
- Saha R., Donofrio R.S (2012). The microbiology of metalworking fluids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. DOI 10.1007/s00253-012-4055-7.
- Sand W., Gehrke T., Jozsa P., Schippers A (2001). (Bio) chemistry of bacterial leaching - direct vs. indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59: 159–175.
- Sand W., Gehrke T (2006). Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* 157:49–56
- Sauer K., Richkard A.H., Davies D.G (2007). Biofilms and biocomplexity. *Microbiology* 2: 347–353.
- Saxena I.M., Brown R.M. Jr (1995). Identification of a second cellulose synthase gene (*acsAII*) in *Acetobacter xylinum*. *Journal of Bacteriology* 177: 5276-5283.
- Schippers A., Sand W (1999). Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Applied Environmental Microbiology* 65:319–321.
- Schirmer T., Jenal U (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nature reviews Microbiology* 7: 7AthiA1_0198235.
- Schmidt A.J., Ryjenkov D.A., Gomelsky M (2005). The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology* 187: 4774-4781.
- Simm R., Morr M., Kader A., Nimtz M., Römmling U (2004). GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology* 53: 1123-1134.
- Simm R., Remminghorst U., Ahmad I., Zakikhany K., Römmling U (2009). A role for the EAL-like protein STM1344 in regulation of CsgD expression and motility in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 191: 3928-3937.

- Smith K.D., Lipchock S.V., Ames T.D., Wang J., Breaker R.R., Strobel S.A (2009).** Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nature Structural & Molecular Biology* 16: 1218-1223.
- Smith K.D., Shanahan C.A., Moore E.L., Simon A.C., Strobel S.A (2011).** Structural basis of differential ligand recognition by two classes of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate-binding riboswitches. *Proceedings National Academy Sciences USA* 108: 7757-7762.
- Spangler C., Böhm A., Jenal U., Seifert R., Kaever V (2010).** A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *Journal of Microbiological Methods* 81: 226-231.
- Sondermann H., Shikuma N.J., Yildiz F.H (2012).** You've come a long way: c-di-GMP signaling. *Current Opinion in Microbiology*. doi:10.1016/j.mib.2011.12.008.
- Srivastava D., Harris R.C., Waters C.M (2011).** Integration of Cyclic di-GMP and Quorum Sensing in the Control of *vpsT* and *aphA* in *Vibrio cholera*. *Journal of Bacteriology* 193: 6331-6341.
- Sudarsan N., Lee E.R., Weinberg Z., Moy R.H., Kim J.N., Link K.H., Breaker R.R (2008).** Riboswitches in Eubacteria Sense the Second Messenger Cyclic Di-GMP. *Science* 321: 411-413.
- Sultan S.Z., Pitzer J.E., Boquoi T., Hobbs G., Miller M.R., Motaleb M.A (2011).** Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 79: 327AthiA1_00157283.
- Tal R., Wong H. C., Calhoon R. et al (1998).** Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of Bacteriology* 180: 4416-4425.
- Tamayo R., Tischler A.D., Camilli A (2005).** The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* 280: 333AthiA1_019723330.
- Tamayo R., Pratt J.T., Camilli A (2007).** Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Reviews of Microbiology* 61: 131-148. Review.
- Tamayo R., Schild S., Pratt J.T., Camilli A (2008).** Role of cyclic di-GMP during *el tor* biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the *in vivo*-induced cyclic di-GMP phosphodiesterase CdpA. *Infections and Immunity* 76: 1617-1627.
- Tao F., He Y.W., Wu D.H., Swarup S., Zhang L.H (2010).** The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *Journal of Bacteriology* 192: 1020-1029.
- Tchigvintsev A., Xu X., Singer A., Chang C., Brown G., Proudfoot M., Cui H., Flick R., Anderson W. F., Joachimiak A., Galperin M. Y., Savchenko A., Yakunin A. F. (2010).** Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *Journal of molecular biology* 402: 524-538.
- Thoendel M. Horswill A.R (2010)** Biosynthesis of peptide signals in gram-positive bacteria. *Advances in applied microbiology* 71: 91-112.
- Thormann K.M., Duttler S., Saville R.M., Hyodo M., Shukla S., Hayakawa Y., Spormann A.M (2006).** Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *Journal of Bacteriology* 188: 2681-2691.
- Tran N.T., Den Hengst C.D., Gomez-Escribano J.P., Buttner M.J (2011).** Identification and characterization of CdgB, a diguanylate cyclase involved in developmental processes in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology* 193: 3100-3108.

- Urbietta M.S., González Toril E., Aguilera A., Giaveno M.A., Donati E (2012). First Prokaryotic Biodiversity Assessment Using Molecular Techniques of an Acidic River in Neuquén, Argentina. *Microbial Ecology*. DOI 10.1007/s00248-011-9997-2.
- Valdés J., Pedroso L., Quatrini R., Holmes D.S (2008). Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 94: 180-184.
- Valdés J., Ossandon F., Quatrini R., Dopson M., Holmes D.S (2011). Draft genome sequence of the extremely acidophilic biomining bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19377 provides insights into the evolution of the *Acidithiobacillus* genus. *Journal of Bacteriology* 193: 7003-7004.
- Wang Y.S., Pan Z.Y., Lang J.M., Xu J.M., Zheng Y.G (2007). Bioleaching of chromium from tannery sludge by indigenous *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Journal of Hazard Materials* 147:319-324.
- Wassmann P., Chan C., Paul R., Beck A., Heerklotz H., Jenal U., Schirmer T (2007). Structure of BeF₃-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* 15: 915-927.
- Watnick P., Kolter R (2000). Biofilms, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182: 2675-2679.
- Waters C.M., Lu W., Rabinowitz J.D., Bassler B.L (2008). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *Journal of Bacteriology* 190: 2527-2536.
- Weinhouse H., Sapir S., Amikam D., Shilo Y., Volman G., Ohana P., Benziman M (1997). c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Letters* 416: 207-211.
- Wilksch J.J., Yang J., Clements A., Gabbe J.L., Short K.R., et al (2011). MrkH, a Novel c-di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression. *PLoS Pathogens* 7: e1002204. doi:10.1371/journal.ppat.1002204
- Wolfe A.J., Visick K.L (2008). Get the Message Out: Cyclic-Di-GMP Regulates Multiple Levels of Flagellum-Based Motility. *Journal of Bacteriology* 190: 463-475.
- Xia L., Yin C., Dai S., Qiu G., Chen X., Liu J (2010). Bioleaching of chalcopyrite concentrate using *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in a continuous bubble column reactor. *Journal of Indian Microbiology and Biotechnology* 37: 289-295.
- Zhulin I.B., Nikolskaya A.N., Galperin M.Y (2003). Common Extracellular Sensory Domains in Transmembrane Receptors for Diverse Signal Transduction Pathways in *Bacteria* and *Archaea*. *Journal of Bacteriology* 185: 285-294.

7. ANEXOS

Tabla A1. Representación génica de la vía metabólica del c-di-GMP presentes en genomas pertenecientes a diferentes linajes de bacterias.

Bacteria	Phylum	GGDEF	EAL	HD-GYP	GGDEF/EAL	GGDEF/HD-GYP	Total
<i>Acidithiobacillus caldus</i> ATCC 51756	γ -Proteobacteria	9	3	-	6	-	18
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	γ -Proteobacteria	-	1	-	4	-	5
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	γ -Proteobacteria	32	10	14	13	-	69
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	α -Proteobacteria	14	1	1	13	-	29
<i>Aquifex aeolicus</i> VF5	Aquificae	7	4	-	4	1	16
<i>Bacillus anthracis</i> Ames	Firmicutes	3	1	1	6	-	11
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Firmicutes	3	1	-	4	-	8
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	Firmicutes	3	1	2	1	-	7
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Firmicutes	3	2	-	1	-	6
<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> HD100	δ -Proteobacteria	5	1	6	-	-	12
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama I	β -Proteobacteria	5	1	1	2	-	9
<i>Borrelia burgdorferi</i> B31	Spirochaetes	1	1	1	-	-	3
<i>Brucella melitensis</i> 16M	α -Proteobacteria	6	2	-	3	-	11
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	β -Proteobacteria	15	12	-	17	-	44
<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	α -Proteobacteria	4	3	-	7	-	14
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	β -Proteobacteria	27	10	11	16	-	64
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Firmicutes	7	1	9	3	-	20
<i>Clostridium difficile</i> 630	Firmicutes	18	1	-	18	-	37
<i>Clostridium tetani</i> E88	Firmicutes	6	1	1	-	-	8
<i>Deinococcus radiodurans</i> R1	Deinococcus-Thermus	12	1	4	4	-	21
<i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12	Dictyoglomi	7	-	6	-	2	15
<i>Dickeya dadantii</i> 3937	γ -Proteobacteria	12	4	-	2	-	18
<i>Escherichia coli</i> K-12	γ -Proteobacteria	12	10	-	7	-	29
<i>Geobacter uraniireducens</i> RF4	δ -Proteobacteria	17	2	15	1	-	35
<i>Gluconacetobacter xylinus</i> ATCC 10245	α -Proteobacteria	-	-	-	6	-	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 342	γ -Proteobacteria	14	12	7	1	-	34
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia 1	γ -Proteobacteria	8	2	-	11	-	21
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	Firmicutes	1	1	-	-	-	2
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	Firmicutes	3	3	-	-	-	6
<i>Magnetococcus marinus</i> MC-1	α -Proteobacteria	25	1	16	17	-	59
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	α -Proteobacteria	29	10	16	17	-	72
<i>Mesorhizobium loti</i> MAF303099	α -Proteobacteria	27	13	1	5	-	46
<i>Methylobacterium extorquens</i> PA1	α -Proteobacteria	17	4	6	14	-	41
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	Actinobacteria	2	1	-	1	-	4

Tabla A1. (Continuación).

Bacteria	Phylum	GGDEF	EAL	HD-GYP	GGDEF/EAL	GGDEF/HD-GYP	Total
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2 155	Actinobacteria	-	-	-	1	-	1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Actinobacteria	-	1	-	1	-	2
<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	δ -Proteobacteria	18	2	6	-	-	26
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	β -Proteobacteria	2	5	-	4	-	11
<i>Nostoc sp.</i> PCC 7120	Cyanobacteria	8	1	2	6	-	17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	γ -Proteobacteria	17	5	3	16	-	41
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PF-5	γ -Proteobacteria	21	4	1	19	-	45
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	γ -Proteobacteria	19	3	2	17	-	41
<i>Rhizobium leguminosarum</i> 3841	α -Proteobacteria	16	-	3	22	-	41
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	α -Proteobacteria	9	-	-	7	-	16
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	α -Proteobacteria	22	4	2	14	-	42
<i>Rickettsia prowazekii</i> Madrid E	α -Proteobacteria	1	1	-	-	-	2
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	γ -Proteobacteria	4	7	-	8	-	19
<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1	γ -Proteobacteria	30	5	9	22	-	66
<i>Shigella flexneri</i> 301	γ -Proteobacteria	3	6	-	4	-	13
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	α -Proteobacteria	5	4	-	10	-	19
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Actinobacteria	4	-	1	4	-	9
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301	Cyanobacteria	9	1	2	8	-	20
<i>Synechocystis sp.</i> PCC 6803	Cyanobacteria	13	5	2	9	-	29
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	Thermotogae	8	-	10	-	-	18
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	Deinococcus-Thermus	5	-	5	1	-	11
<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259	β -Proteobacteria	15	4	2	16	-	37
<i>Treponema pallidum</i> Nichols	Spirochaetes	1	-	3	-	-	4
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar El Tor N16961	γ -Proteobacteria	31	12	9	10	-	62
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC BAA-1116	γ -Proteobacteria	31	14	5	12	-	62
<i>Vibrio fischeri</i> ES114	γ -Proteobacteria	28	9	2	10	-	49
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	γ -Proteobacteria	28	14	5	15	-	62
<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	γ -Proteobacteria	46	14	13	18	-	91
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	ϵ -Proteobacteria	12	3	2	9	-	26
<i>Xanthomonas campestris</i> 8004	γ -Proteobacteria	21	4	3	10	-	38
<i>Xylella fastidiosa</i> 9a5c	γ -Proteobacteria	1	1	1	2	-	5
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> IP 32953	γ -Proteobacteria	3	3	1	3	-	10

Tabla A2. Cepas y plasmidios utilizados en este estudio

	<u>Característica</u>
Cepas bacterianas	
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	
DSM 9463	Colección DSMZ
<i>Escherichia coli</i>	
LMG194-pBAD24	Reservorio de pBAD24
JM109	Amplificación de vectores
<i>Salmonella</i> serovar Typhimurium	
UMR1	ATCC 14028-1s Nal ^R , wt
AdrA1f	UMR1 adra ⁻ , Kan ^R
MAE282	UMR1 yciR ⁻ , Cm ^R
Plasmidios	
pGEM-T Easy	Vector de amplificación, Amp ^R
pBAD24	Vector de expresión inducido por L-Arabinosa, Amp ^R

Tabla A3. (Continuación).

AthiA1 08224 F	ACGTCCTCAATCAGCCAC
AthiA1 08224 R	GCCGGTCTTGAGCTTCAAATAA
AthiA1 09870 F	ACGCAGCAATCTCTTCTGGT
AthiA1 09870 R	AAGCAAGCTTTCACGCAAAT
AthiA1 09875 F	ACATCCTGCCAGCTTATTGG
AthiA1 09875 R	ATGGGATGATCCTCTGTGTC
AthiA1 10484 F	CGAGTGGATTCATGTGAGTG
AthiA1 10484 R	GCCTCATCCAGAGTCAGACTATAC
AthiA1 12969 F	GGGTGTCGTGCTGTATCCTT
AthiA1 12969 R	ACGCTGATCTGCGAAGTTT
AthiA1 12974 F	GACCGGAGCTGATTATTGA
AthiA1 12974 R	ACATTCGTCCGGTACCTCTG
AthiA1 13196 F	ACCGAAACCGGATGTCATGT
AthiA1 13196 R	GCCAGAATGTCCTGACCAAT
AthiA1 13201 F	CTGGTCAAATCGAGGTCGT
AthiA1 13201 R	TTCTCTCCATCAGCACAG
AthiA1 14219 F	TGGCTGAGTTCATTGCTGAC
AthiA1 14219 R	TCGTCCAAATCCAGCATACA
AthiA1 14626 F	ATGCAGGATTCCAGATTGC
AthiA1 14626 R	TGAGTATGTCCCGCACAAAA
AthiA1 15675 F	CTGACTCGTCTACTGAGATT
AthiA1 15675 R	CAACATCTCACCACCAGAAC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTAGGTGACACTATAGAA
pBAD Forward	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pBAD Reverse	GATTTAATCTGTATCAGG