

VCH-FC  
MAG-B  
0668  
c.1



**Estudio de la expresión y funcionalidad de genes  
relacionados con la resistencia al cobre en una  
isla genómica de *A. ferrooxidans* ATCC 53993**

Tesis

Entregada a La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

**Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología.**

Facultad De Ciencias

Por

**Luis Humberto Orellana Retamal**

Agosto, 2011

Director de Tesis: **Dr. Carlos Jerez Guevara**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

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

**LUIS HUMBERTO ORELLANA RETAMAL**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con Mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 27 de julio del 2011

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez Guevara

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Francisco Chávez

Dr. Nicolás Guiliani





*A Cecilia con cariño,*



## Agradecimientos

Quisiera agradecer al Dr. Carlos Jerez por la oportunidad de realizar mi tesis de pregrado y magister en su laboratorio. Su espíritu crítico y pasión por la investigación científica serán un inspiración que me acompañará en el futuro.

A don Juan Araos, quien mas allá de hacer posible el trabajo diario en el laboratorio, me entregó enseñanzas y una mirada única de la vida.

A mis compañeros de laboratorio que fueron un complemento importante en este etapa: Andrés, Cecilia, Camilo, Rodrigo, Matías, Cristóbal, Sebastián, Macarena, Daniela, Juan Pablo, Josefina y a Ricardo. En forma especial a Claudio, quien siempre me ofreció los mejores consejos mas allá de las pipetas.

A mi familia: Cecilia, Humberto, Camila, primas, primos, tíos, tías. Pero en forma especial a mi Mamá, quien siempre me ha dado su apoyo para realizar mis sueños.

A mis amigas de la vida Sofía y María José.

y a Alissa, quien me dio su apoyo incondicional durante este periodo. Su amor, paciencia y compañía complementaron en forma única esta experiencia.

## Índice de materias

1	Introducción .....	1
1.1	Metales pesados en bacterias.....	1
1.2	Toxicidad del Cu en los microorganismos.....	2
1.3	Homeostasis y resistencia al Cu en <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato.....	3
1.3.1	Eflujo del Cu citoplasmático hacia el periplasma a través de ATPasas de Cu .....	3
1.3.2	Transporte de Cu desde el citoplasma y periplasma hacia el espacio extracelular: participación del sistema Cus.....	5
1.3.3	Oxidación del Cu periplásmico por CueO.....	5
1.3.4	Plásmidos relacionados con la resistencia a Cu. <i>Pseudomonas syringae</i> pv tomato .....	6
1.4	Resistencia al Cu en <i>A. ferrooxidans</i> .....	7
1.5	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993.....	9
1.6	Transferencia horizontal y elementos de inserción en bacterias.....	10
1.7	Islas genómicas en cepas de <i>A. ferrooxidans</i> .....	11
2	Materiales y métodos.....	14
2.1	Cepas .....	14
2.2	Plásmidos .....	14
2.3	Condiciones de cultivo.....	16
2.4	Técnicas de Biología Molecular.....	17
2.4.1	Extracción de DNA .....	17

2.4.2	Purificación de plásmidos de DNA.....	17
2.4.3	Cuantificación del DNA.....	18
2.4.4	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	18
2.4.5	Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR.....	18
2.4.6	Diseño de oligonucleótidos para las reacciones de PCR y PCR en tiempo real .....	19
2.4.7	Reacciones de PCR .....	19
2.4.8	Reacciones de PCR en tiempo real.....	20
2.4.9	Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real.....	21
2.4.10	Cuantificación específica de las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 de <i>A. ferrooxidans</i> crecidas en mezcla.....	22
2.4.11	Amplificación específica de genes desde el DNA genómico de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993.....	22
2.4.12	Clonamiento de genes en el vector pBAD-TOPO .....	23
2.4.13	Transformación de cepas de <i>E. coli</i> .....	24
2.4.14	Análisis de colonias transformantes. ....	25
2.5	Técnicas con RNA.....	26
2.5.1	Extracción del RNA total.....	26
2.5.2	Electroforesis de RNA en geles de agarosa.....	27
2.5.3	Cuantificación del RNA.....	27
2.5.4	Transcripción inversa.....	28
2.6	Técnicas microbiológicas .....	28
2.6.1	Halos de inhibición.....	28
2.6.2	Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de Cu para algunas cepas de <i>E. coli</i> .....	29

2.7	Métodos informáticos .....	29
2.7.1	Comparación informática de las secuencias analizadas .....	29
3	Resultados .....	31
3.1	Características de la isla genómica de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 .....	31
3.2	Determinantes de resistencia al Cu en ambas cepas de <i>A. ferrooxidans</i> .....	33
3.3	Análisis de los determinantes de resistencia al Cu adicionales de la cepa ATCC 53993.....	34
3.3.1	ATPasas de Cu y metales pesados.....	34
3.3.2	Sistemas de eflujo de metales tipo Cus y chaperonas de Cu .....	35
3.4	Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53393 en presencia de Cu .....	36
3.5	Comparación de la expresión de los determinantes de resistencia al cobre entre <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993.....	39
3.5.1	Partidores exclusivos de la IG de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 .....	39
3.5.2	Diseño de partidores comunes para ambas cepas de <i>A. ferrooxidans</i> .....	42
3.6	Estudio de la expresión de los genes relacionados con la resistencia al Cu en <i>A. ferrooxidans</i> .....	44
3.7	Funcionalidad de genes relacionados con las resistencia al Cu encontrados en la IG de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 .....	46
4	Discusión .....	49
4.1	Isla genómica en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 .....	49
4.2	Comparación de los perfiles de expresión genética de los determinantes de resistencia al Cu encontrados en ambas cepas de <i>A. ferrooxidans</i> .....	51
4.3	Expresión heteróloga de CopA <sub>3Af</sub> , CusF <sub>3Af</sub> y CusF <sub>4Af</sub> en cepas de <i>E. coli</i> sensibles al Cu .....	54

4.4	Proyecciones .....	55
5	Conclusiones .....	57
6	Bibliografía .....	58
7	Anexos .....	62

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Características de los genomas de las cepas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993. ....	<b>9</b>
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>E. coli</i> utilizadas en la presente tesis. ....	<b>14</b>
<b>Tabla 3.</b> Plásmidos utilizados para la evaluación de la funcionalidad de algunos genes de la IG en <i>E. coli</i> .....	<b>15</b>
<b>Tabla 4.</b> Comparación de los determinantes de resistencia al Cu presentes en ambas cepas de <i>A. ferrooxidans</i> . ....	<b>34</b>
<b>Tabla 5.</b> Dominios y motivos de las ATPasas de Cu encontrados en <i>A. ferrooxidans</i> comparados con transportadores de este metal caracterizados para otras bacterias Gram-negativas. ....	<b>35</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Homeostasis del Cu en <i>E. coli</i> .....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Homeostasis del Cu en <i>P. syringae</i> .....	<b>7</b>
<b>Figura 3.</b> Alineamiento completo de los genomas de las cepas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993.....	<b>32</b>
<b>Figura 4.</b> Alineamiento de un fragmento de las secuencias aminoacídicas de las chaperonas de Cu de <i>A. ferrooxidans</i> con alta identidad a CusF de <i>E. coli</i> .....	<b>36</b>
<b>Figura 5.</b> Curvas de crecimiento para <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 en presencia de Cu.....	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b> Cultivos de mezclas de cepas de <i>A. ferrooxidans</i> en ausencia y presencia de Cu.....	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Diseño y prueba de partidores específicos para la ATPasa de Cu <i>copA3<sub>Af</sub></i> (Lerr0167).....	<b>40</b>
<b>Figura 8.</b> Diseño y prueba de partidores específicos para la chaperona de Cu <i>cusF4<sub>Af</sub></i> (Lerr0199).....	<b>42</b>
<b>Figura 9.</b> Diseño y prueba de partidores específicos para las ATPasas de Cu <i>copA1<sub>Af</sub></i> y <i>copA2<sub>Af</sub></i> .....	<b>43</b>
<b>Figura 10.</b> Inducción relativa de la expresión transcripcional de algunos genes relacionados con la resistencia al Cu en las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 de <i>A. ferrooxidans</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 11.</b> PCR anidado para la amplificación específica de los genes <i>copA3<sub>Af</sub></i> , <i>cusF3<sub>Af</sub></i> , <i>cusF4<sub>Af</sub></i> , <i>copA2<sub>Af</sub></i> y <i>copA1<sub>Af</sub></i> .....	<b>46</b>

**Figura 12.** Halos de inhibición para *E. coli* TOP10 transformada con el vector pBAD-TOPO que llevan los genes *cusF3<sub>Af</sub>*, *cusF4<sub>Af</sub>* o *copA3<sub>Af</sub>* .....47

**Figura 13.** Determinación de la MIC a Cu las cepas de *E. coli* K12  $\Delta copA$  y  $\Delta cueO$   $\Delta cusCFBA$  transformadas con el vector pBAD-TOPO que expresa *copA3<sub>Af</sub>*, *cusF3<sub>Af</sub>* o *cusF4<sub>Af</sub>*.....48

## Lista de abreviaturas

<b>ATCC</b>	American type culture collection (Colección americana de cultivos por tipo)
<b>CT</b>	Ciclo de PCR en el cual se sobrepasa el nivel umbral de fluorescencia.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>LB</b>	Medio de crecimiento Luria Bertani
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information (Centro internacional de información en Biotecnología)
<b>ORF</b>	Open reading frame (Marco abierto de lectura)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Polymerase Chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>Poli-P</b>	Polifosfatos inorgánicos
<b>RT-PCR</b>	Transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa
<b>TAE</b>	Tris-acetato de sodio

## Resumen

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una  $\gamma$ -proteobacteria, Gram-negativa, quimiolitotrófica, capaz de crecer en ión ferroso y una variedad de compuestos reducidos de azufre como fuentes de energía. Estas capacidades permiten a *A. ferrooxidans* participar, junto a otros microorganismos, en los procesos de la biominería para la extracción de cobre (Cu) y otros metales. Este acidófilo además puede ser adaptado al crecimiento con más de 200 mM de CuSO<sub>4</sub>. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos que posee esta bacteria para la resistencia a este metal. Nuestro grupo ha propuesto un mecanismo de resistencia al Cu para *A. ferrooxidans* ATCC 23270 basado en el metabolismo de los polifosfatos y también en la participación de proteínas que permiten la salida directa del metal desde el citoplasma y periplasma hacia el exterior.

*A. ferrooxidans* ATCC 53993 posee en su genoma una región exclusiva de alrededor 160 kb clasificada como isla genómica (IG), la cual está ausente en la cepa ATCC 23270. Esta IG contiene, entre otros genes, distintos marcos abiertos de lectura codificantes para determinantes de Cu adicionales a los encontrados y compartidos con la cepa ATCC 23270. Entre ellos están una ATPasa de Cu y un sistema de eflujo de Cu tipo Cus. Cuando se comparó la capacidad de ambas cepas de *A. ferrooxidans* para crecer en un medio con Cu (no adaptadas previamente al crecimiento con este metal), la cepa ATCC 53993 resultó tener una mayor resistencia al metal (>100 mM CuSO<sub>4</sub>) que la cepa ATCC 23270 (<25 mM CuSO<sub>4</sub>). También, cuando se mezclaron cantidades similares de cada cepa en un medio en ausencia de Cu, la cantidad relativa del número de microorganismos de cada cepa se mantuvo similar. Sin embargo, cuando la misma mezcla se creció en un medio en presencia de 50 mM de CuSO<sub>4</sub>, la

cepa ATCC 53993 resultó ser la cepa predominante al final del crecimiento del cultivo. Esta gran diferencia de resistencia al Cu probablemente se explica por la presencia de determinantes genéticos adicionales de resistencia al Cu presentes en la cepa ATCC 53993. La sobreexpresión de algunos de estos genes se confirmó mediante qRT-PCR. Además, estos genes resultaron ser funcionales ya que cuando se expresaron heterológamente en una cepa de *E. coli* sensible al Cu, aumentaron su resistencia al metal. Estos resultados sugieren fuertemente que las diferencias en la resistencia al Cu en dos cepas del mismo microorganismo acidófilo pueden estar determinadas por pequeñas diferencias en sus genomas. Estas diferencias genéticas presentes en una IG, le otorgarían al microorganismo que la posee una mejor capacidad para adaptarse al ambiente extremo donde se desarrollan.

## Abstract

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a  $\gamma$ -proteobacteria, Gram-negative, acidophilic chemolithoautotroph that can grow in ferrous iron and reduced sulfur species as energy sources. These capacities allow *A. ferrooxidans*, together with other microorganisms, to participate in biomining processes for the extraction of copper (Cu) and other metals. This microorganism can be also adapted to grow in the presence of more than 200 mM of Cu. However, very little is known about the mechanisms that this acidophile uses to resist the presence of this metal. Our group has suggested copper resistance mechanisms for *A. ferrooxidans* ATCC 23270 based in poly-P metabolism and also through the participation of several proteins that allow the direct exit of metal from the cytoplasm and periplasma to the exterior of the cell.

*A. ferrooxidans* ATCC 53993 possesses in its genome a region of around 160 kb, termed a genomic island (GI), which is absent in strain ATCC 23270. This GI contains, amongst other genes, several open reading frames coding for additional copper resistance determinants, which are also found in *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Amongst these Cu-resistance determinants, a putative copper-ATPase and a Cus system are found. Furthermore, when comparing the capacity of these two *A. ferrooxidans* strains (not previously adapted to copper) to grow in the presence of  $\text{CuSO}_4$ , strain ATCC 53993 had a much higher resistance to copper (>100 mM) than that of strain ATCC 23270 (<25 mM). In addition, when similar amounts of bacteria from each strain were mixed and allowed to grow in the absence of copper, their respective final numbers remained relatively equal. On the other hand, in the presence of copper, there was a clear overgrowth of strain ATCC 53993 compared to ATCC 23270. This great difference in Cu resistance is most likely explained by the presence of the

additional copper-resistance genes in the GI of strain ATCC 53993. As determined by qRT-PCR, these genes were up-regulated when *A. ferrooxidans* ATCC 53993 was grown in the presence of copper and were shown to be functional when expressed in copper-sensitive *E. coli* mutants. These results strongly suggest that the grounds for resistance to copper of two strains of the same acidophilic microorganism could be determined by slight differences in their genomes. These genetic differences present in the GI, could give these microorganisms a better capacity to adapt to their extreme environment.

## 1 Introducción

Los microorganismos acidófilos se encuentran en distintos ambientes biogeoquímicos naturales. Ejemplos de estos ambientes son aquellos donde ocurre lixiviación o solubilización bacteriana de minerales. Estos ambientes se caracterizan por tener muy bajos valores de pH (1-3) y altas concentraciones de metales pesados (Dopson y col., 2003). Este proceso de lixiviación bacteriana es desarrollado por comunidades de microorganismos que han participado en el depósito y solubilización de metales pesados en la tierra por millones de años. Esta habilidad para solubilizar metales ha dado paso a la industria de la biominería. Este proceso se utiliza industrialmente para la recuperación de metales como el cobre (Cu), cobalto, níquel, zinc y uranio, los que son extraídos a partir de sulfuros insolubles (Rohwerder y col., 2003).

Se ha reportado que los microorganismos que participan en los procesos de biolixiviación poseen altos niveles de resistencia a distintos metales pesados (Johnson y Hallberg, 2003; Orell y cols., 2010). Entre ellos destaca *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

*A. ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa, quimiolitotrófica, capaz de utilizar el ion ferroso y una variedad de compuestos reducidos de azufre como fuentes de energía (Valenzuela y cols., 2006). Este microorganismo además puede ser adaptado para crecer en altas concentraciones de distintos metales pesados y en el caso particular del Cu se ha descrito que puede crecer con más de 200 mM de  $\text{CuSO}_4$  en el medio de crecimiento (Harvey y Crundwell, 1996).

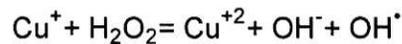
### 1.1 Metales pesados en bacterias

Existen metales que son esenciales e indispensables para el desarrollo de los organismos. Sin embargo, a una alta concentración, estos pueden ser tóxicos. Algunos

de estos metales son el cobalto (Co [II]), cobre (Cu [II]), níquel (Ni [II]) y el Zinc (Zn [II]). Pese a su toxicidad, estos metales pueden acumularse al interior de las células por sobre los niveles fisiológicos normales debido a la acción de sistemas de transporte que funcionan inespecíficamente. Estas vías son responsables de un ingreso no controlado de metales pesados al interior de la célula, generándose de este modo una "compuerta abierta" al espacio intracelular y/o periplásmico de estos microorganismos (Nies, 1999; Dopson y cols., 2003).

## 1.2 Toxicidad del Cu en los microorganismos

Aunque no se conoce la forma exacta por la que el Cu es tóxico para las células, se cree que posiblemente es por la producción de hidroxilos y radicales ( $\text{OH}\cdot$ ) en una reacción de tipo Fenton:



El radical hidroxilo es extremadamente reactivo y puede participar en distintas reacciones perjudiciales para las moléculas celulares, como por ejemplo, la oxidación de proteínas y lípidos (Magnani y Solioz, 2007). Por otro lado, el Cu puede ser tóxico debido a su unión espontánea a proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos. Esto provoca el desplazamiento de metales nativos desde estas estructuras, lo que consecuentemente lleva a alteraciones en su función. Además, pareciera ser que el Cu es mas tóxico en condiciones anaeróbicas, posiblemente debido a la reducción del Cu (II) a Cu (I). Esta forma puede difundir por la membrana citoplasmática causando una mayor acumulación de Cu al interior de la célula. Por tanto, no resulta difícil pensar, que junto con el uso del Cu en los metabolismos bacterianos, también surgieron mecanismos que permitiesen regular y mantener un nivel adecuado del metal en los distintos organismos.

### 1.3 Homeostasis y resistencia al Cu en *Escherichia coli* y *Pseudomonas syringae* pv tomato

A la fecha, los mecanismos descritos para la homeostasis y resistencia al Cu en bacterias Gram-negativas, se han reportado con mayor detalle en *E. coli* y *P. syringae* pv tomato.

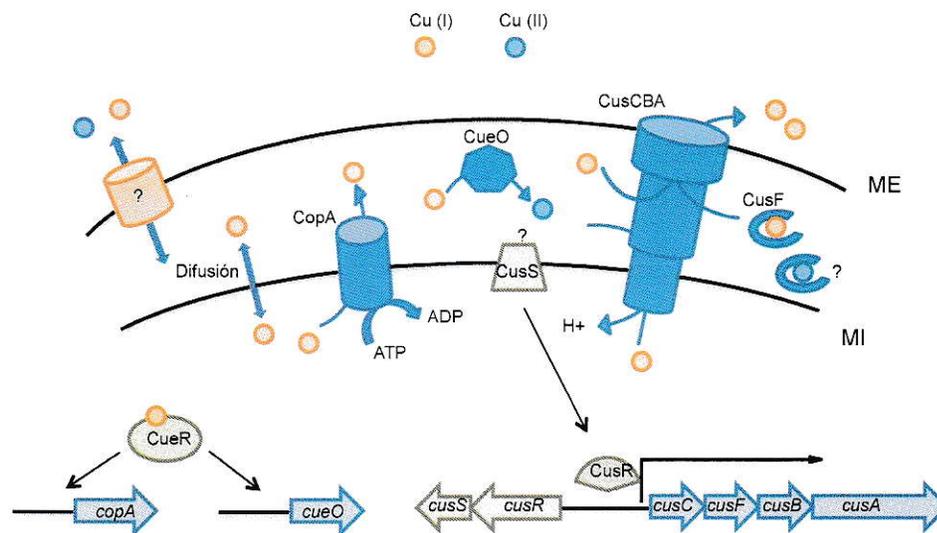
*E. coli* es una bacteria neutrófila que vive en los tractos digestivos de animales de sangre caliente. Se ha reportado que la concentración de Cu en el duodeno y estómago de estos animales podría alcanzar hasta los 10  $\mu\text{M}$  (Rensing y Grass, 2003). *P. syringae* pv tomato es una bacteria que se aisló por ser resistente al Cu durante la eliminación de patógenos en tomates infectados con distintos microorganismos.

#### 1.3.1 Eflujo del Cu citoplasmático hacia el periplasma a través de ATPasas de Cu

Las ATPasas de Cu están localizadas en la membrana interna de algunas bacterias y transportan Cu(I) desde el citoplasma al espacio periplasmático (o viceversa) a expensas de la hidrólisis del ATP. Estas proteínas pertenecientes a un subgrupo de las ATPasas tipo P se caracterizan por el transporte de metales pesados como el  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  a través de membranas biológicas y conservan un aminoácido (aspártico) en el dominio de fosforilación (Argüello y col., 2007). Constan de 8 segmentos de transmembrana del tipo  $\alpha$ -hélice. En estas proteínas existen dominios conservados de unión a ATP (GDGIN), fosforilación (DKTGT) y dominios fosfatasas (TGE). También tienen dos motivos de unión a metales CxxC en la región N-terminal. Sin embargo, se ha visto que este último dominio no es requerido para su función y aparentemente no confiere especificidad al metal (Magnani y Solioz, 2007). Otro motivo importante se encuentra en una  $\alpha$ -hélice de transmembrana y está relacionado con la especificidad al metal transportado por estas ATPasas. En este motivo denominado

“CPx” es común encontrar que el aminoácido próximo a la prolina varíe según la especificidad al metal. En proteínas transportadoras de Cu es característico encontrar el motivo **CPCALGLA**. Otras de las características comunes entre estas ATPasas son el motivo HP. Éste se encuentra cercano al sitio de unión de ATP y su función hasta hoy es desconocida (Solioz y Stoyanov, 2003).

En *E. coli* se ha descrito a CopA como una proteína que transporta Cu desde el espacio intracelular hacia el periplasma. La expresión de *copA* es regulada por CueR, un factor de transcripción inducido por Cu (I) y Ag (I). La expresión de este regulador es requerida para la resistencia al Cu durante el crecimiento de *E. coli* (Stoyanov y col., 2001) (Figura 1).



**Figura 1. Homeostásis del Cu en *E. coli*.** Este metal llega al espacio periplasmático probablemente a través de porinas ubicadas en la membrana externa. CueR es una proteína citoplasmática que se activa en presencia de Cu e induce la expresión de *copA* y *cueO*. CopA es una ATPasa de Cu que bombea Cu (I) hacia el espacio periplasmático desde el citoplasma. Acá el metal puede ser oxidado a Cu (II) por la oxidasa de Cu CueO. El sistema de dos componentes CusRS regula la expresión del operón *cus*. Este operón codifica el sistema de eflujo CusCFBA que saca el Cu directamente desde el citoplasma hacia el espacio extracelular. Figura modificada de Rensing y Grass (2003).

### **1.3.2 Transporte de Cu desde el citoplasma y periplasma hacia el espacio extracelular: participación del sistema Cus**

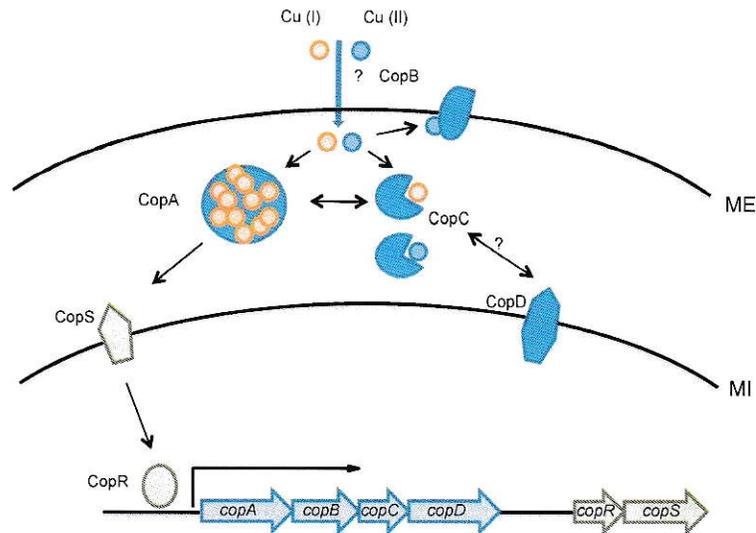
El sistema Cus se ha descrito en *E. coli* como una vía que transporta metales directamente desde el citoplasma al espacio extracelular usando la fuerza protón motriz como fuente de energía. En este microorganismo, los determinantes Cus están organizados en los operones *cusRS* y *cusCFBA*, siendo transcritos en sentidos opuestos. El operón *cusRS* codifica para un sistema de regulación de dos componentes, la histidina quinasa CusS y el regulador transcripcional CusR. Los genes *cusCFBA* codifican distintas proteínas que conforman un sistema de eflujo de Cu intracelular y periplasmático. Este mecanismo consiste de una bomba de membrana interna, CusA que pertenece a la superfamilia RND (resistencia, nodulación y división celular); una proteína de membrana de fusión (MFP), CusB y un factor de membrana externo (OMF) que forma un canal para el tráfico desde el espacio periplásmico, CusC. Además, en este operón Cus está codificada la proteína CusF, una chaperona de Cu periplasmática, que probablemente media la transferencia de Cu desde el espacio periplasmático (Franke y col., 2003) (Figura 1).

### **1.3.3 Oxidación del Cu periplásmico por CueO**

CueO es una oxidasa de Cu periplasmática que está relacionada con la resistencia al Cu en *E.coli*. Esta proteína participa en la oxidación del Cu (I) a Cu (II), cambiando la oxidación del metal a un estado menos tóxico. Su expresión, al igual que CopA, está regulada por CueR y se ha demostrado que ambos genes comparten características comunes en la secuencia del promotor (Magnani y Solioz, 2007) (Figura 1).

#### 1.3.4 Plásmidos relacionados con la resistencia a Cu. *Pseudomonas syringae* *pv* *tomato*

Un sistema de resistencia asociada a plásmidos se encontró por primera vez en *Pseudomonas syringae pv tomato*. La resistencia a Cu reside en el operón *copABCDRS* dentro del plásmido pPT23D. A diferencia de los otros mecanismos, este sistema se basa en la retención del Cu y no en la eliminación hacia el medio externo. De hecho, estas bacterias son capaces de acumular hasta un 12% de su peso seco en Cu. Aunque el mecanismo exacto por el cual estas proteínas estarían relacionadas con la resistencia a Cu es desconocido, se cree que este mecanismo une Cu periplasmático a través de las proteínas CopC, CopD, CopA y CopB. Esta última proteína retiene Cu en la membrana externa, mientras que CopC transfiere el metal hacia CopD o CopA. Esta última es una chaperona y oxidasa de Cu que es capaz de unir hasta 11 átomos de Cu en su estructura. La forma apo-CopA puede recibir Cu desde CopD, pero no se sabe exactamente si el metal pasa por el periplasma. En la regulación de este sistema participa CopS, que detecta el Cu periplasmático a través de una posible interacción con las proteínas CopA y CopC. Esta señal es transmitida a CopR la cual induce la expresión del operón *copABCD* (Puig y Rees, 2002) (Figura 2).



**Figura 2. Homeostasis del Cu en *P. syringae*.** El Cu entra al espacio periplasmático de una manera no conocida. CopC une este metal y lo puede transportar directamente a CopD. Además CopA puede unir y oxidar Cu en sus 11 sitios de unión. El Cu también puede ser capturado en la membrana externa por CopB. CopD entregaría este metal a Apo-CopA y no necesariamente a través de intermediarios citoplasmáticos. En la membrana interna CopS sentiría el Cu por una posible interacción con las proteínas CopA y CopC. Esta señal sería enviada a CopR lo que induciría la expresión del operón *copABCD*. Figura modificada de Puig y Rees (2002).

#### 1.4 Resistencia al Cu en *A. ferrooxidans*

En la actualidad, se sabe muy poco de los mecanismos que poseen los microorganismos acidófilos para la resistencia a metales pesados. En 1998, se reportó que una cepa de *A. ferrooxidans* aislada desde una mina de Cu en Malanjhand (India), cuando se cultiva en presencia de Cu en el medio se encontraron diferencias a nivel químico de la membrana, lo que se atribuye a un cambio de las proteínas que la constituyen (Das y col., 1998).

También se ha reportado que cuando una cepa de esta bacteria aislada desde una mina de Cu y Ni, se expone a Cu (II) hay una disminución en el número de copias de plásmidos en la célula. Sin embargo, se evidencia un aumento del número de copias de éste cuando se crece en ausencia de este metal. En este mismo trabajo se observó

que cuando se complementa una cepa de *E. coli* con fragmentos de estas estructuras no hay aumento de la resistencia de esta bacteria al Cu. Esto sugiere que los genes relacionados con la resistencia a este metal están codificados en el cromosoma de la bacteria y no en estructuras extracromosomales (Chisholm y col., 1998). Por otra parte, se ha visto que en experimentos de RT-PCR con partidores al azar, al menos 17 genes muestran un aumento de la transcripción cuando esta bacteria se crece en un medio con Cu. Sin embargo, ninguno de estos genes tiene una relación directa con el metabolismo de este metal y su papel estaría ligado a una respuesta indirecta al estrés en esta bacteria (Paulino y col., 2002). Recientemente también se ha relacionado la resistencia al Cu con sistemas de comunicación bacteriana (Wenbin y cols., 2011)

Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo de resistencia al Cu basado en el metabolismo de los polifosfatos (Álvarez y Jerez, 2004). Se demostró que cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se crece en presencia de Cu existe degradación de polifosfatos y eflujo de fosfato. Los monómeros de fosfato generados se unirían al Cu dentro del citoplasma de la bacteria. Posteriormente, este metal-fosfato sería bombeado fuera de la célula por transportadores de fosfato inorgánico, de manera muy similar al sistema propuesto en *E. coli* (Keasling, 1997; van Veen, 1997).

Nuestro grupo hizo una búsqueda de posibles determinantes de resistencia a Cu en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y comprobó que éstos aumentan su expresión genética cuando esta bacteria crece en presencia del metal. Además, se demostró que la expresión heteróloga de algunos de estos determinantes aumentan la resistencia al Cu de cepas de *E. coli* sensibles a este metal (Navarro y cols., 2009).

Como resultado de este trabajo, se propuso que parte de la alta resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* se debe a sistemas de eflujo del metal desde el espacio intracelular y periplasmático a través de un sistema de eflujo de Cu (tipo Cus). Por otro

secuestro del Cu a través de chaperonas de Cu como CusF<sub>Af</sub> y CopC<sub>Af</sub> (Navarro y cols., 2009).

### 1.5 *A. ferrooxidans* ATCC 53993

A la fecha, existe una segunda cepa de *A. ferrooxidans* secuenciada por el DOE Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>). Esta cepa denominada *A. ferrooxidans* ATCC 53993 fue aislada de depósitos de Cu en Armenia.

Las secuencias de los genomas de ambas cepas de *A. ferrooxidans*, nos permitió realizar comparaciones a nivel informático. En la tabla 1 se muestra un resumen con las características principales de los genomas de cada cepa.

**Tabla 1. Características de los genomas de las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993.** Para la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 23270, los datos se obtuvieron desde la base de datos del Comprehensive Microbial Resources (<http://cmr.jcvi.org/>), mientras que para la cepa ATCC 53993 se obtuvieron desde DOE Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>).

	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270		<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993	
Tamaño	2.982.397 bp		2.885.038 bp	
Porcentaje G:C	58,77%		58,85%	
N° total genes	3303	100%	2951	100%
Genes codificantes de proteínas	3219	97,45%	2899	98,24%
Genes hipotéticos	757	23,51%	880	29,82%
Genes t-RNA	78	2,36%	46	1,56%
Genes rRNA	6	0,18%	6	0,2%

Además, cabe señalar que ambas cepas presentan un 80,5% de similitud al realizar un alineamiento completo entre ambos genomas (correspondiente al pan-genoma). Esta diferencia se debe mayormente a la presencia de regiones de DNA exclusivas, correspondiente a islas genómicas (IG) encontradas en cada cepa de *A. ferrooxidans*.

## 1.6 Transferencia horizontal y elementos de inserción en bacterias

En procariontes, y a diferencia de organismos eucariontes, gran parte de la variabilidad genética se logra a través de mutaciones puntuales, rearrreglos en el genoma y por transferencia horizontal de genes (THG). La THG se produce por transducción, transformación o conjugación entre bacterias y ha resultado clave para la evolución de los microorganismos. Esto se debe a que esta información genética externa puede codificar para nuevas características que pueden resultar en una ventaja adaptativa para el microorganismo receptor.

En general, los fragmentos de DNA que se han transferido desde una bacteria dadora a una receptora y que además poseen los genes que codifican para los mecanismos necesarios para su propia conjugación, se engloban en una definición más amplia denominada "integrative and conjugative elements" (ICE) (Frost y cols., 2005). Bajo ciertas condiciones, estos elementos pueden escindirse del cromosoma, replicarse e integrarse en un huésped. A diferencia de los plásmidos, estas estructuras no se mantienen extracromosomalmente. Bajo la categoría de ICE, también están las IG.

En la actualidad se sabe muy poco del origen de las IG, pero se cree que derivan de plasmidios integrativos o fagos que perdieron los genes necesarios para su propia replicación o transferencia, a cambio de una asociación más estable y heredabilidad al residir en el cromosoma bacteriano (Dobrindt y cols., 2004).

Las IG corresponden a regiones del cromosoma que varían entre los 10 y 200 kb (Juhas y cols., 2008) y que son una fuente flexible de genes en el cromosoma bacteriano. Entre otras características, las IG tienen un contenido G:C menor al resto del genoma. Además, generalmente están insertas río abajo de genes de tRNA. Además, en esta región del DNA es posible encontrar genes homólogos a enzimas

recombinasas. Estas proteínas pueden ser de las familias de la tirosina o serina recombinasas (Smith y Thorpe, 2002). Sin embargo, la mayor parte de las recombinasas encontradas en IG (o ICEs en general) corresponden a la familia de las tirosina recombinasas (Wozniak y Waldor, 2010). También es posible encontrar una serie de elementos de inserción (IS) y transposones junto a genes relacionados con los mecanismos de conjugación, que son necesarios para la integración y escisión del cromosoma bacteriano. Estos elementos dan la posibilidad de transferencia de genes a otros microorganismos. Además, en esta región es posible encontrar genes que aumentan la adaptabilidad y versatilidad del microorganismo, pudiéndose clasificar como de patogenicidad (cuando causan enfermedad en los huéspedes), metabólicas (cuando otorgan la capacidad de usar fuentes alternativas de carbono o nitrógeno) o de resistencia (cuando otorgan resistencia a metales o antibióticos) entre otras (Boyd y cols., 2008).

### **1.7 Islas genómicas en cepas de *A. ferrooxidans***

Se ha propuesto que las regiones exclusiva de DNA encontrada en ambas *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y *A. ferrooxidans* ATCC 23270 corresponderían a islas genómicas (IG) (Valdés y cols., 2010). La IG de la cepa ATCC 53993 contiene genes putativos para la resistencia a metales, entre ellos el Cu (Valdés y cols., 2010; Orell y cols., 2010). Debido a que esta región de DNA está ausente en la cepa ATCC 23270, la cepa ATCC 53993 debiera ser mas resistente que la primera a la presencia de metales como el Cu.

Es en este contexto de las diferencias genéticas encontradas entre ambas cepas que resulta interesante estudiar si los posibles determinantes de resistencia al Cu encontrados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 también estarían

relacionados con los mecanismos de resistencia a este metal. De esta forma, es probable que esta región exclusiva de la cepa ATCC 53993 corresponda a una isla de resistencia a metales.

### **Hipótesis de trabajo.**

La expresión de genes adicionales relacionados con la resistencia al Cu presentes en una isla genómica exclusiva de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, le otorgan a esta cepa una mayor resistencia al metal comparada con la cepa ATCC 23270, carente de este elemento genético.

#### ***Objetivo general***

Estudiar la expresión y funcionalidad de los posibles determinantes de resistencia al Cu encontrados en una IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993.

#### ***Objetivos específicos***

1. Análisis informático para dilucidar las características genéticas y de secuencia aminoacídica de los posibles determinantes de resistencia al Cu presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 53993.
2. Determinar la capacidad de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 para crecer en presencia de Cu y comprobar la expresión de los posibles determinantes de resistencia a Cu exclusivos de esta cepa.
3. Comparar la resistencia al Cu entre *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y *A. ferrooxidans* ATCC 53993.
4. Establecer la funcionalidad de los posibles determinantes de resistencia al Cu encontrados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Cepas

Para la realización de esta tesis, se utilizaron las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993, ambas obtenidas desde la colección americana por tipo (ATCC, USA). Para los experimentos de expresión heteróloga de algunas de las proteínas encontradas en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, se utilizó *E. coli* K12 (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas de *A. ferrooxidans* y *E. coli* utilizadas en la presente tesis.

Cepa	Características	Referencia
<i>A. ferrooxidans</i>	ATCC 23270	ATCC
<i>A. ferrooxidans</i>	ATCC 53993	ATCC
<i>E. coli</i> K12	ATCC 29425	ATCC
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara -leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str<sup>R</sup>) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
$\Delta$ <i>copA</i>	Derivada de la K12 que carece del gen <i>copA</i>	Laboratorio
$\Delta$ <i>copA</i> /pBAD	Cepa $\Delta$ <i>copA</i> con el plásmido pBAD	Este trabajo
$\Delta$ <i>copA</i> /pBAD <i>copA</i> <sub><i>E. coli</i></sub>	Cepa $\Delta$ <i>copA</i> con el plásmido pBAD/ <i>copA</i>	Este trabajo
$\Delta$ <i>copA</i> /pBAD <i>copA</i> 3 <sub><i>Af</i></sub>	Cepa $\Delta$ <i>copA</i> con el plásmido pBAD/ <i>copA</i> 3 <sub><i>Af</i></sub>	Este trabajo
$\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i>	Derivada de la K12 y carece del operón <i>cusCFBA</i> y el gen <i>cueO</i>	Laboratorio
$\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> / pBAD	Cepa $\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> con el plásmido pBAD	Este trabajo
$\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> / <i>cusF</i>	Cepa $\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> con el plásmido pBAD / <i>cusF</i>	Este trabajo
$\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> / <i>cusF</i> 3 <sub><i>Af</i></sub>	Cepa $\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> con el plásmido pBAD/ <i>cusF</i> 3 <sub><i>Af</i></sub>	Este trabajo
$\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> / <i>cusF</i> 4 <sub><i>Af</i></sub>	Cepa $\Delta$ <i>cusCFBA</i> $\Delta$ <i>cueO</i> con el plásmido pBAD / <i>cusF</i> 4 <sub><i>Af</i></sub>	Este trabajo

### 2.2 Plásmidos

Un resumen de los plásmidos usados en este trabajo se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3. Plásmidos utilizados para la evaluación de la funcionalidad de algunos genes de la IG en *E. coli*.**

Plásmido	Características principales	Referencia
pBAD-TOPO	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> .	Invitrogen
pBAD / <i>cusF</i>	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> , <i>cusF</i> ( <i>E. coli</i> K12)	Este trabajo
pBAD / <i>copA</i>	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> , <i>copA</i> ( <i>E. coli</i> K12)	Este trabajo
pBAD / <i>copA1<sub>Af</sub></i>	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> , <i>copA1<sub>Af</sub></i>	Este trabajo
pBAD / <i>copA2<sub>Af</sub></i>	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> , <i>copA2<sub>Af</sub></i>	Este trabajo
pBAD / <i>copA3<sub>Af</sub></i>	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> , <i>copA3<sub>Af</sub></i>	Este trabajo
pBAD / <i>cusF3<sub>Af</sub></i>	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> , <i>cusF3<sub>Af</sub></i>	Este trabajo
pBAD / <i>cusF4<sub>Af</sub></i>	<i>ori</i> pBR322, <i>bla</i> (ApR), <i>araC</i> , <i>cusF4<sub>Af</sub></i>	Este trabajo

Todos los plásmidos generados en este trabajo derivan del vector pBAD-TOPO (Invitrogen). Entre las principales características de este vector, está la posibilidad de clonar directamente un fragmento de DNA obtenido en una reacción de PCR, debido a la presencia de timinas desapareadas en los extremos del vector. Además, la enzima topoisomerasa unida a este vector permite la unión de un fragmento de DNA con adeninas desapareadas en los extremos. Por otra parte, este vector permite tanto inducir como reprimir la expresión de genes de interés que contenga, a través de la inducción o represión específica de su promotor con arabinosa o glucosa, respectivamente.

Entre otras de las características de este vector, está la posibilidad de agregar una secuencia en el extremo 3' del mensajero clonado, la que es traducida en una secuencia de poli-histidinas. Esta secuencia posibilita una posterior purificación o detección de la proteína mediante columnas de afinidad o anticuerpos específicos, respectivamente.

### 2.3 Condiciones de cultivo

Ambas cepas de *A. ferrooxidans* se crecieron en un medio de cultivo con ion ferroso como fuente de energía. Este medio corresponde a una modificación del medio 9K y contiene (g/L): 0,1 de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,4 de  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,04 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$  y 33,33 de  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , ajustándose el pH a 1,45 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Posteriormente este medio se esterilizó en autoclave a 121°C por 20 min. En esta tesis se utilizaron dos condiciones de cultivo :

1) **Crecimiento en presencia de Cu** : Células no previamente expuestas al Cu, se utilizaron como inóculo en medios 9K (Hierro) en presencia de 5, 25, 50 y 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ .

2) **Crecimiento de células adaptadas al Cu**: Para obtener estos cultivos adaptados al Cu, se partió con un inóculo de células que nunca habían estado en contacto con Cu y se realizaron subcultivos sucesivos en los que la concentración de  $\text{CuSO}_4$  se fue aumentando en 10 mM cada vez. De esta forma se llegó a las concentraciones finales de 5, 25 y 100 mM de  $\text{CuSO}_4$ .

En ambos casos, las células se crecieron a 30°C con agitación rotatoria (150 rpm) hasta llegar a la fase exponencial tardía de crecimiento, donde se colectaron y lavaron para su utilización inmediata en experimentos. Para obtener distintas concentraciones de Cu, se utilizó una solución 1 M de  $\text{CuSO}_4$  filtrada (Millex GV 0,22  $\mu\text{m}$ , Durapore). El crecimiento se determinó mediante el recuento celular utilizando una cámara Petroff-Hausser y el microscopio óptico Olympus BX50.

Para el crecimiento de las distintas cepas de *E. coli*, se utilizó el medio LB que contiene (g/L): 10,0 de triptona, 5,0 de extracto de levadura, 5,0 de cloruro de sodio y finalmente el pH se ajustó a 7,0 con una solución de NaCl. Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las cepas de *E. coli* utilizadas, se usaron

diluciones desde una solución de  $\text{CuSO}_4$  100 mM filtrada (MillexGV 0,22  $\mu\text{m}$ , Durapore). El rango de metal utilizado fue desde 0 hasta 3,5 mM de  $\text{CuSO}_4$ , en intervalos de 0,25 mM de Cu. Las células se crecieron a 37° C con agitación rotatoria por 14 -16 h en tubos de ensayo de 5 ml. Posteriormente, se determinó el crecimiento celular por la medición de la  $\text{OD}_{600}$  en un espectrofotómetro Thermo Spectronic (Thermo, USA).

## **2.4 Técnicas de Biología Molecular**

### **2.4.1 Extracción de DNA**

Se creció un cultivo (200 ml) de *A. ferrooxidans* hasta la fase exponencial tardía. Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 7500 x g por 20 min y se lavaron con 1 ml de una solución de agua ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH = 1,5) y dos con 1 ml de una solución de citrato de sodio 10 mM pH = 7. Estos lavados tienen como finalidad limpiar las células del medio de crecimiento y de  $\text{Fe}^{3+}$ . Luego, para extraer el DNA, se utilizó el "kit" "Wizard® Genome DNA purification kit" (Promega, USA), según las recomendaciones para bacterias Gram-negativas. Este se basa en la lisis celular seguido de una digestión enzimática del RNA y con una posterior precipitación del DNA genómico con isopropanol y solubilización final en agua.

En el caso de las células de *E. coli*, se inocularon cultivos en 5 ml de medio LB a una dilución 1/100 y crecieron por 14-16 h a 37°C. Posteriormente, se colectaron las células de 1,5 mL del cultivo a 7000 x g. Finalmente, el DNA se extrajo al igual que en el procedimiento anterior.

### **2.4.2 Purificación de plásmidos de DNA**

Células de *E. coli* transformadas con los plasmidios de interés se inocularon en 5 ml de medio LB a una dilución 1/100 y se crecieron por 14-16 horas a 37°C.

Seguidamente, se colectaron las células presentes en 3 ml de cada cultivo por centrifugación a 10000 x g por 2 min. Posteriormente, para la purificación de los plasmidios se siguió el protocolo sugerido por el fabricante para el "kit" "E.Z.N.A. plasmid kit II". Este "kit" se basa en el método de la lisis alcalina, pero además usa una mini columna que permite separar el DNA de otras macromoléculas.

#### **2.4.3 Cuantificación del DNA**

La cuantificación del DNA genómico de *A. ferrooxidans* se realizó por la medición de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) en el espectrofotómetro de multi-volúmenes Epoch (Biotek, USA). Se utilizó una dilución de 50 veces del DNA obtenido previamente. Se consideró la relación  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g DNA/mL}$  y la pureza se determinó obteniendo la razón de  $A_{260}/A_{280}$ . Se utilizó una preparación de DNA genómico con una razón  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  lo que se considera con una baja cantidad proteínas.

#### **2.4.4 Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

Para comprobar la calidad del DNA genómico o los fragmentos de DNA amplificados por PCR o PCR en tiempo real, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Todas las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25 % de bromofenol, 40 % sacarosa) y se separaron a 100 V por 20 min. Finalmente, los geles se tiñeron por 10 min en una solución de bromuro de etidio (0,2  $\mu\text{g/mL}$ ). Los geles con las muestras ya separadas se visualizaron por la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta de 320 nm.

#### **2.4.5 Purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR**

Los distintos productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa según (2.4.4) y posteriormente se purificaron desde este gel mediante el "kit" de purificación "E.Z.N.A. Gel Extraction Kit" (Omega Bio Tek). Básicamente, se corta

desde el gel de agarosa la región que contiene la banda de interés. Posteriormente, la agarosa se disuelve y se transfiere la mezcla a una columna donde el DNA queda retenido. Posteriormente, el DNA se lava y eluye con agua nano pura precalentada. Finalmente, se conserva esta fracción para futuros usos a -20°C.

#### **2.4.6 Diseño de oligonucleótidos para las reacciones de PCR y PCR en tiempo real**

Para amplificar fragmentos específicos de cada uno de los genes en estudio se diseñaron partidores usando la secuencia anotada del genoma de *A. ferrooxidans* de las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993. El diseño se realizó utilizando el programa WEB Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y se sintetizaron por la empresa Eurofins MWG Operon ([www.operon.com](http://www.operon.com)). En general, se escogieron partidores de entre 18 a 20 nucleótidos, con un contenido guanina-citocina de al menos 50%, con estructuras secundarias débiles y que permitieran obtener un amplificado de entre 100 y 250 pb para cada pareja. Posteriormente, se comprobó que cada una de las parejas de partidores amplificara un fragmento específico para cada ORF utilizando la herramienta BLAST. Las secuencias de todos los partidores utilizados están en la tabla A1 (Anexo 1).

#### **2.4.7 Reacciones de PCR**

Para comprobar la especificidad de los partidores diseñados se realizaron reacciones de PCR en un volumen de 25 µl. En general, para cada reacción se usaron 5 µL de amortiguador 5X "Green Go taq buffer" (Promega), 1 ng de DNA, 0,5 µM de cada pareja de partidores, 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa "Go Taq" (Promega). Para la amplificación se utilizó un programa con desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, 30 ciclos con 30 s a 95°C, 30 s a 55-60°C

(según la pareja de partidores), 0,5 a 1,5 min de extensión a 72°C (según el tamaño del amplificado) y finalizando con un paso de 10 min a 72°C.

También se realizaron reacciones de PCR para comprobar la inexistencia de contaminación con DNA en la síntesis de cDNA. Para esto se amplificó un fragmento del gen 16S *rRNA* usando como molde el cDNA obtenido con y sin enzima transcriptasa reversa. De esta manera se buscó la presencia de un producto específico de amplificación en la reacción que contiene la enzima. Para esto se usó una dilución 1/10 del cDNA obtenido y se siguió un programa de amplificación similar al anterior pero con 40 ciclos en lugar de 30.

#### **2.4.8 Reacciones de PCR en tiempo real**

La cuantificación de la expresión de los determinantes de resistencia a Cu de ambas cepas de *A. ferrooxidans* se realizó utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Se usó el sistema Corbett rotor gene 6000 (Corbett Research) y las reacciones se hicieron en tubos del tipo "Strip tube" de 0,1 ml (Corbett Research) con un volumen final de 15 µl para cada reacción. Para cada una de las mediciones se usó 1 µl de una dilución 1:10 de cada cDNA previamente obtenido y 1:200 para el caso del 16S *rRNA*, 1,0 µM final de cada partidor, y 7,5 µl de "master mix" "Rotor-Gene SYBR Green PCR" (Qiagen). En general, para cada pareja de partidores se utilizó el siguiente programa: 10 min de desnaturalización inicial a 95°C, 30 ciclos con 15 s a 95°C, 30 s a 60°C para la hibridación de partidores y síntesis del fragmento específico. Durante el mismo ensayo, se comprobó la especificidad de los fragmentos amplificados a través de un análisis de fusión realizado en el mismo equipo. Este análisis mide la fluorescencia de cada reacción a medida que aumenta la temperatura. Posteriormente, se determina la

razón de cambio de la fluorescencia con la temperatura, la cual se grafica en función de la temperatura.

#### **2.4.9 Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real**

Para el análisis de la transcripción de los determinantes de resistencia al Cu de ambas cepas, se cuantificó la expresión total de los transcritos mediante PCR en tiempo real. Este método se basa en la relación que existe entre el aumento de la fluorescencia en las reacciones de PCR que usan el fluoróforo SYBR GREEN. Esta molécula se intercala en las moléculas de doble hebra, de manera que a medida que aumenta el número de estas moléculas en una reacción de PCR, también lo hará la fluorescencia. El equipo de PCR en tiempo real detecta el ciclo en el cual la fluorescencia de una reacción sobrepasa el nivel basal. Este ciclo se llama "cicle treshold" o CT.

En este trabajo se utilizó el método de la cuantificación absoluta para la cuantificación de transcritos (Roche, technical note). Para esto, se realizaron 5 diluciones seriadas desde 10 ng de DNA hasta 1 pg de DNA genómico de *A. ferrooxidans*. Estas diluciones seriadas se utilizaron para realizar las curvas de calibración para cada par de partidores utilizados. Al graficar el CT obtenido para cada dilución versus el logaritmo de la concentración de DNA, es posible obtener una aproximación lineal. Al determinar el valor de CT para una muestra de concentración desconocida, podemos usar la ecuación de la recta previamente calculada para determinar la concentración de DNA de esta muestra. Con este valor de concentración obtenido, podemos utilizar la siguiente estrategia para obtener el número de copias de transcritos en la muestra analizada (Whelan y cols., 2003):

$$\text{Número de copias} = \left( \text{Conc. DNA} \left[ \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] \right) \times \left( \frac{1 \text{ mol [pb] DNA}}{660 \text{ [g] DNA}} \right) \times \left( \frac{6.023 \times 10^{23} [\text{pb}]}{\text{mol [pb]}} \right) \times \left( \frac{1 \text{ copia}}{\text{Peso genoma [pb]}} \right) \\ \times \left( \frac{1 \text{ g}}{1000^3 \text{ ng}} \right) (\text{volumen DNA } [\mu\text{l}])$$

#### **2.4.10 Cuantificación específica de las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* crecidas en mezcla**

El método previamente descrito (2.4.9) también se utilizó para la cuantificación individual de cada cepa en un cultivo que contiene una mezcla de ambas cepas. Para esto, primero se inoculó un medio fresco con una cantidad equivalente de células (aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml de cada cepa). Cultivos control y con 50 mM de  $\text{CuSO}_4$  se crecieron hasta un conteo final de alrededor  $2 \times 10^8$  células/ml y se colectaron para la extracción del DNA genómico total según el punto 2.4.1. Previamente, se diseñaron partidores específicos para cada cepa utilizando genes exclusivos encontrados en cada cepa (ATCC 23270: Afe1334; ATCC 53993: Lferr0167) (Figura A1). Se consideró que la copia de un gen equivale a un genoma bacteriano y por tanto a la presencia específica de una cepa de *A. ferrooxidans*. Las cantidades obtenidas de cada cepa en las condiciones ensayadas se utilizaron para determinar la abundancia relativa de cada cepa en las mezcla de cultivos analizados (Tabla A3).

#### **2.4.11 Amplificación específica de genes desde el DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 53993**

Con el el fin de amplificar específicamente los genes de interés y evitar una amplificación cruzada, se realizaron PCRs anidados. En una primera etapa, se amplificó una región aledaña a los genes de interés presentes en la IG y así como también para otros genes presentes en el resto de genoma. El propósito de este

procedimiento fue lograr la amplificación específica de cada gen, debido a la alta similitud de secuencia entre estos ellos.

Para esto se utilizaron los partidores mencionados en la tabla A1. Para la reacción de PCR se utilizó la enzima "Platinum Pfx DNA Polymerase" (Invitrogen). Se ocupó el programa sugerido por el fabricante, ajustando el tiempo de extensión según el tamaño de los productos de amplificación. Una vez amplificados los distintos fragmentos de DNA, cada fragmento amplificado se separó por electroforesis en un gel de agarosa (2.4.4) y se purificó cada fragmento (2.4.5).

Este producto de PCR purificado se utilizó como molde para una segunda reacción de PCR donde se utilizó un segundo par de partidores específicos para la amplificación completa de cada gen.

Posteriormente, se agregaron adeninas en los extremos de los productos purificados. Para esto, se utilizaron un total de entre 20 y 50 ng de producto de PCR purificado, 2  $\mu$ l de 5X Gotaq Reaction Buffer, 2  $\mu$ l de una solución 1 mM de dATP, 0,5  $\mu$ l de "Gotaq Flexi Polymerase" y 0,6  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (25 mM) y agua hasta completar los 10  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 70° C for 20 minutos y se usó 1  $\mu$ l para las futuras reacciones de clonamiento en el vector pBAD-TOPO.

#### **2.4.12 Clonamiento de genes en el vector pBAD-TOPO**

Una vez obtenidos los fragmentos de DNA correspondientes a los genes de interés, se clonaron en el vector pBAD-TOPO. Para esto se tomaron 0,5  $\mu$ l del vector (5 ng de DNA), 1  $\mu$ l del producto purificado anteriormente (10-20 ng de DNA aproximadamente), 1  $\mu$ l de una solución salina (1,2 M NaCl y 0,06  $MgCl_2$ ) y agua nanopura hasta completar los 6  $\mu$ l. La reacción se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente (25°C).

#### 2.4.13 Transformación de cepas de *E. coli*

El producto de la reacción de clonamiento entre el vector pBAD-TOPO y los genes de interés, se utilizaron para la transformación por “shock” térmico de la cepa “One Shot TOP10” (Invitrogen) de *E. coli*. Para esto, se incubaron 50  $\mu$ l de células, 3  $\mu$ l del producto de ligación y se incubó en hielo por 30 min. Seguidamente, esta mezcla se incubó a 42°C por 45 s y luego 5 min en hielo. Posteriormente, a esta reacción se le agregó 250  $\mu$ l de medio S.O.C (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucosa) y se incubó por 1 h. Finalmente alícuotas de 30  $\mu$ l de esta mezcla se esparció en medios sólidos de LB suplementados con ampicilina (100 mg/l).

Alternativamente, otras cepas de *E. coli* se transformaron por electroporación. Primero, a partir de un cultivo de 50 ml en fase exponencial de crecimiento ( $DO_{600} \approx 0,6$ ) se colectaron todas las células a 7500 x g por 10 min a 4°C. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con agua bidestilada estéril siempre centrifugando a 7500 x g a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de agua estéril y se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l, para poder así concentrarlas.

En un segundo paso, se mezclaron 50  $\mu$ l de las células previamente preparadas y se mezclaron con 1  $\mu$ l del DNA plasmidial (10 ng DNA) en una cubeta para electroporación de 1 mm de paso. Seguidamente, se utilizó el programa preestablecido para la transformación de *E. coli* en el electroporador “BIORAD” para cubetas de 1mm. Finalmente, las células electroporadas se crecieron por 1 h en 1 ml de medio LB a 37°C con agitación rotatoria. Finalmente, se esparció un volumen de 100  $\mu$ l sobre medio LB sólido con ampicilina (100 mg/l) y se creció toda la noche a 37°C.

#### 2.4.14 Análisis de colonias transformantes.

Las colonias resultantes de los eventos de transformación se sometieron a distintos ensayos con el fin de comprobar la existencia del fragmento de DNA correctamente clonado en el vector pBAD-TOPO.

Primero, se seleccionaron distintos clones y se sembraron formando parches de alrededor 1 cm<sup>2</sup> en placas con medio LB sólido y ampicilina.

En algunos casos y con el fin de comparar la migración de los plásmidos mediante electroforesis en un gel de agarosa, se usó una revisión rápida de distintos clones obtenidos. Ésta consiste en una extracción rápida de ácidos nucleicos y comienza con la resuspensión de una sección del parche de células previamente crecido, en 40 µl de una solución con sacarosa 0,18 M, Tris-HCl 3,2 mM (pH 7.0) y azul de bromofenol a pH 7. Posteriormente, a esta mezcla se le agregan 15 µl de fenol cloroformo básico (fenol saturado básico 50%, cloroformo 48% y alcohol isoamílico 2%) (Winkler). Luego, cada tubo se agitó por 20 s en un vortex para después centrifugar a 12000 x g durante 2 min. Seguidamente, se separaron 15 µl de la fase acuosa mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% según las indicaciones del punto 2.4.4. Mediante esta técnica es posible analizar la presencia de plasmidios con insertos, debido a la migración diferencial con respecto a un plasmidio sin inserto.

Alternativamente, para comprobar la orientación de un fragmento dentro del vector pBAD-TOPO se realizó un PCR para colonias individuales de *E. coli*. Este procedimiento consiste en la amplificación de un fragmento específico de la construcción de DNA esperada. Para esto se eligió un partidor (directo) complementario a una región río arriba del inicio teórico del clonamiento (en el vector pBAD-TOPO) y otro partidor (reverso) complementario al gen de interés clonado en el vector. La idea es obtener un producto amplificado que abarca una sección del

plasmidio y otra del gen gen clonando. La reacción se realizó de acuerdo al punto 2.4.7 pero con una extensión en el tiempo de la desnaturalización inicial de 10 min y una extensión según la longitud de cada gen clonado.

Finalmente, los clones seleccionados para los distintos ensayos microbiológicos se secuenciaron en la empresa MacroGen, Korea. De esta forma se aseguró la identidad de cada clon.

## **2.5 Técnicas con RNA**

### **2.5.1 Extracción del RNA total**

Se extrajo el RNA total de *A. ferrooxidans* utilizando una versión modificada del método de TRIzol (Invitrogen). Este reactivo es una solución de fenol ácido e isotiocianato de guanidinio propuesto como una mejora del método original de Chomczynski y Sacchi (1987). El fenol ácido permite la partición del RNA en la fase acuosa y el isotiocianato de guanidinio la desnaturalización de proteínas como las RNasas. Para la extracción del RNA se usaron células en fase exponencial tardía de crecimiento. Primero se colectaron las células por centrifugación a 5500 x g por 30 min a 25°C. Posteriormente, las células se lavaron una vez con agua ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH = 1,5) y luego con citrato de sodio 10 mM pH = 7,0. Se usó entre 10 a 20 mg de peso húmedo de células y se resuspendieron en 300 µl de una solución de lisis celular (acetato de sodio, 0,02M pH = 5,5; SDS 0,5%; EDTA, 1 mM). A cada resuspensión celular se le agregó 1 ml de solución de TRIzol (Invitrogen) y luego se resuspendió toda la mezcla en un tubo Eppendorf de 2 ml, dejándose incubar por 5 min a temperatura ambiente. Inmediatamente se agregaron 200 µl de cloroformo y se incubó nuevamente por 2 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C y se recuperó la fase superior acuosa que contiene el RNA.

Después se precipitó el RNA usando 1 volumen de isopropanol 100% y 0,5 volumen de una solución de cloruro de sodio 1,2 M y citrato de sodio 0,8 M dejándose incubar la mezcla a 4°C por 20 min. Luego de la precipitación, se recuperó el RNA por centrifugación a 15700 x g por 20 min a 4°C. Finalmente, el RNA se resuspendió en 15 µl de agua DEPC.

Para eliminar la posible contaminación por DNA, el RNA se trató con 4U (2 µl) de DNasa libre de RNasas "TURBO DNA-free" (Ambion) por 60 min a 37°C. Se usó un volumen final de 100 µl y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante.

### **2.5.2 Electroforesis de RNA en geles de agarosa**

Para comprobar la calidad del RNA obtenido se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1,8% en TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Todas las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25 % de bromofenol, 40 % sacarosa) y se separaron a 50 V por 35 min. Finalmente, los geles se tñeron por 10 min en una solución de bromuro de etidio (0,2 µg/mL). Las distintas muestras cargadas se visualizaron por la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta de 320 nm.

### **2.5.3 Cuantificación del RNA**

Para determinar la concentración del RNA se midió la  $A_{260}$  en el espectrofotómetro de multi-volúmenes Epoch (Biotek, USA), utilizando la relación  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg RNA/mL}$  y la pureza se determinó obteniendo la razón de  $A_{260}/A_{280}$ . Se utilizaron preparaciones de RNA con una razón  $A_{260}/A_{280} > 1,6$  (descrito para RNA resuspendido en agua DEPC (Wilfinger y col., 1997)). La determinación de la concentración del RNA se realizó justo antes de la reacción de transcripción inversa.

#### **2.5.4 Transcripción inversa**

Para la obtención del cDNA en cada condición de estudio se realizó una transcripción inversa del RNA extraído. Se ocuparon 0,8 µg del RNA y 0,5 µg de hexadesoxinucleótidos al azar (Random hexamer primer, Promega). En una primera parte se incubó una mezcla de 5 µl que contiene el RNA y los partidores a 70°C por 5 min para la desnaturalización de las estructuras secundarias del RNA y facilitar así la hibridación de los partidores. Posteriormente, se incubó en hielo por 5 min donde se le agregó 15 µl de una mezcla de amortiguador "ImProm-II" 5x (Promega), dNTPs 0,5 mM cada uno, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1 U de la transcriptasa reversa (TR) "ImProm-II" (Promega). La reacción de síntesis incluyó una incubación inicial por 10 min a 25°C para inducir la unión de los partidores y luego la síntesis se realizó por 1 h a 42°C para luego finalizar con un paso para lograr la desnaturalización de la transcriptasa reversa por 15 min a 70°C.

### **2.6 Técnicas microbiológicas**

#### **2.6.1 Halos de inhibición**

Los clones obtenidos de la transformación de células *E. coli* TOP10 con los vectores pBAD-TOPO, se crecieron toda la noche en medio LB líquido suplementado con ampicilina. Este cultivo se diluyó 100 veces y se inoculó sobre medio LB líquido fresco para ser incubado a 37°C hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6. Este cultivo se diluyó 10 veces y se esparcieron 100 µl sobre una placa de agar LB con ampicilina (100 mg/l). Posteriormente, se depositó un disco de papel filtro (0,6 cm de diámetro) en el centro de la placa y se le agregaron 10 µl de una solución 1M de CuSO<sub>4</sub> estéril. Posteriormente, las placas se incubaron por 18 h a 37°C y se comparó el área de inhibición del crecimiento alrededor del disco de papel filtro con Cu.

### **2.6.2 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de Cu para algunas cepas de *E. coli***

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para las distintas cepas de *E. coli* desarrolladas en este trabajo (Tabla 1). Primero, se crecieron cultivos toda la noche de cada una de las cepas y se usaron como inóculo para evaluar la MIC en los distintos clones ensayados. Se inoculó sobre medio LB suplementado con ampicilina 100 mg/l y arabinosa o glucosa al 0,1%. Además, se agregó una solución de CuSO<sub>4</sub> estéril en un rango de 0,2 a 3 mM. Cada ensayo se incubó por 16 h a 37°C con agitación rotatoria de 150 rpm. Finalmente, se midió la OD<sub>600</sub> y la MIC se consideró como la concentración de sulfato de cobre que inhibe el 50% del crecimiento de un clon particular (en relación a la OD<sub>600</sub> medida).

## **2.7 Métodos informáticos**

### **2.7.1 Comparación informática de las secuencias analizadas**

Se comparó la secuencia primaria de las posibles proteínas relacionadas con la resistencia al Cu de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 con proteínas que participan en la resistencia a este metal en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y en otros microorganismos. Las secuencias nucleotídicas para *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se obtuvieron desde la base de datos del (<http://cmr.jcvi.org/>), mientras que para la cepa ATCC 53993 se obtuvieron desde (<http://www.jgi.doe.gov/>). Para *E. coli* y *P. siryngae* las secuencias se obtuvieron desde el sitio Web del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos entre las distintas proteínas se realizaron con el software “Geneious” (<http://www.geneious.com>). Este programa recopila distintas herramientas bio-informáticas para el estudio tanto de secuencias aisladas de genes como para secuencias completas de genomas. A través de la

herramienta "ClustalW Alignment" se realizaron distintas comparaciones de secuencias aminoácidas y nucleotídicas. De esta manera fue posible obtener los porcentajes de identidad y similitud para cada comparación. Para la comparación de las secuencias nucleotídicas de los genomas de ambas cepas de *A. ferrooxidans*, se utilizó la herramienta "Mauve" (<http://gel.ahabs.wisc.edu/mauve/>). Esta herramienta permite el alineamiento completo de los genomas, como también el análisis gráfico de éstos.

### 3 Resultados

#### 3.1 Características de la isla genómica de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 .

Un análisis detallado muestra que la secuencia exclusiva de la cepa ATCC 53393 se inserta después del ORF Lferr0127 (Afe2898 en la cepa ATCC 23270), anotado como una enzima relacionada con el metabolismo de los t-RNA (tipo MiaB) (Figura 3A) y antes del ORF Lferr0229 (Afe2897 en la cepa ATCC 23270), anotado como un gen relacionado con la fijación de nitrógeno (Nif-U) (Tabla A2).

Por otra parte, en esta región de DNA exclusiva de la cepa ATCC 53993 es posible encontrar distintos elementos característicos de las islas genómicas (IG) descritas en otros microorganismos. Entre ellos están: estar inserta a continuación de un gen relacionado con el metabolismo de los tRNA y contiguo a un gen que codifica para una resolvasa (familia serina resolvasas).

La región exclusiva de la cepa ATCC 53993 tiene un porcentaje G:C promedio de 57,2%, mientras que el porcentaje G:C promedio del genoma sin la IG es de 58,9%.

Adicionalmente, es posible encontrar otros ORFs anotados como recombinasas del tipo integrasas y transposasas. Los ORFs Lferr0180 y Lferr0181 están contiguos y anotados como transposasas asociadas al elemento de inserción ISPsy14 (94% de identidad con el ISPsy14 del genero *Pseudomonas*) y a una integrasa respectivamente. El ORF Lferr0215 también está anotado como una integrasa. Además, se encuentran una serie de ORFs anotados como transposasas de la familia IS4 (Lferr0150, Lferr0196 y Lferr0201). Además, es posible encontrar elementos de transposición del tipo Tn-7. Los ORF Lferr0144 y Lferr0221 codifican para las proteínas C y B de este elemento respectivamente y el ORF Lferr0145 para una recombinasa tal vez relacionada con este elemento de inserción.

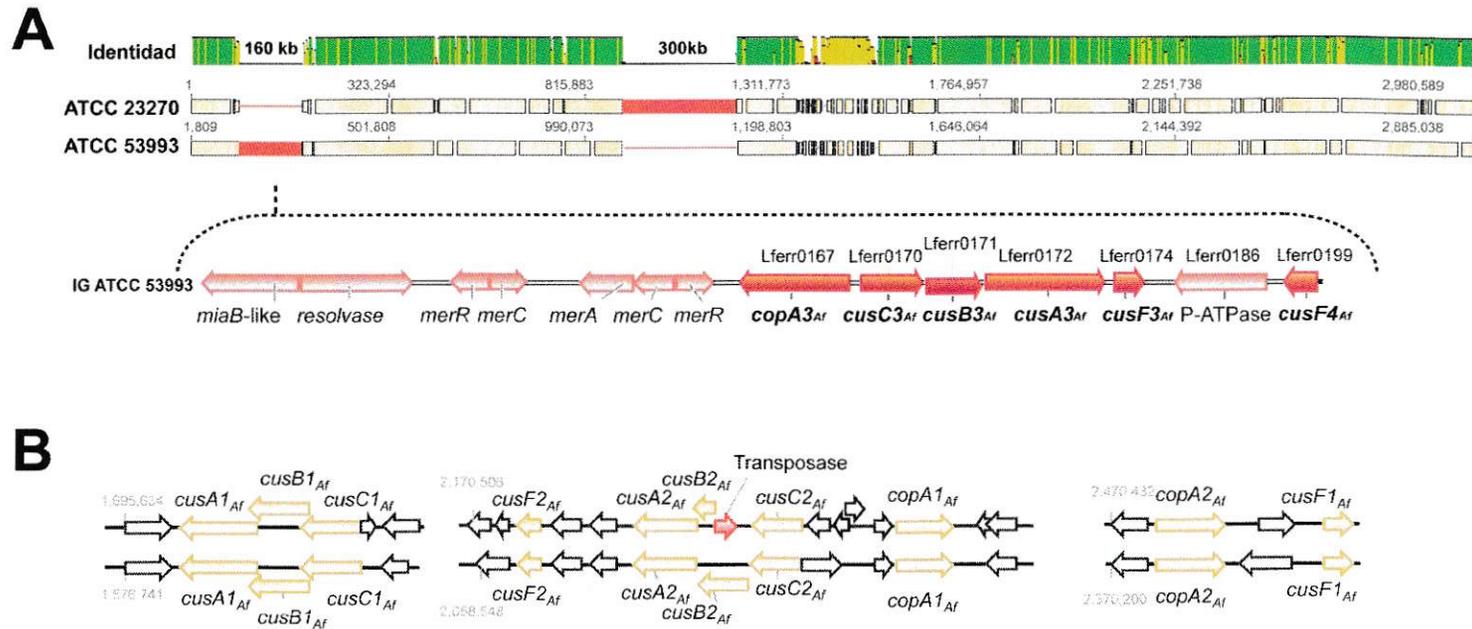


Figura 3. Alineamiento completo de los genomas de las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993. A. (Superior) Las zonas rojas indican las zonas del genoma exclusivas para cada cepa. (Inferior) Se muestran los determinantes de resistencia a metales pesados presentes en una sección de la región de DNA exclusiva de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. B. Determinantes de Cu compartidos por ambas cepas. En la cepa ATCC 23270 se muestra un segundo sistema tipo Cus, pero interrumpido por una transposasa que está ausente en la cepa ATCC 53993.

También, en esta región se encuentran una serie de componentes relacionados con la conjugación y que pertenecen al sistema de secreción tipo cuatro (SST4) (Lferr0242, Lferr0244, Lferr0247, Lferr0249, Lferr0251, Lferr0256, Lferr0257, Lferr0259 y Lferr0262) (Tabla A2).

Por otra parte, es posible encontrar una serie de ORFs relacionados con la resistencia a metales como el mercurio, cobre y otros. Para el primer metal, es posible encontrar reguladores transcripcionales de la familia MerR (Lferr0159 y Lferr0164), transportadores de membrana interna de mercurio MerC (Lferr0160 y Lferr0163) y una mercurio reductasa (Lferr0162) (Figura 3A, inferior).

En el caso del Cu es posible encontrar un gen que codifica para una ATPasa de Cu (Lferr0167, de ahora en adelante *copA3<sub>Af</sub>*), un sistema de eflujo tipo Cus (Lferr0170, Lferr0171, Lferr0172 y Lferr0174, ahora *cusC3<sub>Af</sub>*, *cusB3<sub>Af</sub>*, *cusA3<sub>Af</sub>* y *cusF3<sub>Af</sub>* respectivamente), una chaperona de Cu tipo CusF (Lferr0199, ahora *cusF4<sub>Af</sub>*) y una ATPasa de eflujo de metales (Lferr0186) (Figura 3A, inferior).

También es posible encontrar una ATPasa tipo P (Lferr0209) que posiblemente esta relacionada con Cd/Zn/Pb y Hg.

### **3.2 Determinantes de resistencia al Cu en ambas cepas de *A. ferrooxidans***

Una comparación entre los genomas de ambas cepas, muestra que conservan los mismos determinantes de resistencia al Cu ya descritos anteriormente (Navarro y cols., 2009) (Figura 3 B).

En el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 existe un segundo sistema de eflujo tipo Cus (Afe0668, Afe0669 y Afe0671), pero interrumpido por una transposasa (Afe0670). Esta transposasa no está presente en este segundo sistema tipo Cus en la

cepa ATCC 53993. Un resumen comparativo de los determinantes de resistencia al Cu de ambas cepas de *A. ferrooxidans* se detalla en la tabla 4.

**Tabla 4. Comparación de los determinantes de resistencia al Cu presentes en ambas cepas de *A. ferrooxidans*.**

ATCC 53993 ORF	ATCC 23270 ORF	Función anotada	Función propuesta	Nombre	Referencias
Lferr2066	Afe0663	ATPasa de Cu tipo P	ATPasa de Cu tipo P	<i>copA1<sub>Af</sub></i>	Navarro y cols., 2009; Luo, y cols., 2008,
Lferr2404	Afe0329			<i>copA2<sub>Af</sub></i>	Navarro y cols., 2009; Luo y cols., 2008
Lferr0167	Ausente			<i>copA3<sub>Af</sub></i>	Valdés y cols., 2010
Lferr2407	Afe0326	Proteína hipotética	Chaperona de Cu tipo CusF	<i>cusF1<sub>Af</sub></i>	Navarro, et al., 2009
Lferr2057	Afe0667			<i>cusF2<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr0174	Ausente			<i>cusF3<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr0199	Ausente			<i>cusF4<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr1619	Afe1142	Proteína membrana externa eflujo	Proteína tipo CusC	<i>cusC1<sub>Af</sub></i>	Navarro, et al., 2009
Lferr2062	Afe0668			<i>cusC2<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr0170	Ausente			<i>cusC3<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr1618	Afe1143	Proteína fusión de membrana (familia RND)	Proteína tipo CusB	<i>cusB1<sub>Af</sub></i>	Navarro, et al., 2009
Lferr2061	Afe0669			<i>cusB2<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr0171	Ausente			<i>cusB3<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr1617	Afe1144	Bomba eflujo metales pesados (familia CzCA)	Proteína tipo CusA	<i>cusA1<sub>Af</sub></i>	Navarro, et al., 2009
Lferr2060	Afe0671			<i>cusA2<sub>Af</sub></i>	Esta tesis
Lferr0172	Ausente			<i>cusA3<sub>Af</sub></i>	Esta tesis

### 3.3 Análisis de los determinantes de resistencia al Cu adicionales de la cepa ATCC 53993

#### 3.3.1 ATPasas de Cu y metales pesados

Dentro de los determinantes de resistencia al Cu adicionales encontrados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, está la ATPasa de Cu (*CopA3<sub>Af</sub>*). La secuencia aminoacídica codificada por este gen presenta un 92% de identidad con la ATPasa *CopA1<sub>Af</sub>* y 93% con *CopA2<sub>Af</sub>* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Por otra parte, *CopA3<sub>Af</sub>*

también presenta los dominios característicos entre las ATPasas de Cu, entre ellos el de translocación característico para este metal: CPHALGLA.

Por otra parte, la ATPasa de metales pesados (Lferr0186), tiene un dominio de translocación (CSCSFAIA) que no coincide con otros dominios previamente descritos para metales, como el Cu/Ag (CPHALGLA o CPCALGLA) o Hg (CPCALVIS) (Tabla 5).

**Tabla 5. Dominios y motivos de las ATPasas de Cu encontrados en *A. ferrooxidans* comparados con transportadores de este metal caracterizados para otras bacterias Gram-negativas.**

	Bacteria	Sitio unión metales	Dominio fosfatasa	Dominio traslocación	Dominio de fosforilación	Dominio HP	Motivo GDFxNDxP
CopA	<i>E. coli</i>	CASC..CASC	TGEP	CPCALGLA	FDKTGTLT	SSHPL	GDGINAP
CopA	<i>E. hirae</i>	CANC	TEGES	CPCALGLA	LDKTGTLT	SEHPL	GDGINAP
CopB	<i>E. hirae</i>	no	TEGES	CPHALGLA	LDKTGTLT	no	GDGINDAP
CopA1 <sub>Af</sub>	<i>A. f.</i> ATCC 23270	no	TEGES	CPHALGLA	FDKTGTLT	SEHPI	GDGVNDAP
CopA2 <sub>Af</sub>	<i>A. f.</i> ATCC 23270	no	TEGES	CPHALGLA	FDKTGTLT	SEHPI	GDGVNDAP
CopB <sub>Af</sub>	<i>A. f.</i> ATCC 23270	CASC..CASC	TGEP	CPCMGLA	LDKTGTLT	SEHPL	GEDINDSP
Lferr0186	<i>A. f.</i> ATCC 53993	no	TEGES	CSCSFAIA	LDKTGTLT	SEHPL	GDGVNDAP
CopA3 <sub>Af</sub>	<i>A. f.</i> ATCC 53993	no	TEGES	CPHALGLA	FDKTGTLT	SEHPI	GDGVNDAP

Finalmente, la tercera ATPasa tipo P encontrada en la IG de la cepa ATCC 53993 (Lferr0209) no estaría relacionada con el Cu, pues su sitio de traslocación CPCALVIS ha sido descrito para el transporte de Cd<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Pb<sup>+2</sup> y Hg<sup>+2</sup>.

### 3.3.2 Sistemas de eflujo de metales tipo Cus y chaperonas de Cu

En la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 también es posible encontrar los genes para un sistema de eflujo de metales del tipo Cus (*cusC3<sub>Af</sub>*, *cusB3<sub>Af</sub>*, *cusA3<sub>Af</sub>* y *cusF3<sub>Af</sub>*) (Figura 3.A, inferior). Cabe destacar que este sistema además, cuenta con

una chaperona (*cusF3<sub>Af</sub>*) cercana al mismo contexto genético y además es posible encontrar una cuarta chaperona de Cu, ORF Lferr0199 (*cusF4<sub>Af</sub>*).

Un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las chaperonas de Cu tipo CusF encontradas en ambas cepas de *A. ferrooxidans* muestra que todas ellas conservan los sitios de unión a Cu ya descrito para *E. coli*. La única diferencia es la presencia de una metionina en el sitio de la histidina para las secuencias de las chaperonas de Cu de *A. ferrooxidans* (Figura 4).

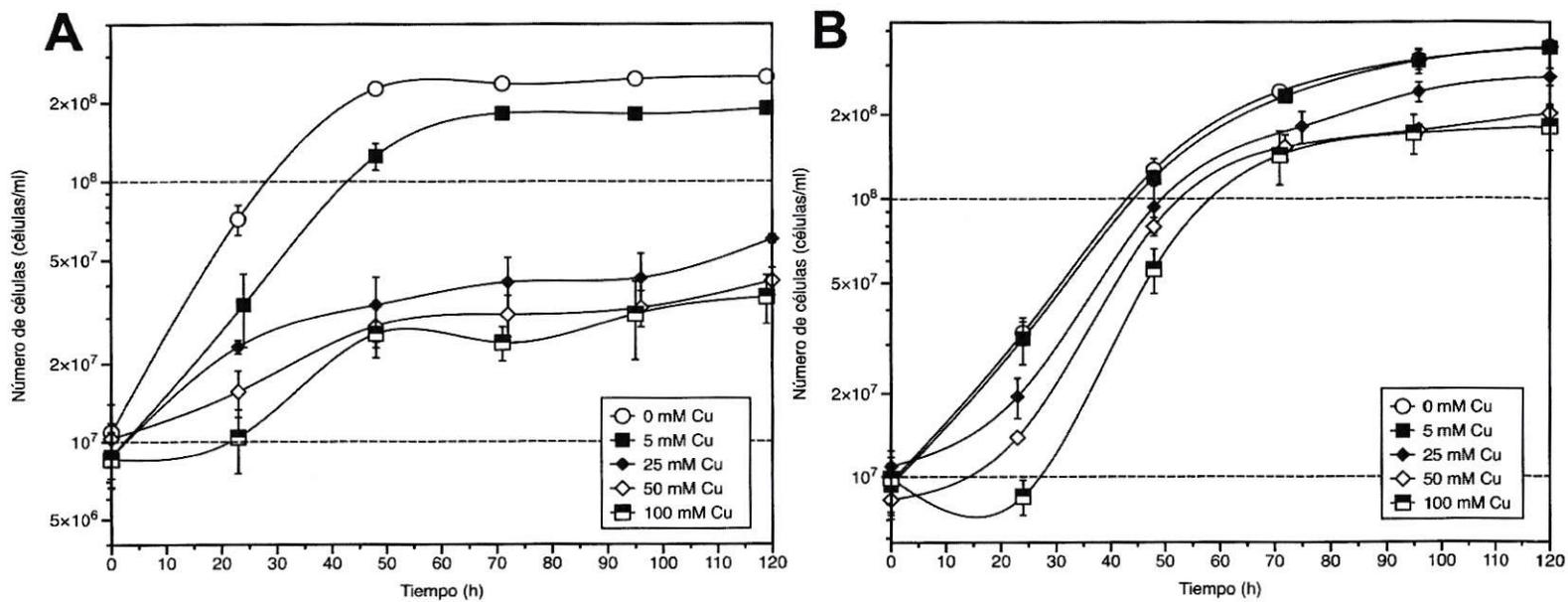
<b>CusF</b> <sub><i>E. coli</i></sub>	49	L	S	K	K	T	H	D	P	A	A	N	F	M	M	F	T	P	O	T	K	S	E	K	T	C	K	V	A	E	N	F	V	Q	Q	--	C	N	L	S	L	Q	D	I													
<b>CusF1</b> <sub><i>a.f</i></sub>	57	P	A	N	T	A	N	V	A	M	G	P	V	K	A	L	G	W	P	S	M	M	F	L	L	Q	N	A	V	M	L	N	S	Y	K	A	G	E	V	N	E	N	F	A	K	T	A	G	G	Y	V	I	T	R	I	T	
<b>CusF2</b> <sub><i>a.f</i></sub>	57	P	A	N	T	A	N	V	A	M	G	P	V	K	A	L	G	W	P	S	M	M	F	L	L	Q	N	A	M	L	N	G	L	K	T	G	E	V	N	E	V	F	A	K	T	A	G	G	Y	V	I	T	R	I	T		
<b>CusF3</b> <sub><i>a.f</i></sub>	57	P	A	A	N	M	N	V	A	M	G	P	V	K	A	L	G	W	P	S	M	M	F	L	L	Q	N	A	M	L	N	S	L	K	T	G	E	V	N	E	V	F	A	K	T	A	G	G	Y	V	I	T	R	I	T		
<b>CusF4</b> <sub><i>a.f</i></sub>	61	L	E	A	R	T	A	N	V	A	M	G	P	V	K	A	L	G	W	P	S	M	M	F	V	Q	D	K	T	L	L	N	G	L	K	T	G	E	V	S	E	D	F	A	K	N	T	I	G	G	Y	V	I	T	R	I	T

**Figura 4.** Alineamiento de un fragmento de las secuencias aminoacídicas de las chaperonas de Cu de *A. ferrooxidans* con alta identidad a CusF de *E. coli*. El sitio descrito para la unión de Cu (HX<sub>7</sub>WX<sub>2</sub>MXMXF) de CusF se indica con los rectángulos verticales. Se usaron las secuencias de las posibles chaperonas de Cu de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 de la isla genómica: CusF3<sub>Af</sub> y CusF4<sub>Af</sub> (Lferr0174 y Lferr0199) y las ubicadas en la restante región del genoma CusF1<sub>Af</sub> y CusF2<sub>Af</sub> (AFE0326 y AFE0664).

### 3.4 Crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 53393 en presencia de Cu

Se crecieron ambas cepas de *A. ferrooxidans* en presencia de Cu (Materiales y Métodos 2.3). Para esto, se inocularon las cepas no adaptadas al crecimiento con Cu en medios frescos con distintas concentraciones del metal.

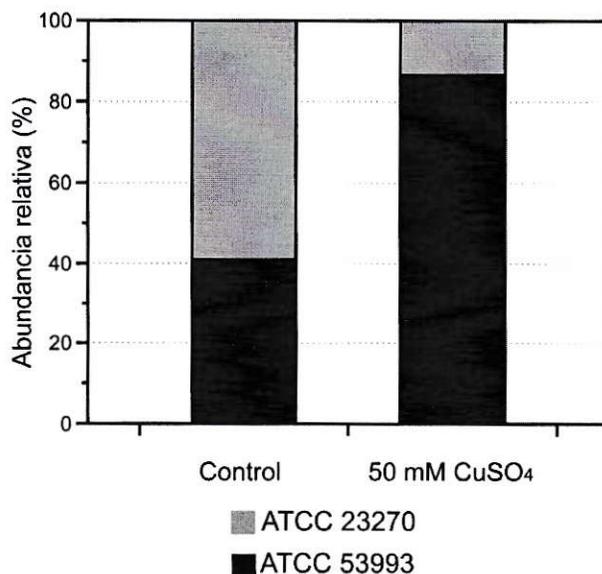
La figura 5 muestra las curvas de crecimiento obtenidas para la cepa ATCC 23270 y ATCC 53993. Para la cepa ATCC 53993, es posible observar que a 100 mM de CuSO<sub>4</sub>, el cultivo alcanza la mitad del número de células finales en la fase estacionaria de crecimiento, en comparación a al condición control.



**Figura 5. Curvas de crecimiento para *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (A) y *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (B) en presencia de Cu. Cada punto representa el promedio de 3 replicas biológicas.**

En la condición 100 mM de CuSO<sub>4</sub>, la cepa ATCC 2370 muestra una disminución de casi 8 veces el número de células en comparación al control. Sin embargo, cuando se realiza el mismo análisis en la cepa ATCC 53993, esta cepa apenas muestra una leve disminución en el número de células alcanzado.

Teniendo en cuenta la aparente mayor resistencia al Cu de la cepa ATCC 53993, se realizó un segundo ensayo para determinar la sobrevivencia de esta cepa en presencia de la cepa ATCC 23270, es decir, una mezcla de ambas. Se mezclaron números equivalentes de células en medios de cultivo en presencia o ausencia de Cu. Las proporciones relativas de células de cada cepa se estimaron a través de qPCR usando partidores que amplifican secuencias específicas de cada cepa (Tabla A3). En la figura 6 es posible observar que a 50 mM de Cu, la cepa ATCC 53993 es predominante en el cultivo, ya que existe una abundancia relativa de 86,6% de ATCC 53993 por sobre un 13,4% de ATCC 23270.



**Figura 6. Cultivos de mezclas de cepas de *A. ferrooxidans* en ausencia y presencia de Cu.** Cantidades equivalentes de células de ambas cepas de *A. ferrooxidans* se crecieron en ausencia (control) y presencia de 50 mM de CuSO<sub>4</sub>. Cuando el cultivo alcanzó alrededor de  $2,5 \times 10^9$  células/ml, se extrajo el DNA total de tres replicas biológicas en cada condición y números de células de cada microorganismo en la mezcla se determinó por qPCR.

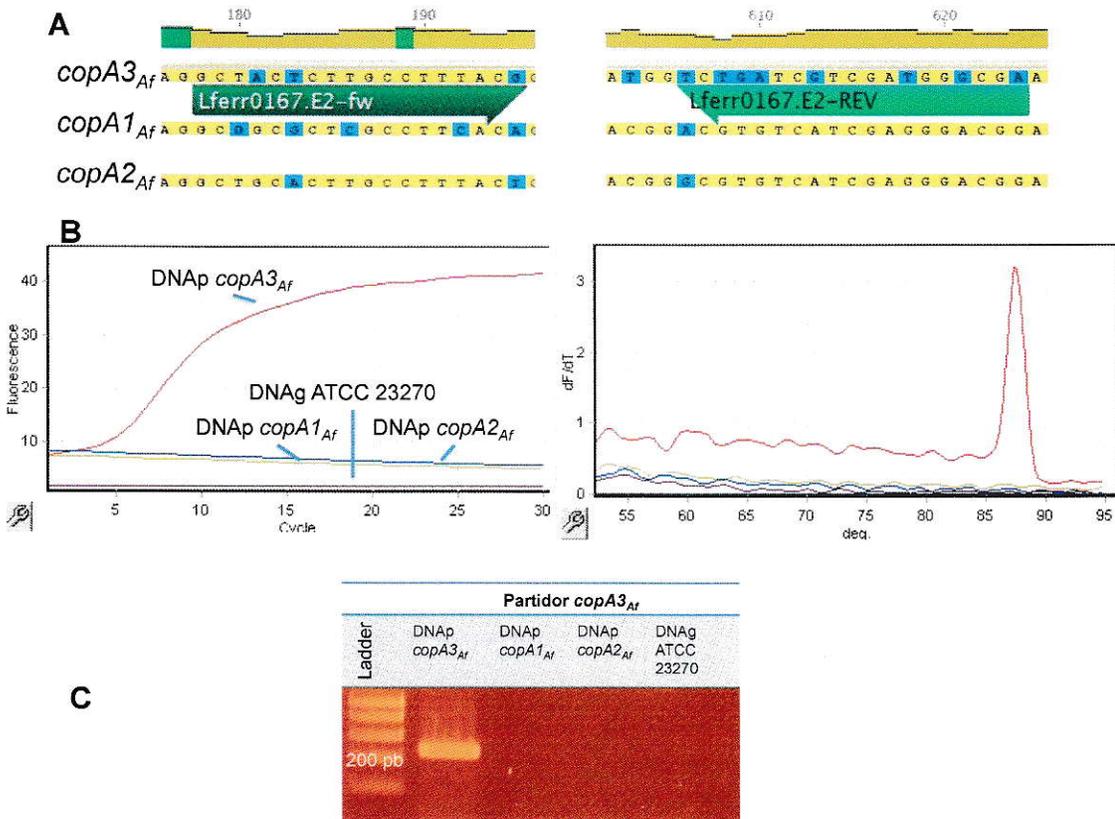
### **3.5 Comparación de la expresión de los determinantes de resistencia al cobre entre *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y *A. ferrooxidans* ATCC 53993**

#### **3.5.1 Partidores exclusivos de la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993**

Con el objetivo de cuantificar la expresión de los transcritos de *copA3<sub>Af</sub>* y *cusF4<sub>Af</sub>*, ambos ubicados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, se diseñaron partidores específicos para estos genes y se descartó la amplificación cruzada con otros genes de alta similitud presentes en el resto del genoma.

En una primera etapa, se realizaron alineamientos de las secuencias nucleotídicas entre *copA3<sub>Af</sub>* y las otras ATPasas de Cu presentes en el genoma (*copA1<sub>Af</sub>* y *copA2<sub>Af</sub>*). La idea fue elegir las regiones del gen *copA3<sub>Af</sub>* que presentaran menor similitud con *copA1<sub>Af</sub>* y *copA2<sub>Af</sub>*.

En la figura 7 se muestra la región seleccionada para el diseño de los partidores directo y reverso. Se escogieron partidores que tuviesen una baja complementariedad en sus extremos 3' con la secuencia objetivo.



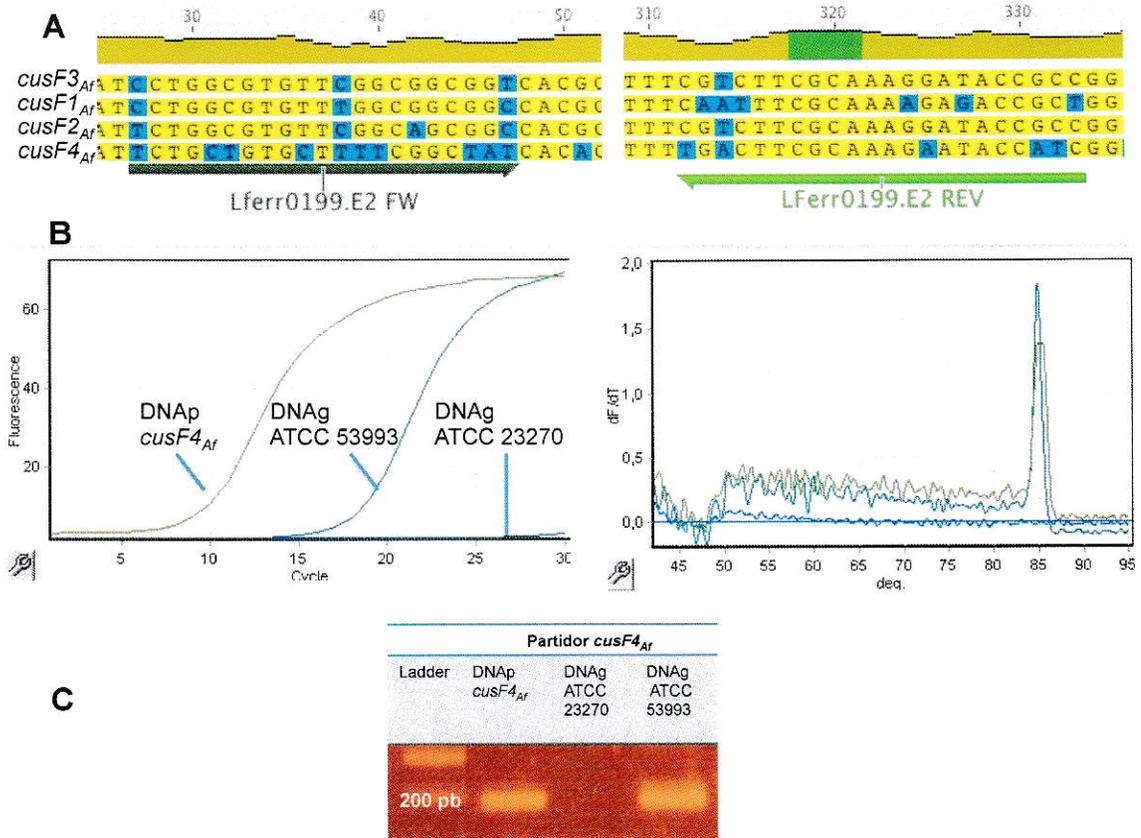
**Figura 7. Diseño y prueba de partidores específicos para la ATPasa de Cu *copA3<sub>Af</sub>* (Lerr0167).** A. Fragmento del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las ATPasas de Cu encontradas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Se indica la ubicación de los partidores seleccionados. B. Resultado de la reacción de PCR en tiempo real. Panel izquierdo: Cambios en la fluorescencia en los diferentes ciclos; Panel derecho: Curva de fusión para la reacción. C. Separación por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en cada reacción con DNA plasmidial (DNAp) o DNA genómico (DNAg).

Se probaron los partidores específicos para *copA3<sub>Af</sub>* en una reacción de PCR en tiempo real, usando como molde: DNA plasmidial conteniendo *copA3<sub>Af</sub>*, *copA1<sub>Af</sub>*, *copA2<sub>Af</sub>* y DNA genómico de la cepa ATCC 23270. La idea es que al usar el DNA de la cepa ATCC 23270 y plasmidios que contienen los genes de las otras ATPasas (*copA1<sub>Af</sub>* y *copA2<sub>Af</sub>*), no deberían existir productos de amplificación, pues los partidores son específicos para *copA3<sub>Af</sub>*. En la figura 7 B, panel derecho, es posible observar que

sólo existen productos de amplificación para la reacción que usó DNA plasmidial con *copA3<sub>Af</sub>* como molde. En las reacciones con DNAs plasmidiales que llevan *copA1<sub>Af</sub>* o *copA2<sub>Af</sub>* o DNA genómico de la cepa ATCC 232370, no se observan productos de amplificación (Figura 7 B, panel derecho). Además, el análisis de fusión para todas las reacciones, muestra de que solo hubo un producto de amplificación para la reacción que tenía el DNA plasmidial de *copA3<sub>Af</sub>*. En las otras reacciones tampoco hubo productos de amplificación detectables (Figura 7 B, panel izquierdo). Finalmente, en C es posible observar que al separar los productos de amplificación de cada reacción mediante electroforesis en un gel de agarosa, sólo es posible observar una banda del tamaño esperado para la reacción con los partidores específicos para *copA3<sub>Af</sub>*. De esta forma se comprueba que los partidores son específicos para la amplificación de este gen.

De forma similar a lo anteriormente expuesto, se probaron los partidores diseñados específicamente para *cusF4<sub>Af</sub>* en una reacción de PCR en tiempo real, usando como molde el DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, DNA genómico de la cepa ATCC 53993 y además DNA plasmidial conteniendo la misma chaperona de *Cu cusF4<sub>Af</sub>*. En la figura 8 (B, panel derecho) se muestra que sólo hubo productos de amplificación para la reacción que tiene DNA plasmidial de *cusF4<sub>Af</sub>* y el DNA genómico de la cepa ATCC 53993 como molde. Igualmente, en el panel izquierdo se muestra que hubo sólo un producto específico de amplificación para estas reacciones. Finalmente, en C se muestra que al separar los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa, sólo es posible evidenciar una banda específica en esta reacción de PCR.

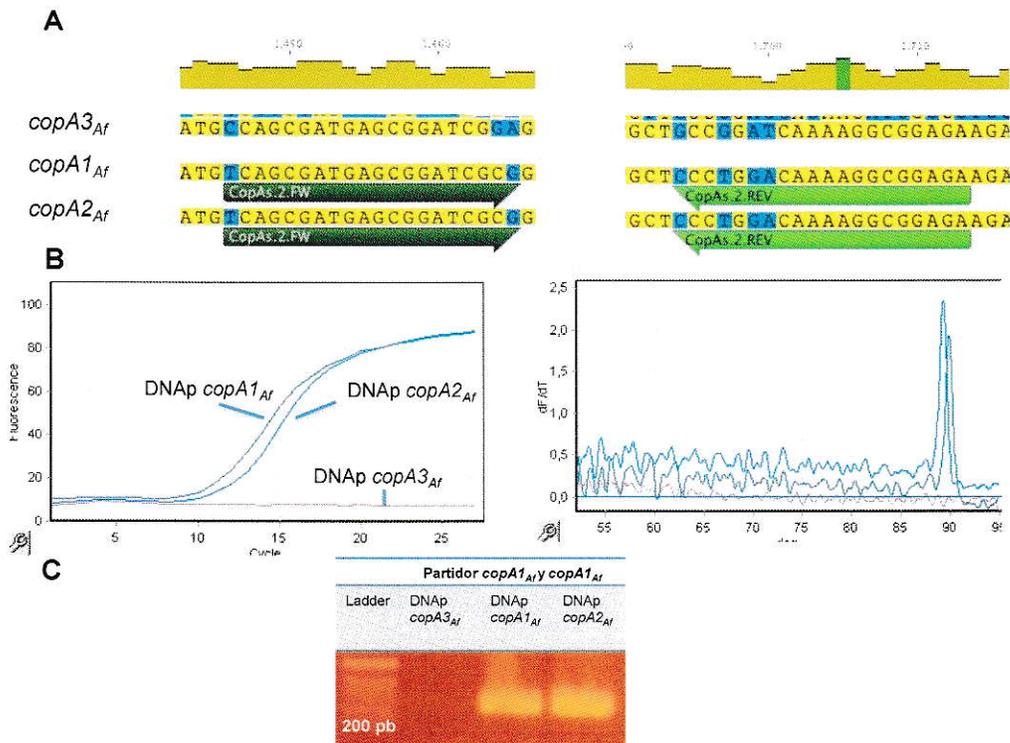
De esta forma, se comprobó que estos pares de partidores amplifican específicamente el gen *cusF4<sub>Af</sub>*.



**Figura 8. Diseño y prueba de partidores específicos para la chaperona de Cu *cusF4*<sub>Af</sub> (Lerr0199).** A. Fragmento del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las chaperonas de Cu encontradas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Se indica la ubicación de los partidores seleccionados. B. Resultado de la reacción de PCR en tiempo real. Panel izquierdo: cambios en la fluorescencia en los diferentes ciclos; Panel derecho: Curva de fusión para la reacción. C. Separación por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en cada reacción con DNA plasmidial (DNAp) o DNA genómico (DNAg)..

### 3.5.2 Diseño de partidores comunes para ambas cepas de *A. ferrooxidans*

Se diseñaron partidores específicos para amplificar la expresión de un conjunto de genes. Para comparar la expresión de las ATPasas de Cu presentes en ambas cepas de *A. ferrooxidans* (*copA1*<sub>Af</sub> y *copA2*<sub>Af</sub>) y excluir la amplificación de *copA3*<sub>Af</sub>, se diseñaron partidores a partir de una región de baja similitud con *copA3*<sub>Af</sub>. La figura 9 muestra que no existe amplificación cruzada entre los genes.



**Figura 9. Diseño y prueba de partidores específicos para las ATPasas de Cu *copA1<sub>Af</sub>* y *copA2<sub>Af</sub>*.** A. Fragmento del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las ATPasas de Cu encontradas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Se indica la ubicación de los partidores seleccionados. Resultado de la reacción de PCR en tiempo real. Panel izquierdo: Cambios en la fluorescencia en los diferentes ciclos; Panel derecho: Curva de fusión para la reacción. C. Separación por electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en cada reacción con DNA plasmidial (DNap) o DNA genómico (DNAg)..

En la figura 9 (B) se observa que al realizar una reacción de PCR en tiempo real con los partidores específicos para *copA<sub>Af</sub>* (*copA1<sub>Af</sub>* + *copA2<sub>Af</sub>*), sólo hay aumento de la fluorescencia para las reacciones que contienen DNA plasmidial de *copA1<sub>Af</sub>* y *copA2<sub>Af</sub>*. De igual forma se comprueba que sólo existe un producto de amplificación en estas reacciones por el análisis de fusión (figura 9 B, panel izquierdo). Finalmente, al separar los productos de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa, no se evidencian productos de amplificación para la reacción que usa el DNA plasmidial de *copA3<sub>Af</sub>* como molde. De esta forma se comprueba que el par de

partidores seleccionados, sólo amplifican fragmentos de DNA pertenecientes a las ATPasas de Cu *copA1<sub>Af</sub>* + *copA2<sub>Af</sub>* y no para *copA3<sub>Af</sub>*.

Finalmente, se diseñaron partidores específicos para la amplificación de todos los genes del tipo *cusC<sub>Af</sub>* (*cusC1<sub>Af</sub>* + *cusC2<sub>Af</sub>* + *cusC3<sub>Af</sub>* (ATCC 53993)) y *cusF<sub>Af</sub>* (*cusF1<sub>Af</sub>* + *cusF2<sub>Af</sub>* + *cusF3<sub>Af</sub>* (ATCC 53993)). Para esto, se usaron regiones que presentan máxima identidad entre estos genes.

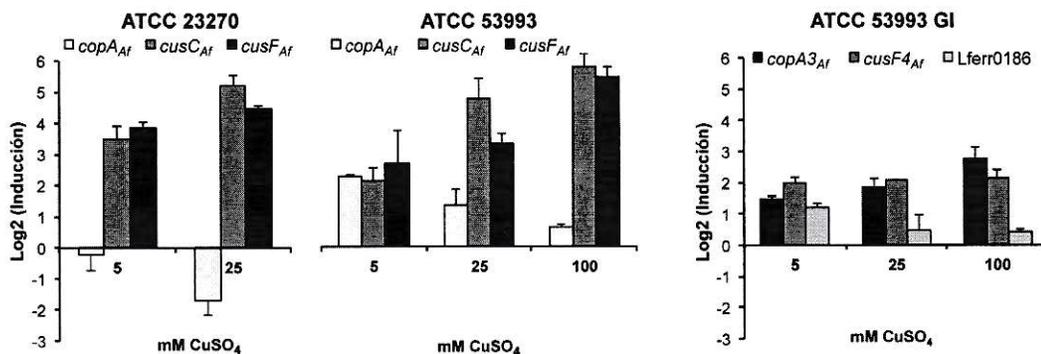
### **3.6 Estudio de la expresión de los genes relacionados con la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans***

Para obtener células en las mismas condiciones de crecimiento, se adaptaron cultivos de *A. ferrooxidans* al crecimiento con 5 y 25 mM de Cu (Células adaptadas al crecimiento con Cu (Materiales y métodos, sección 2.3)). Para esto se re-inocularon sucesivos cultivos con estas concentraciones de Cu. La idea es obtener cultivos adaptados al crecimiento con el metal y que presentan un crecimiento similar al control sin metal.

Usando la técnica de PCR en tiempo real, se cuantificó la expresión de los transcritos correspondientes a los genes *copA<sub>Af</sub>* (*copA1<sub>Af</sub>* + *copA2<sub>Af</sub>*), *cusC<sub>Af</sub>* (*cusC1<sub>Af</sub>* + *cusC2<sub>Af</sub>* + *cusC3<sub>Af</sub>* (ATCC 53993)) y *cusF<sub>Af</sub>* (*cusF1<sub>Af</sub>* + *cusF2<sub>Af</sub>* + *cusF3<sub>Af</sub>* (ATCC 53993)) para ambas cepas de *A. ferrooxidans*. Adicionalmente, se investigó la expresión de los genes *copA3<sub>Af</sub>*, *cusF4<sub>Af</sub>* y el ORF Lferr0186 de la cepa ATCC 53993. Las condiciones investigadas fueron en 0, 5 y 25 mM de Cu (además 100 mM de Cu sólo en la cepa 53993, pues la cepa ATCC 23270 no resiste esta concentración de Cu en las condiciones ensayadas). Para seleccionar el gen que presentaba una menor variación en las condiciones investigadas y usarlo como gen normalizador de la expresión, se usó el algoritmo NormFinder (Andersens y cols., 2004). Para esto, se evaluó la

expresión de tres genes (*cyc2<sub>Af</sub>*, *alaS<sub>Af</sub>* y 16S rRNA) en todas las condiciones utilizadas y se calculó la variación tanto de las réplicas como en las distintas condiciones ensayadas. Se determinó que la expresión del gen *alaS<sub>Af</sub>* presenta la mínima variación entre estos tres genes.

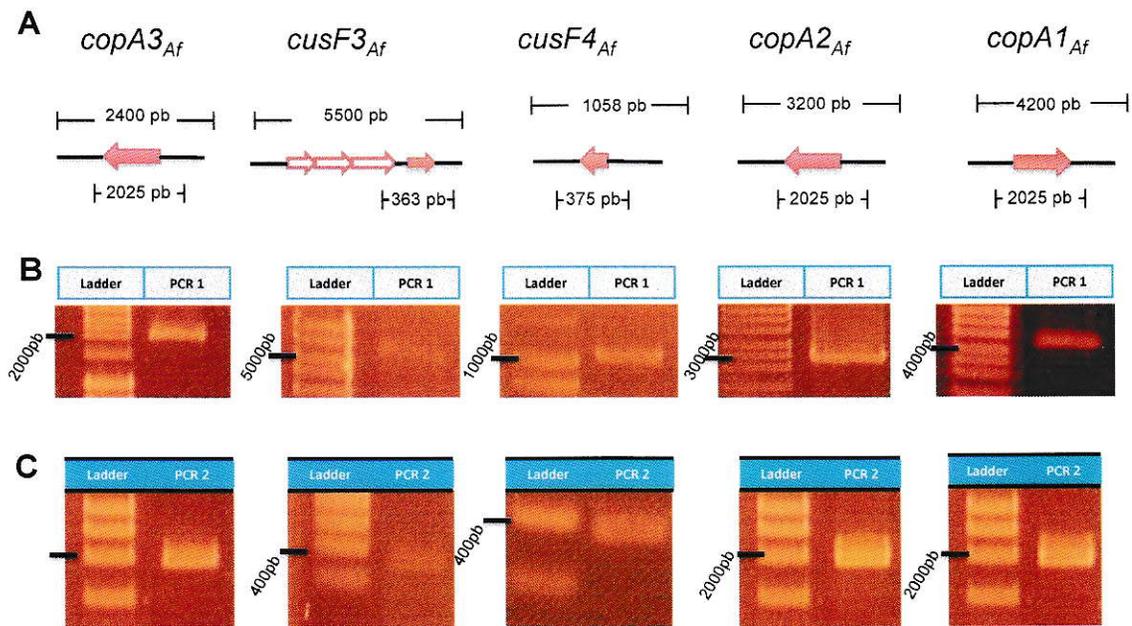
En la figura 10 se observa que los genes *cusC<sub>Af</sub>* y *cusF<sub>Af</sub>* presentan una mayor inducción en presencia de Cu en ambas cepas. Para la cepa ATCC 23270 la inducción es mayor que en la cepa ATCC 53993 a una igual concentración de Cu (5 o 25 mM del metal). Por otra parte, los genes *copA3<sub>Af</sub>* y *cusF4<sub>Af</sub>* (exclusivos de la IG) aumentan su expresión en presencia de Cu. Esta ATPasa de Cu aumenta su expresión genética en función del aumento de Cu en el medio, mientras que la chaperona de Cu se induce y mantiene su expresión en presencia de Cu. Por otra parte, el ORF Lferr0186 presenta una leve disminución en la expresión en las condiciones ensayadas. Finalmente, las ATPasas de Cu *copA<sub>Af</sub>* (*copA1<sub>Af</sub>* + *copA2<sub>Af</sub>*) disminuyen su expresión en comparación a la expresión del gen *alaS<sub>Af</sub>* cuando ambas cepas de *A. ferrooxidans* crecen en presencia del metal.



**Figura 10. Inducción relativa de la expresión transcripcional de algunos genes relacionados con la resistencia al Cu en las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 de *A. ferrooxidans*.** Se diseñaron partidores específicos que permitieron analizar la expresión de tres grupos de genes: *copA<sub>Af</sub>* = *copA1<sub>Af</sub>* + *copA2<sub>Af</sub>*; *cusC<sub>Af</sub>* = *cusC1<sub>Af</sub>* + *cusC2<sub>Af</sub>* + *cusC3<sub>Af</sub>* (sólo en ATCC 53993); *cusF<sub>Af</sub>* = *cusF1<sub>Af</sub>* + *cusF2<sub>Af</sub>* + *cusF3<sub>Af</sub>* (sólo en ATCC 53993) y *cusF4<sub>Af</sub>* (sólo en ATCC 53993). Además, se cuantificaron genes exclusivos de la IG de la cepa ATCC 53993: *copA3<sub>Af</sub>*, *cusF4<sub>Af</sub>* y el ORF Lferr0186. La inducción se determinó como el cociente entre el número de copias relativas del gen de interés y el número de copias del gen normalizador *alaS<sub>Af</sub>*. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas biológicas.

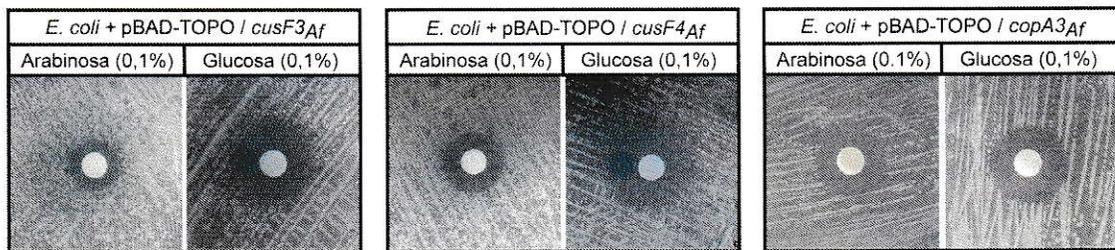
### 3.7 Funcionalidad de genes relacionados con las resistencia al Cu encontrados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993

Se evaluó la posible funcionalidad de los genes *copA3<sub>Af</sub>*, *cusF3<sub>Af</sub>* y *cusF4<sub>Af</sub>* en cepas de *E. coli* sensibles al Cu. Debido a la alta identidad que existe entre estos genes de la IG con otros presentes en el resto del genoma, se realizaron PCR anidados para asegurar la amplificación específica de cada gen. En la figura 11 se muestran los fragmentos amplificados en la primera y segunda parte del PCR. De esta forma se comprobó la amplificación de los fragmentos de DNA del tamaño esperado en cada caso.



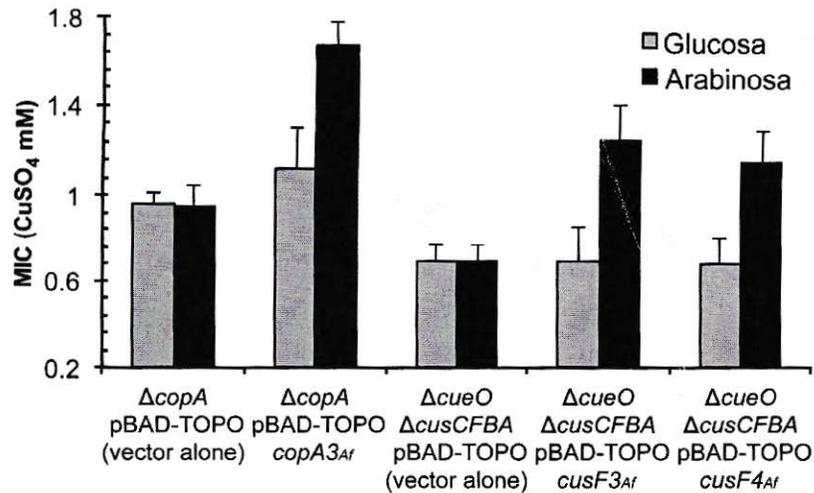
**Figura 11. PCR anidado para la amplificación específica de los genes *copA3<sub>Af</sub>*, *cusF3<sub>Af</sub>*, *cusF4<sub>Af</sub>*, *copA2<sub>Af</sub>* y *copA1<sub>Af</sub>*. A.** En la parte superior se muestran los fragmentos esperados en la amplificación para el primer PCR, mientras que en la parte inferior se muestra el tamaño esperado de la segunda reacción de PCR. En B y C se muestran los fragmentos amplificados y separados en un gel de agarosa al 1% correspondientes a la primera y segunda reacción de PCR respectivamente.

Posteriormente, estos genes se clonaron en el vector pBAD-TOPO (Invitrogen) y con ellos se transformó la cepa de *E. coli* TOP10. En una primera aproximación se probó la resistencia al Cu de estas cepas en un ensayo de halo de inhibición (Figura 12) para los distintos clones obtenidos. Se observa la disminución en el área libre de células alrededor de los discos con Cu para aquellas placas con el inductor (arabinosa), mientras que para aquellas placas con el represor (glucosa) se observa un aumento en el área alrededor de estos discos. Específicamente, el área del clon inducido para *cusF3<sub>Af</sub>* fue de 1,6 cm<sup>2</sup>, mientras que cuando se reprimió, el área fue de 3,25 cm<sup>2</sup>. Para el clon *cusF4<sub>Af</sub>* se alcanzó un área de 2,2 cm<sup>2</sup>, mientras que cuando se reprimió el área fue de 4,2 cm<sup>2</sup>. Finalmente para *copA3<sub>Af</sub>* y se obtuvo un área de 2,95 cm<sup>2</sup> y 3,5 cm<sup>2</sup> para el clon inducido y reprimido respectivamente.



**Figura 12.** Halos de inhibición para *E. coli* TOP10 transformada con el vector pBAD-TOPO que llevan los genes *cusF3<sub>Af</sub>*, *cusF4<sub>Af</sub>* o *copA3<sub>Af</sub>*. Los distintos clones ensayados se sembraron en placas LB agar suplementadas con ampicilina 100 mg/l y arabinosa (inductor) o glucosa (represor). Posteriormente, se depositó un disco de papel filtro al cual se le agregaron 10 µl una solución de CuSO<sub>4</sub> 1 M. Pasadas las 16 h, se midió el área alrededor del disco que no contenía células (incluyendo el disco) usando la formula del área del círculo.

Posteriormente, se utilizaron preparaciones de estos plásmidos para transformar cepas de *E. coli* sensibles al Cu. Se usó la cepa  $\Delta copA$  de *E. coli* para evaluar la funcionalidad de *copA3<sub>Af</sub>*. En el caso de *cusF3<sub>Af</sub>* y *cusF4<sub>Af</sub>*, se usó la cepa  $\Delta cueO \Delta cusCFBA$  de *E. Coli* (Figura 13).



**Figura 13.** Determinación de la MIC a Cu las cepas de *E. coli* K12  $\Delta copA$  y  $\Delta cueO \Delta cusCFBA$  transformadas con el vector pBAD-TOPO que expresa *copA3Af*, *cusF3Af* o *cusF4Af*. Cada clon se creció en medio líquido por 16 h a 37°C con arabinosa o glucosa para inducir o reprimir la expresión de los genes respectivamente. Además se agregó sulfato de Cu en el rango de 0 a 3 mM. La MIC se determinó como la concentración de Cu donde un clon crecido en presencia de arabinosa alcanza el 50% de la densidad óptica (OD<sub>600</sub>) con respecto al clon control.

En esta figura se observa que al inducir la expresión de *copA3Af* en la cepa  $\Delta copA$  de *E. coli* hay un aumento de la resistencia al metal (aproximadamente un aumento del 50% sobre la condición reprimida). Por otra parte, también se evidencia un aumento de 78% y 69% en la resistencia al Cu sobre el nivel reprimido, cuando se induce la expresión de las chaperonas de Cu *cusF3Af* y *cusF4Af* respectivamente.

## 4 Discusión

### 4.1 Isla genómica en *A. ferrooxidans* ATCC 53993

En *A. ferrooxidans* ATCC 53993 fue posible evidenciar que la IG de la cepa ATCC 53993 posee algunas de las características encontradas en IGs de otros microorganismos. Entre ellas, una recombinasa contigua a un gen relacionado con el metabolismo de los tRNA, un menor porcentaje G:C, la presencia de múltiples elementos de inserción (secuencias de inserción, transposones y elementos externos), la presencia de los componentes de un posible sistema de secreción tipo 4 y la existencia de una serie de genes relacionados con la resistencia a metales pesados (Cu y Hg). Por otra parte, estudios recientes sugieren que este tipo de elementos cae en una clasificación aun más general, que engloba a todos aquellos elementos genéticos móviles que poseen sistemas de conjugación. Estos se denominan "Integrative and Conjugative Elements" o "ICE". Por tanto, una denominación posible para este elemento sería ICEA $\phi$ 53993.

Las recombinasas son las enzimas responsables tanto de la integración como de la escisión de los ICE desde el cromosoma (Burrus y cols., 2002). Estas enzimas se han clasificado en dos grandes familias, que básicamente difieren en los mecanismos utilizados para la integración y escisión de estos elementos genéticos. En la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 la recombinasa presente al inicio de esta secuencia pertenece a la familia de las serina recombinasas. Sin embargo, estas enzimas se han encontrado en mayor proporción en ICE asociados a bacterias Gram-positivas (Wozniack y Waldor, 2010). No obstante, este proceso es independiente a los mecanismos de transferencia, y por tanto el hecho de que funcionen como módulos

independientes pueden generar una mayor diversidad de potenciales huéspedes (Wozniack y Waldor, 2010).

Al comparar los genomas de las cepas ATCC 53993 y ATCC 23270, se observa que en la primera cepa existen dos SST4 y de uno sólo en la segunda cepa. En el caso de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 uno de los SST4 está presente en su IG exclusiva, lo que no ocurre en la cepa ATCC 23270. Se ha descrito que las IG, en general, portan los determinantes para su propia transferencia (Wozniak y Waldor, 2010). Por tanto, es probable que el SS4T presente en ambas cepas no esté relacionado con la transferencia de las IGs.

Al comparar el crecimiento de ambas cepas de *A. ferrooxidans* en un medio con Cu, la cepa ATCC 53993 conserva los parámetros de crecimiento cercanos al control sin metal hasta los 100 mM de Cu. En cambio, en la cepa ATCC 23270 se observó un efecto negativo en el crecimiento ya a una concentración de 5 mM del metal. Una de las hipótesis generadas en el transcurso de esta tesis, fue que la presencia de la IG en la cepa ATCC 53993 proporciona los recursos genéticos necesarios para el crecimiento en concentraciones elevadas de Cu en el medio. Específicamente, en esta IG es posible encontrar al menos, 5 nuevos ORFs relacionados con la resistencia al Cu: *copA3<sub>Af</sub>*, *cusC3<sub>Af</sub>*, *cusB3<sub>Af</sub>*, *cusA3<sub>Af</sub>*, *cusF3<sub>Af</sub>* y *cusF4<sub>Af</sub>*.

Por otro lado, también fue posible encontrar 5 ORF relacionados con la resistencia al Hg y que probablemente conformen un sistema de resistencia a este metal. Este sistema, comprende dos reguladores tipo *merR*, dos proteínas de membrana *merC* y una reductasa *merA*. Cabe señalar que ambas cepas de *A. ferrooxidans* poseen en sus genomas proteínas con alta identidad a las encontradas en la IG. Sin embargo, estos genes se encuentran en contextos genéticos distintos y no agrupados como en el caso

de la IG. Probablemente, este segundo sistema pueda conferir a cepa ATCC 53993 una mayor resistencia al Hg.

#### **4.2 Comparación de los perfiles de expresión genética de los determinantes de resistencia al Cu encontrados en ambas cepas de *A. ferrooxidans***

En general los resultados obtenidos a través de los experimentos de PCR en tiempo real mostraron que existe un aumento de la expresión de los genes relacionados con la resistencia al Cu en ambas cepas de *A. ferrooxidans*.

La expresión de los genes *cusC<sub>Af</sub>* representa la mayor inducción en presencia de Cu en ambas cepas de *A. ferrooxidans*. Este gen forma parte del operon *cusCBA* y en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se ha demostrado que se transcribe como un operón y además presenta un aumento de la expresión genética cuando este microorganismo crece en presencia de Cu (Navarro y cols., 2009). En la literatura se ha descrito que las proteínas *CusCBA* forman un complejo proteico que atraviesa la membrana interna, espacio periplasmático y la membrana externa, análogo al sistema de eflujo *AcrB-TolC* de *E. coli* (Franke y cols., 2003). Trabajos recientes han demostrado que la proteína responsable de la especificidad al metal transportado por este complejo corresponde a la proteína *CusA* (Long y cols., 2010), mientras que la proteína *CusC* sería accesoria, pero fundamental en la arquitectura del complejo proteico para el transporte del metal (Kulathila y cols., 2011). Es esperable por tanto que la expresión de *cusC<sub>Af</sub>* tenga un alto aumento de la expresión, pues estaría estrechamente ligado con otorgar la funcionalidad a los sistemas tipo *Cus* que están involucrados en la eliminación del Cu en esta bacteria.

Por otra parte, fue posible evidenciar que las chaperonas de Cu tipo *CusF* presentes en ambas cepas, también presentan una alta inducción en presencia del

metal. En *E. coli*, se ha propuesto que esta proteína une Cu en el espacio periplasmático y que sería capaz de entregarlo al sistema Cus (Franke y cols., 2003; Kulathila y cols., 2011). Las chaperonas de Cu tipo CusF encontradas en *A. ferrooxidans* tienen una alta similitud en el sitio de unión a Cu, a pesar que en *E. coli* un residuo de histidina difiere de la metionina encontrada en las proteínas de *A. ferrooxidans* (Orell y cols. 2010).

Según los resultados previamente descritos, pareciera ser que el sistema de eflujo tipo Cus encontrado en ambas cepas de *A. ferrooxidans* es una manera eficiente de destoxificar tanto el espacio intracelular como el espacio periplasmático. Cabe señalar, que en la cepa ATCC 53993 estarían los componentes genéticos para la expresión de 3 sistemas tipo Cus: una copia que comparte con la cepa ATCC 23270, una segunda copia que también está presente en esta última cepa, pero que se encuentra interrumpida por una transposasa entre los componentes *cusC<sub>Af</sub>* y *cusB<sub>Af</sub>* y finalmente, una tercera copia presente en la IG. De esta forma, los sistemas de eflujo tipo Cus presentes en la cepa ATCC 53993 podrían resultar una buena estrategia para el eflujo de metales pesados, ya que no requieren una fuente directa de energía (ATP) y están favorecidos por el gradiente de protones. Este gradiente es muy importante en estos microorganismos ya que enfrentan un  $\Delta\text{pH}$  de al menos 4 unidades entre el exterior y el citoplasma (Ferguson e Ingledew, 2008).

Al comparar la expresión genética de los genes *cusC<sub>Af</sub>* y *cusF<sub>Af</sub>* de ambas cepas de *A. ferrooxidans*, existe una mayor inducción de estos genes en la cepa ATCC 23270. Suponiendo que la resistencia total estaría dada por la sumatoria de todos los productos génicos de los determinantes de resistencia al Cu, es probable que en la cepa ATCC 23270, la respuesta de resistencia al Cu converja en el menor número de determinantes de resistencia al metal. Desde este punto de vista, es

esperable que en esta cepa exista un mayor aumento en la inducción de la expresión de estos genes. Siguiendo este razonamiento es esperable por tanto, una menor expresión individual de cada componente en la cepa ATCC 53993, la que presenta un mayor número de determinantes de resistencia al Cu.

Por otro lado, al cuantificar la expresión de las ATPasas  $copA_{Af}$  ( $copA1_{Af}$  +  $copA2_{Af}$ ), se observó una disminución en la expresión de estos genes en presencia de Cu en ambas cepas de *A. ferrooxidans* cuando crecen en ión ferroso como fuente de energía. Sin embargo, cuando este microorganismo crece en azufre como fuente de energía, existe una inducción de  $copA_{Af}$  ( $copA1_{Af}$  +  $copA2_{Af}$ ) en ambas cepas de *A. ferrooxidans* (datos no mostrados) en presencia de bajas concentraciones de Cu. En este sentido, es posible que exista una expresión diferencial de estas ATPasas de Cu dependiendo de la fuente de energía que estos microorganismos empleen. Por tanto, es probable que *A. ferrooxidans* recurra a diferentes estrategias para la resistencia al Cu según las condiciones de crecimiento.

Finalmente, resulta interesante que los genes asociados con la resistencia al Cu presentes en la IG de la cepa ATCC 53993 también muestren una inducción en presencia de este metal. La expresión de  $copA3_{af}$  mostró una inducción dependiente de la concentración de Cu en el medio, mientras que la chaperona de Cu tipo CusF  $cusF4_{af}$  mostró una inducción sostenida en presencia del metal. Sin embargo, el ORF Lferr0186 descrito como una ATPasa de metales pesados, presentó una leve disminución en en la expresión. Probablemente, esta proteína tenga afinidad con otro grupo de metales o no participe activamente en la expulsión de Cu.

#### 4.3 Expresión heteróloga de CopA<sub>3Af</sub>, CusF<sub>3Af</sub> y CusF<sub>4Af</sub> en cepas de *E. coli* sensibles al Cu

Un segundo enfoque abordado durante la realización de esta tesis de magíster fue la comprobación de la funcionalidad de algunos de los determinantes de resistencia al Cu alojados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Se clonaron los genes *copA3Af*, *cusF3Af* y *cusF4Af* en el vector inducible y reprimible pBAD-TOPO, para luego transformar cepas de *E. coli* sensibles al Cu. Entre las características de este vector, está la posibilidad de incluir una cola de poli-histidinas en el carbono terminal de las proteínas clonadas y expresadas desde este vector. En un primer intento se decidió conservar esta cola de poli-histidinas con la idea de poder detectar la expresión de las proteínas inducidas. Se logró detectar a través de Western Blot, usando anticuerpos anti-histidinas, la expresión de las chaperonas de Cu tipo CusF *cusF3Af* y *cusF4Af* (Datos no mostrados). No obstante, cuando ensayamos la mínima concentración inhibitoria (MIC) de estas cepas, no se obtuvieron diferencias sustanciales en la MIC de los clones inducidos versus los reprimidos. Probablemente, la presencia de los residuos de histidinas en las proteínas de *A. ferrooxidans*, afectó la función de estas proteínas. Debido a esto, se decidió evitar la transcripción de las colas de poli-histidinas conservando el codón de término de la transcripción en los genes estudiados. Gracias a esta aproximación, fue posible observar cambios en la resistencia de las cepas de *E. coli* sensibles al Cu.

Teniendo esto en consideración, es probable que los determinantes de resistencia al Cu alojados en la IG sean funcionales y participen en la detoxificación de este metal en la cepa ATCC 53993. Además, esta cepa es capaz de crecer y desplazar a la cepa ATCC 23270 cuando crecen juntas en presencia de Cu. Por tanto, estos resultados apoyan la tesis de que la IG presente en la cepa ATCC 53993

correspondería a una isla de resistencia al Cu. Con estos resultados, es probable que una de las estrategias para la resistencia al Cu en la cepa ATCC 53993 esté basada en el número de genes correspondientes a determinantes de resistencia. En otras palabras, pareciera ser que un mayor número de genes relacionados con la resistencia al Cu está estrechamente relacionado con la capacidad de resistencia al metal, tal como se ha demostrado en *Cupriavidus metallidurans* (van Houdt y cols., 2009).

Por otra parte, también podría ser posible que los determinantes de resistencia al Cu encontrados en *A. ferrooxidans* posean diferencias en cuanto a la eficiencia para la destoxificación del metal. Es decir, es posible que algunos de estos sistemas tengan una mayor afinidad o eficiencia para la unión o eliminación del metal, respectivamente. De esta manera, los determinantes de resistencia al Cu adicionales encontrados en la IG de la cepa ATCC 53993, podrían aumentar la resistencia al metal en esta cepa, solamente por el hecho de funcionar con mayor eficiencia que los otros sistemas de resistencia alojados en el resto del genoma.

#### **4.4 Proyecciones**

Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la expresión de los genes adicionales encontrados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 le otorgan una mayor resistencia al Cu. Sin embargo, es probable que este acidófilo cuente con otros mecanismos no tradicionales que le permitan desarrollarse en altas concentraciones de Cu. Sería interesante investigar si otros ORFs encontrados en la IG de la cepa ATCC 53993 están relacionados con la resistencia al Cu. Por ejemplo, utilizando la técnica de macroarreglos de DNA, se podría investigar la expresión genética de estos ORFs cuando esta bacteria crece en presencia de Cu o otros metales. También se podrían

comparar la abundancia relativa de las proteínas que se inducen en estos microorganismos cuando crecen en presencia de metales como el Cu, a través de experimentos de estudio de los proteomas. Otra posibilidad, es que los polifosfatos podrían participar en la resistencia al Cu de este acidófilo. Álvarez y Jerez (2004) reportaron que cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crece en presencia de Cu en el medio existe degradación de polifosfatos por la enzima exopolifosfatasa (PPX) generando monómeros de fosfato inorgánico. Éstos se unirían al metal y serían bombeados fuera de la célula a través de transportadores metal-fosfato tal como se ha propuesto para *E. coli* (Keasling, 1997).

También, sería interesante investigar la respuesta de estas cepas de *A. ferrooxidans* a otros metales. Específicamente, en la IG de la cepa ATCC 53993, existe un posible sistema de resistencia al Hg. Al igual que lo analizado para la resistencia al Cu, sería interesante investigar la expresión y funcionalidad de estos determinantes de resistencia en esta cepa. Por otra parte, también se podría analizar la respuesta de estos determinantes de resistencia al Cu y Hg, pero cuando estas cepas crecen en presencia de otros metales, tales como el Zn, Co o Cd. Se ha reportado que estos determinantes podrían transportar o unirse a mas de un metal (Rensing y Grass, 2003).

En cuanto a las comparaciones en el crecimiento de ambas cepas de *A. ferrooxidans* en presencia de metales, se podrían determinar las abundancias relativas de ambas cepas cuando crecen en sustratos energéticos similares a los que estos microorganismos encuentran en sus nichos ecológicos, como la calcopirita.

## 5 Conclusiones

1. *A. ferrooxidans* ATCC 53993 muestra una mayor resistencia al Cu que la cepa ATCC 23270, cuando se crecen en un medio con Cu y hierro como fuente de energía. Esta mayor resistencia al Cu de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 le otorga una ventaja adaptativa. Cuando la cepa ATCC 53993 se crece en mezcla junto a la cepa ATCC 23270 y en presencia de Cu, este último microorganismo tiende a desaparecer, siendo reemplazado por las células de la cepa ATCC 53993.

2. Ambas cepas de *A. ferrooxidans* muestran inducción de los sistemas de resistencia al Cu cuando se crecen en un medio con este metal. Los sistemas de eflujo tipo *Cus* y las chaperonas de Cu presentan la mas alta inducción entre los determinantes de resistencia evaluados, siendo probablemente el sistema resistencia al Cu de mayor importancia en este microorganismo.

3. Los determinantes de resistencia *copA3<sub>Af</sub>* y *cusF4<sub>Af</sub>* encontrados en la IG de la cepa ATCC 53993 aumentan su expresión genética en presencia de Cu. Estos determinantes, junto con *cusF3<sub>Af</sub>*, aumentan la resistencia al Cu de cepas de *E. coli* sensibles al metal cuando se induce la expresión heteróloga de estos genes de *A. ferrooxidans* en estas células. Es probable que estos determinantes participen activamente en la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y que por tanto la presencia de esta IG le otorgue una ventaja adaptativa a esta cepa de *A. ferrooxidans*.

## 6 Bibliografía.

- Andersen, CL., Jensen, J.L. y Ørntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR Data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* **64**:5245-5250.
- Argüello, J.M., Eren, E. y Gonzáles-Guerrero, M. 2007. The structure and function of heavy metal transport P<sub>1B</sub>-ATPases. *Biometals.* **20**:233-248.
- Álvarez, S. y Jerez, C.A. 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5177-5182.
- Boyd, F.E., Almagro-Moreno, S. y Parent, M. 2008. Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends Microbiol.* **17**:47-53
- Burrus, V., Guillaume, P., Decaris, B. y Guedón. 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* **46**:601-610
- Chisholm, I., Leduc, L. y Ferroni, G. 1998. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie. Leeuwenhoek.* **73**:245-254.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159
- Das, A. y Modak, J.M. 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie. Leeuwenhoek* **73**: 215-222.
- Dobrint, U., Hochhut, B., Hentschel, U. y Hacker, J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev.* **2**:414-424
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R, y Bond, P.L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organism. *Microbiology* **149**:1959-1970.
- Ferguson, S. J. y Ingledew, W. J. 2008. Energetic problems faced by microorganisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm. *Biochim. biophys. acta.* **12**: 1471-1479.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C. y Nies, D.H. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **13**:3804-3812.

- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O. y Toussaint, A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Rev.* **3**:722-732.
- Harvey, P. I. y Crundwell, F. K. 1996. The effect of As (III) on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* in an electrolytic cell under controlled redox potential. *Min. Eng.* **9**:1059–1068.
- Johnson, D.B, y Hallberg, K.B. 2003. The microbiology of acidic waters. *Res. Microbiol.* **154**:466-473.
- Juhas, M., Power, P.M., Harding, R.M., Ferguson, D.J.P., Dimopoulou, I.D., Elamin, A.R.E., Mohd-Zain, Z., Hood, D.W., Adegbola, R., Erwin, A., Smith, A., Munson, R., Harrison, A., Mansfield, L., Bentley, S. y Crook, D.W. 2007. Sequence and functional analyses of *Haemophilus* spp. genomic islands. *Genome Biol.* **8**:R237
- Juhas, M., van der Merr, J.R., Gailard, M., Harding, R.M., Hood, D.W. y Crook D.W. 2008. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 376-393
- Keasling, J.D. 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. New York Acad. Sci.* **829**:242-249.
- Kulathila, R., Kulathila, R., Indic, M. y van den Berg, B. 2011. Crystal structure of *Escherichia coli* CusC, the other membrane component of a heavy metal efflux pump. *Plos one.* **6**:e15610
- Laing, E., Mersinias, V., Smith, C.P. y Simon, J.H. 2006. Analysis of gene expression in operon of *Streptomyces coelicolor*. *Genome Biol.* **7**:r46
- Long, F., Su, C.C., Zimmermann, M.T., Boyken, S.E., Kanagalaghatta, R., Rajashankar, R., Jernigan, R.L. y Yu, E.W. 2010. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest methionine-mediated metal transport. *Nature.* **467**:484-488
- Luo, Y., Liu, C., Zhang, H., Luo, H. Guan, H., Liao, G., Qiu, G. y Liu, X. 2008. Insights into two high homogenous genes involved in Cu homeostasis in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* **57**:274-280.
- Magnani, D. y Solioz, M. 2007. How bacteria handle copper. En Nies,D., Silver (Eds). *Molecular microbiology of heavy metals*. Páginas: 259-285. Springerlink Verlag, Berlín.
- Navarro, C. 2009. Determinantes de resistencia al cobre en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Tesis Doctoral. USACH.

- Navarro, C., Orellana, L.H., Mauriaca, C. y Jerez, C.A. 2009. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:6102-6109.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:730-750.
- Nolan, T., Hands, R.E. y Bustin, S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protoc.* **3**:1559-1582.
- Orell, A., Navarro, C.A., Arancibia, R., Mobarec, J.C. y Jerez, C.A. 2010. Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnol. adv.* **28**:839-848
- Orellana, L. 2010. Estudio de la expresión de potenciales genes de resistencia al cobre en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Paulino, L.C., De Mello, M.P. y Ottoboni, L.M. 2002. Differential gene expression in response to Cu in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis* **23**:520-527.
- Puig, S. y Rees, E.R. 2002. The ABCDSs of periplasmic copper trafficking. *Structure.* **10**:1292-1295.
- Rensing, C. y Grass, G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of Cu homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:197-213.
- Remonsellez, F., Orell, A. y Jerez, C.A. 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archeon *Sulfolobus metallicus*: posible role of the polyphosphate metabolism. *Microbiology* **152**:59-66.
- Roche molecular biochemicals. Absolute quantification with external standards. Roche Technical Note LC 11/2000.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. y Sand, W. 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:239-248.
- Solioz, M. y Stoyanov, J.V. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:183-195.
- Smith, M.C.M. y Thorpe, H.M. 2002. Diversity in the serine recombinasas. *Mol. Microbiol.* **44**:299-307

- Stoyanov, J.V., Hobman, J.L. y Brown, N.L. 2001. CueR (Ybb1) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the Cu exporter CopA. *Mol. Microbiol.* **39**:502-511.
- Valdés, J., Cárdenas, J.P., Quatrini, R., Esparza, M., Osorio, H., Duarte, F., Lefimil, C., Sepúlveda, R., Jedlicki, E. y Holmes, D.S. 2010. Comparative genomics begins to unravel the ecophysiology of bioleaching. *Hydrometallurgy.* **104**:471-476
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guilian, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. y Jerez, C.A. 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* **24**:197-211.
- Van Houdt, R., Monchy, S., Leys, N. y Mergeay, M. 2009. New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria. *Antonie. Leeuwenhoek* **96**:205-226.
- Van Veen, H.W. 1997. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie. Leeuwenhoek.* **72**: 299-315.
- Wenbin, N., Dejuan, Z., Leifan, I., Lei, C.P., Xiaoxuan, Y. y Honhyu. L. 2011. Quorum-sensing systema in *Acidithiobacillus ferrooxidans* involved in its resistance to Cu<sup>+2</sup>. *Lett Appl Micro.* doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03066.x
- Whelan, J.A., Russell, N.N.B. y Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR, *J. Immunol. Methods.* **278**: 261-269.
- Wilfinger, WW., Mackey, K. y Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**:474-481.
- Wozniak, R.A.F. y Waldor M.K.2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Rev.* **8**:552-563.

## 7 Anexos

### Tablas

**Tabla A1.** Partidores utilizados en los experimentos de q-RT-PCR y clonamiento.

Nombre	Partidor Directo	Partidor Reverso	Uso
Lferr0167.E2 ( <i>copA3<sub>Af</sub></i> )	GCTACTCTTGCCTTTACG	TCGCCATCGACGATCAGA	q-RT-PCR
Lferr0199.E2 ( <i>cusF4<sub>Af</sub></i> )	TCTGCTGTGCTTTTCGGCTAT	GATGGTATTCTTTGCGAAGTCA	q-RT-PCR.
Lferr0186	CAAGTCGGAGAAACCGTGAT	GACACACCCGAAGGTGGTAT	q-RT-PCR.
<i>cusF<sub>Af</sub></i>	TGGACAAATATGGGCACCGT	GCGTGACCCTGGTGATGAC	q-RT-PCR
<i>copA<sub>Af</sub></i>	TCAGCGATGAGCGGATCGCG	TCTCCGCCTTTTGTCCAGGG	q-RT-PCR
<i>cusC<sub>Af</sub></i>	CGCAAATCGCGGCAGATCC	CGCTGACCGTGACTTCCG	q-RT-PCR
16S rRNA	TGGTGCCTACGTACTGAGTG	CCGAAGGGCACTTCCGCA	q-RT-PCR
<i>cyc2<sub>Af</sub></i>	TCACACATCCTACCCGAGT	ATGAGCAGACCGACGCTGTT	q-RT-PCR
<i>alaS<sub>Af</sub></i>	GCGGCACCATACCTCTTC	GCCTCATCATCCTCCTCGT	q-RT-PCR
Afe1334	CTCGCCAAACTCGCCAAC	CTGAATGCCCGTCTCCTG	qPCR
Pre-Lferr0167	TCTGGGGTATGGATGTGGAT	CTGGCTCAAGAGGGATTACG	Clonamiento
Lferr0167	ATGGACCATTCGGGACATCAG	CTAGGCGGTGAGCCGAACCCT	Clonamiento
Pre-cus	TCTTCCCCACTCTCCGAGTT	TGGTATTCTCCGATGGGCCG	Clonamiento
Lferr0174	ATGAAACGTTTTTATCTCA	TCATTGCCTGACCGGCGTGA	Clonamiento
Pre-lferr2404	TCATCTGGTGGTCACGCATTCAGAT	ATGAGAAAACGAACCTGCGGAGAG	Clonamiento
Lferr2404	ATGGACCACGCGCGACATCAG	CTAGGCGGTGAGCCGAACCCT	Clonamiento
Pre-lferr2066	GGAAGGGATGAATACCTGAAA	GTCTCTATAACCGTCTTGCTGG	Clonamiento
Lferr2066	ATGGACCATTCGGGACATC	CTAGGCGGTGAGCCGAACCCT	Clonamiento
Pre-lferr0199	GGGCAAACCTTCGATTACAA	CGCTGATCAACAACCTGAAA	Clonamiento
Lferr0199	ATGAAACATTTTTATCTCA	TTATGGCGCTGCAGGCGTGA	Clonamiento
<i>cusF E. coli</i>	ATGAAAAAAGCACTGCAAGT	TTACTGGCTGACTTTAATATC	Clonamiento
<i>copA E. coli</i>	ATGTCACAACTATCGACCTGA	TTATTCCTTCGGTTAAACC	Clonamiento

**Tabla A2.** Descripción de los genes encontrados en la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993<sup>1</sup>

ORF	Coord. inicio	Coord. term.	Hebra	GC	Descripción
Lferr_0127	119749	121077	-	0.65	Enzima modificadora de tRNA tipo MiaB-like tRNA (YliG)
Lferr_0128	121095	122675	+	0.58	Resolvasa
Lferr_0129	122703	122993	-	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0130	122990	123085	-	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0131	123085	123309	-	0.63	Proteína hipotética
Lferr_0132	123504	123794	+	0.47	Proteína hipotética
Lferr_0133	123791	124138	+	0.53	Proteína hipotética
Lferr_0134	124221	124679	-	0.54	Regulador Transcripcional (familia XRE)
Lferr_0135	124730	124861	-	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0136	125101	126162	+	0.58	Proteína hipotética
Lferr_0137	126173	127027	+	0.62	Dominio IstB, proteína de unión a ATP
Lferr_0138	127024	128220	+	0.57	Proteína hipotética
Lferr_0139	128217	129107	+	0.57	DNA Metiltransferasa (Clase D12 adenina específica) (EC:2.1.1.72)
Lferr_0140	129170	129664	+	0.61	Proteína de unión a hebra simple
Lferr_0141	130607	131815	-	0.5	Proteína hipotética
Lferr_0142	131809	133446	-	0.47	Proteína hipotética
Lferr_0143	133473	135074	-	0.5	Proteína hipotética
Lferr_0144	135071	136750	-	0.52	Proteína de transposición C tipo Tn7
Lferr_0145	136991	137407	-	0.55	Proteína de la familia de las Transposasas
Lferr_0146	137517	138020	-	0.61	Proteína hipotética
Lferr_0147	138282	138935	+	0.52	Regulador transcripcional (familia TetR)
Lferr_0148	138928	139215	+	0.5	Proteína hipotética
Lferr_0149	139270	140589	+	0.62	Proteína hipotética
Lferr_0150	140711	141025	+	0.57	Transposasa IS4
Lferr_0151	141169	141801	+	0.53	Proteína hipotética
Lferr_0152	141847	143166	+	0.54	Amino oxidasa (EC:1.3.3.4)
Lferr_0153	143186	144202	+	0.56	Epimerasa/dehidratasa dependiente de NAD (EC:1.1.1.219)
Lferr_0154	144897	146084	-	0.63	Porina OprB selectiva a carbohidrato
Lferr_0155	146114	146818	-	0.63	Transportador tipo MgtC/SapB
Lferr_0156	146835	147035	-	0.59	Proteína hipotética
Lferr_0157	147046	148416	-	0.6	Proteína de macrofago asociado a resistencia natural
Lferr_0158	148603	148905	+	0.51	Proteína hipotética
Lferr_0159	148974	149381	-	0.56	Regulador transcripcional (familia MerR)
Lferr_0160	149482	149919	+	0.55	Proteína de resistencia a mercurio MerC
Lferr_0161	149933	151354	+	0.6	Oxido reductasa piridina nucleotido-disulfuro FAD (EC:1.16.1.10)
Lferr_0162	151506	152192	-	0.59	Proteína de transporte/detoxicación de metales pesados
Lferr_0163	152206	152643	-	0.55	Proteína de resistencia a mercurio MerC
Lferr_0164	152744	153151	+	0.55	Regulador transcripcional (familia MerR)
Lferr_0165	153522	154436	-	0.56	Dominio GroES Alcohol dehidrogenasa (EC:1.1.1.1)
Lferr_0167	155529	157553	-	0.62	ATPasa de Cobre tipo P (EC:3.6.3.4)
Lferr_0168	157841	158104	-	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0170	159251	160561	+	0.63	Proteína eflujo membrana externa
Lferr_0171	160558	161874	+	0.64	Transportador Eflujo (familia RND, subunidad MFP)
Lferr_0172	161867	164977	+	0.62	Bomba de eflujo metales pesados (familia Czca)

ORF	Coord. inicio	Coord. term.	Hebra	GC	Descripción
Lferr_0173	165003	165749	+	0.61	citocromo B561
Lferr_0174	165878	166240	+	0.57	Proteína hipotética
Lferr_0175	166355	166663	+	0.45	Proteína hipotética
Lferr_0176	166806	166982	-	0.56	Transposasa
Lferr_0177	167196	168023	+	0.58	Proteína hipotética
Lferr_0178	168476	168706	+	0.55	Proteína hipotética
Lferr_0179	168756	168959	+	0.51	Proteína hipotética
Lferr_0180	169230	169700	+	0.61	Transposasa ISPsy14
Lferr_0181	169876	171033	+	0.57	Region catalítica de Integrasa
Lferr_0182	171179	171448	+	0.62	Regulador transcripcional (familia XRE)
Lferr_0183	171700	174798	-	0.62	Proteína de resistencia a acriflavina
Lferr_0184	174839	175966	-	0.66	Proteína hipotética
Lferr_0185	175963	177420	-	0.63	Proteína de eflujo membrana externa
Lferr_0186	177420	179432	-	0.68	ATPasa de metales pesados tipo P ( EC:3.6.3.3 )
Lferr_0187	179462	179845	-	0.6	Regulador transcripcional (ArsR family)
Lferr_0188	180170	181318	+	0.68	aminotransferasa clase V( EC:2.8.1.7 )
Lferr_0189	181318	181959	+	0.67	Metiltransferasa tipo 11
Lferr_0190	182109	182792	-	0.59	Tipo Glutaredoxin 2
Lferr_0191	182923	183297	+	0.58	Regulador transcripcional (familia ArsR)
Lferr_0192	183288	183533	+	0.58	Proteína hipotética
Lferr_0193	183550	184158	+	0.67	Metiltransferasa tipo 11
Lferr_0194	184233	184730	+	0.58	Proteína hipotética
Lferr_0195	184835	186019	+	0.45	Oxido reductasa piridina nucleotido-disulfuro FAD dep.
Lferr_0196	186312	187421	-	0.59	transposasa familia IS4
Lferr_0197	187640	187849	-	0.55	Proteína hipotética
Lferr_0198	187846	188259	-	0.54	Proteína hipotética
Lferr_0199	188597	188971	-	0.52	Proteína hipotética
Lferr_0200	189317	190834	-	0.49	Proteína con repetidos TPR
Lferr_0201	191343	191657	-	0.57	transposasa IS4
Lferr_0202	191779	193098	-	0.62	Proteína hipotética
Lferr_0203	193249	194439	-	0.59	Proteína hipotética
Lferr_0204	194699	195004	+	0.66	proteína función desconocida DUF214
Lferr_0205	194997	195698	+	0.64	relacionado con transportador ABC
Lferr_0206	195688	196191	+	0.6	Proteína con dominio redoxina
Lferr_0207	196205	196660	+	0.55	tioredoxina:biogénesis de citocromo c
Lferr_0208	196917	197318	+	0.59	Regulador transcripcional (familia ArsR)
Lferr_0209	197318	199225	+	0.67	ATPasa de metales pesado tipo P( EC:3.6.3.3 )
Lferr_0210	199264	199656	+	0.6	proteína de función desconocida DUF302
Lferr_0211	199712	199951	+	0.53	Proteína hipotética
Lferr_0213	201226	201552	+	0.44	ferredoxina putativa 2Fe-2S
Lferr_0214	201687	202172	+	0.47	pyridoxamina 5'-fosfato tipo oxidasa unión FMN
Lferr_0215	202263	203846	+	0.63	Region catalítica de Integrasa
Lferr_0216	203843	204613	+	0.6	Dominio IstB, proteína de unión a ATP
Lferr_0217	204704	205024	+	0.49	Proteína hipotética
Lferr_0218	205275	205529	-	0.71	Proteína hipotética
Lferr_0219	205567	206013	-	0.61	Proteína hipotética
Lferr_0220	206171	206533	+	0.51	Proteína hipotética
Lferr_0221	206554	208740	-	0.52	Proteína transposición B tipo Tn-7
Lferr_0222	208744	209589	-	0.52	Endonucleasa TnsA
Lferr_0223	209714	210067	-	0.46	Proteína hipotética

ORF	Coord. inicio	Coord. term.	Hebra	GC	Descripción
Lferr_0224	210058	210462	-	0.38	Proteína hipotética
Lferr_0225	210455	211240	-	0.37	Proteína hipotética
Lferr_0226	211285	213567	-	0.56	Subunidad de proteína de restricción tipo III ( EC:3.1.21.3 )
Lferr_0227	213578	214765	-	0.45	Dominio modificación por restricción del DNA (EC:3.1.21.3)
Lferr_0228	214762	216216	-	0.56	N-6 DNA metilasa ( EC:2.1.1.72 )
Lferr_0229	216318	216692	-	0.53	Dominio de proteína PilT
Lferr_0230	216689	216886	-	0.58	Proteína hipotética
Lferr_0231	217281	217469	-	0.68	Proteína hipotética
Lferr_0232	217862	218302	+	0.61	Acetiltransferasa fosfolípido/glicerol
Lferr_0233	218478	219050	-	0.63	Proteína hipotética
Lferr_0234	219051	219515	-	0.62	Dominio para la unión al DNA (familia excionasa)
Lferr_0235	219948	225098	+	0.62	dominio de función desconocida DUF1738
Lferr_0236	225160	225798	+	0.62	Proteína hipotética
Lferr_0237	225806	226345	+	0.63	Proteína hipotética
Lferr_0238	226342	226620	+	0.59	Proteína hipotética
Lferr_0239	226631	227005	+	0.58	Proteína hipotética
Lferr_0240	226995	228848	+	0.59	Proteína hipotética
Lferr_0241	228913	229755	+	0.62	Proteína hipotética
Lferr_0242	229752	231332	+	0.62	Proteína tipo relaxasa VirD2 (vía de secreción tipo IV)
Lferr_0243	231404	231856	+	0.61	Proteína hipotética
Lferr_0244	231853	232821	+	0.62	ATPasa tipo P conjugativa TrB
Lferr_0245	232898	233284	+	0.66	Proteína para la transferencia por conjugación TrbC
Lferr_0246	233288	233665	+	0.61	Proteína hipotética
Lferr_0247	233665	236187	+	0.61	Componente CagE TrbE VirB del sistema de transporte tipo IV
Lferr_0248	236184	237347	+	0.62	Proteína hipotética
Lferr_0249	237429	238169	+	0.59	Proteína de conjugación tipo P TrbJ
Lferr_0250	238181	238435	+	0.58	Proteína hipotética
Lferr_0251	238449	240140	+	0.63	Proteína de transferencia tipo P TrbL
Lferr_0252	240217	240615	+	0.57	Proteína hipotética
Lferr_0253	240612	240953	+	0.6	Proteína de función desconocida DUF167
Lferr_0254	241275	242114	+	0.47	Proteína con dominio tipo TIR (Toll-Interleukin 1-resistance)
Lferr_0255	242238	243125	-	0.45	Proteína hipotética
Lferr_0256	243472	244140	+	0.6	Proteína de transferencia por conjugación
Lferr_0257	244153	245253	+	0.6	Proteína de transferencia por conjugación TrbG/VirB9/CagX
Lferr_0258	245255	246265	+	0.61	Proteína hipotética
Lferr_0259	246268	247677	+	0.63	Proteína de conjugación de la familia TrbI
Lferr_0260	247688	247990	+	0.64	Proteína hipotética
Lferr_0261	247987	248664	+	0.64	Transglicosilasa lítica catalítica
Lferr_0262	248675	251104	+	0.6	Proteína de la familia TRAG
Lferr_0263	251433	251621	+	0.62	Proteína hipotética
Lferr_0264	251621	251917	+	0.58	Sistema de estabilización de plasmidios
Lferr_0266	253330	254967	-	0.6	transposasa IS66
Lferr_0267	255017	255364	-	0.6	Proteína de la familia IS66 Orf2
Lferr_0268	255355	255687	-	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0270	257291	258190	-	0.59	Fosfolipase D

ORF	Coord. inicio	Coord. term.	Hebra	GC	Descripción
Lferr_0271	258518	258775	-	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0272	258859	260097	-	0.61	Proteína de partición tipo parB
Lferr_0273	260099	260869	-	0.58	Ácido cobirínico ac-diamida sintasa
Lferr_0274	260872	261267	-	0.6	Proteína hipotética
Lferr_0275	261316	261627	-	0.57	Proteína hipotética
Lferr_0276	261781	262371	-	0.61	Proteína de la vía de secreción tipo proteasa TraF
Lferr_0277	262343	262555	-	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0279	262844	264202	-	0.62	Proteína de la familia TraB
Lferr_0280	264199	264792	-	0.61	Proteína hipotética
Lferr_0282	265276	265572	+	0.59	Regulador transcripcional putativo
Lferr_0283	266349	268403	-	0.6	DNA topoisomerasa III( EC:5.99.1.2 )
Lferr_0284	268616	268861	-	0.49	Proteína hipotética
Lferr_0285	268864	269637	-	0.52	proteína fofatasa serina/treonina
Lferr_0286	270086	270589	+	0.52	Proteína hipotética
Lferr_0287	270589	272049	+	0.53	Proteína hipotética
Lferr_0288	272042	273073	+	0.52	Factor transcripcional MdcH
Lferr_0289	273095	273844	+	0.51	Proteína de función desconocida DUF262
Lferr_0290	273853	275316	+	0.48	Proteína hipotética
Lferr_0291	275638	276117	+	0.45	Proteína hipotética
Lferr_0292	276869	277819	+	0.55	Proteína hipotética
Lferr_0293	277816	278763	+	0.52	Polimerasa de DNA dependiente de RNA (Transcriptasa Reversa)
Lferr_0294	278957	281278	+	0.57	Endonucleasa dependiente de ATP (familia OLD)
Lferr_0295	281275	283164	+	0.57	Proteína hipotética (EC:3.6.1)
Lferr_0296	283488	283793	-	0.57	Proteína hipotética
Lferr_0297	283968	284141	+	0.52	Proteína hipotética
Lferr_0298	284128	284658	+	0.56	Proteína hipotética
Lferr_0299	284755	285138	-	0.64	Proteína fijadora de nitrógeno con dominio NifU

<sup>1</sup> Los datos se obtuvieron desde <http://www.jgi.doe.gov/>. En rojo se indican los genes que delimitan la IG de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. La posición de los ORF en el genoma se muestran por la posición del primer nucleótido en "Coord inicio" y la posición del último en "Coord term".

**Tabla A3.** Determinación del tiempo generacional para en crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia de Cu<sup>1</sup>.

Condición de Cultivo (mM Cu)	Tiempo generacional (h <sup>-1</sup> )
0	16,7
5	16,6
25	15,9
100	17,7
200	17,6

**A**

Condición de cultivo (mM Cu)	Tiempo Generacional (h <sup>-1</sup> )
0	14,4
5	19,7
25	N.D
100	N.D

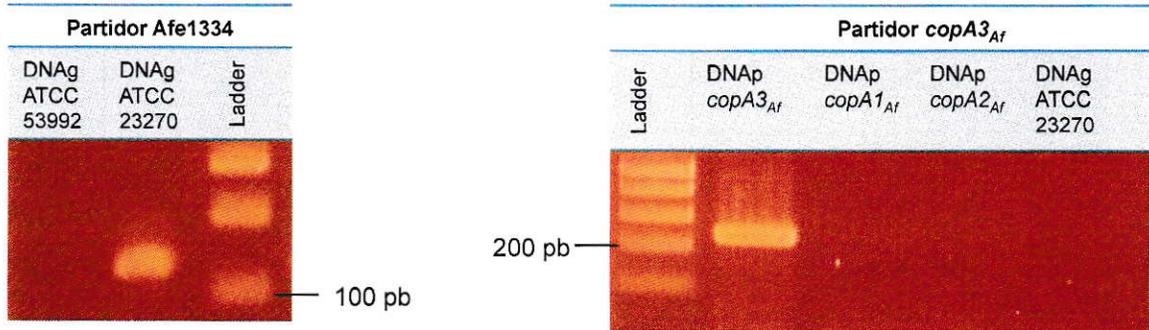
**B**

<sup>1</sup>En A se muestra el tiempo generacional determinado para la cepa ATCC 53993 y en B para la cepa ATCC 232270 de *A. ferrooxidans*. Cada valor fue obtenido desde la pendiente entre los puntos que presentan un comportamiento lineal en la representación gráfica. Cada valor corresponde al promedio de tres replicas biológicas. N.D: no determinado.

**Tabla A4.** Abundancia relativa de las cepas ATCC 53993 y ATCC 23270 en mezcla de cultivos.

Gen específico	Cepa	Control		50 mM Cu	
Lferr0167	53993	$1.4 \times 10^5$	$\pm 3.8 \times 10^4$	$3.2 \times 10^5$	$\pm 4.5 \times 10^4$
Afe1334	23270	$2.0 \times 10^5$	$\pm 2.1 \times 10^4$	$4.9 \times 10^4$	$\pm 5.0 \times 10^3$
	Suma	$3.4 \times 10^5$	$\pm 4.3 \times 10^4$	$3.6 \times 10^5$	$\pm 4.6 \times 10^4$
<i>cyc2<sub>Af</sub></i>	Ambas	$2.4 \times 10^5$	$\pm 3.9 \times 10^4$	$3.7 \times 10^5$	$\pm 8.1 \times 10^4$

## Figuras



**Figura A1.** Comprobación de la especificidad de los partidores seleccionados para la amplificación de zonas exclusivas de cada cepa de *A. ferrooxidans*.

# A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage

Luis H. Orellana · Carlos A. Jerez

Received: 16 June 2011 / Revised: 5 July 2011 / Accepted: 15 July 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** There is great interest in understanding how extremophilic biomining bacteria adapt to exceptionally high copper concentrations in their environment. *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 genome possesses the same copper resistance determinants as strain ATCC 23270. However, the former strain contains in its genome a 160-kb genomic island (GI), which is absent in ATCC 23270. This GI contains, amongst other genes, several genes coding for an additional putative copper ATPase and a Cus system. *A. ferrooxidans* ATCC 53993 showed a much higher resistance to CuSO<sub>4</sub> (>100 mM) than that of strain ATCC 23270 (<25 mM). When a similar number of bacteria from each strain were mixed and allowed to grow in the absence of copper, their respective final numbers remained approximately equal. However, in the presence of copper, there was a clear overgrowth of strain ATCC 53993 compared to ATCC 23270. This behavior is most likely explained by the presence of the additional copper-resistance genes in the GI of strain ATCC 53993. As determined by qRT-PCR, it was demonstrated that these genes are upregulated when *A. ferrooxidans* ATCC 53993 is grown in the presence of copper and were shown to be

functional when expressed in copper-sensitive *Escherichia coli* mutants. Thus, the reason for resistance to copper of two strains of the same acidophilic microorganism could be determined by slight differences in their genomes, which may not only lead to changes in their capacities to adapt to their environment, but may also help to select the more fit microorganisms for industrial biomining operations.

**Keywords** Genomic islands · Copper resistance · *Acidithiobacillus ferrooxidans* 23270 · *Acidithiobacillus ferrooxidans* 53993

## Introduction

When cellular copper concentration exceeds acceptable levels, mechanisms of resistance are activated in order to survive this adverse environment (Rensing and Grass 2003; Magnani and Solioz 2007). In Gram-negative bacteria, one of the pathways described for Cu resistance is the active efflux of metal from the cytoplasm to the periplasmic space, carried out by ATPases located in the internal membrane of the bacteria (Rensing and Grass 2003). Some microorganisms may pump metal from the cytoplasm directly to the extracellular space by systems of the resistance nodulation cell division (RND) family of carriers, the Cus system of *Escherichia coli* being the best known of this kind of detoxification organization (Outten et al. 2001). The capacity of some species to bind the metal in the periplasmic space by means of copper chaperones has also been reported (Puig et al. 2002).

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a Gram-negative, acidophilic chemolithoautotroph that can use ferrous iron,

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00253-011-3494-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. H. Orellana · C. A. Jerez (✉)  
Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology,  
Department of Biology, and Millennium Institute for Cell  
Dynamics and Biotechnology, Faculty of Sciences,  
University of Chile,  
Santiago, Chile  
e-mail: cjerez@uchile.cl

reduced species of sulfur, or metal sulfides as energy sources (Rohwerder et al. 2002; Rawlings 2005; Valenzuela et al. 2006; Jerez 2008). *A. ferrooxidans* can resist exceptionally high copper (up to 800 mM CuSO<sub>4</sub>) and other metal concentrations (Orell et al. 2010). This property is important for the use of this microorganism in biomining processes, where copper levels usually range between 15 and 100 mM CuSO<sub>4</sub> (Watling 2006).

Current knowledge indicates that key elements involved in copper resistance of *A. ferrooxidans* appear to be a wide repertoire of known copper-resistance determinants and their duplication, the presence of novel copper chaperones, and abundant reserve of inorganic polyphosphate (polyP) used in a polyP-based copper-resistance system and as a defensive response to oxidative stress (Alvarez and Jerez 2004; Orell et al. 2010). *A. ferrooxidans* ATCC 23270 can survive high copper concentrations by having in its genome at least ten genes that are possibly related to copper homeostasis. These include three genes coding for putative ATPases related to the transport of copper (*copA1<sub>Af</sub>*, *copA2<sub>Af</sub>*, and *copB<sub>Af</sub>*), three genes related to a system of the RND family, involved in the expulsion of copper from the cell (*cusA<sub>Af</sub>*, *cusB<sub>Af</sub>*, *cusC<sub>Af</sub>*), and two genes coding for periplasmic chaperones for this metal (*cusF<sub>Af</sub>* and *copC<sub>Af</sub>*) (Navarro et al. 2009). The expression of most of these open reading frames (ORFs) was studied by real-time RT-PCR (qRT-PCR) using *A. ferrooxidans* cells that were adapted to grow in the presence of high concentrations of CuSO<sub>4</sub>. These *A. ferrooxidans* copper-resistance determinants were found to be upregulated when this bacterium was exposed to CuSO<sub>4</sub> in the range of 5 to 25 mM and conferred *E. coli* a greater resistance to copper compared to wild-type cells, supporting their functionality (Navarro et al. 2009).

The genomic sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 has recently been annotated (<http://www.jgi.doe.gov/>). This strain contains all the copper-resistance genes present in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 that have been experimentally confirmed as being expressed in the presence of copper (Luo et al. 2008; Navarro et al. 2009; Orell et al. 2010). These ORFs have 100% identity between their corresponding DNA sequences. However, *A. ferrooxidans* ATCC 53993 contains several additional putative metal-resistance ORFs. These putative genes are clustered in a DNA region or genomic island (GI) that is absent in the genome of *A. ferrooxidans* strain ATCC 23270 (Orell et al. 2010; Cardenas et al. 2010). It is well known that in general, GIs influence traits such as antibiotic resistance, symbiosis, fitness, and adaptation in pathogenic and environmental microorganisms (Dobrindt et al. 2004). Genomic strain variations have also been found in the acidophilic *Leptospirillum* group II by deep metagenomic genome sequence analysis (Simmons et al. 2008). Therefore, it is possible that horizontal gene transfers between

these and other microorganisms are key elements to supplement metal resistance and possibly other properties, thus conferring adaptational advantages to these acidophiles.

The aims of this work were to compare copper resistance in *A. ferrooxidans* strains ATCC 23270 and ATCC 53993 and to correlate this property with the presence or absence of a given GI in the bacteria, which may lead to changes in the adaptability of the microorganisms to their environment.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

Both strains of *A. ferrooxidans* (ATCC 23270 and ATCC 53993) were grown at 30°C in 9K medium containing ferrous sulfate at pH 1.5 in the absence or presence of CuSO<sub>4</sub> as previously described (Ramirez et al. 2002; Vera et al. 2008; Navarro et al. 2009).

### Whole-genome alignments

The annotated genomes of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://cmr.jcvi.org/>) and *A. ferrooxidans* ATCC 53993 ([www.jgi.doe.gov/](http://www.jgi.doe.gov/)) were used to perform whole-genome alignment using Mauve software (Darling et al. 2010). Whole-genome representations and gene context graphics were carried out using the Geneious PRO 4.7 software.

### Extraction of total RNA from *A. ferrooxidans* and cDNA synthesis

To determine the effect of copper on the expression of genes of interest, cells were adapted to grow continuously in the presence of different CuSO<sub>4</sub> concentrations until the late exponential growth phase was reached. At this time, total RNA was extracted from each culture condition by lysing the cells as previously reported (Vera et al. 2008; Navarro et al. 2009) except that TRIzol (Invitrogen) was used for the extraction. Any remaining DNA was eliminated from the RNA preparations by the addition of 4 U of TURBO DNA-free DNase (Ambion) following the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, 0.8 µg of total RNA was reverse transcribed for 1 h at 42°C using ImProm-II (Promega), 0.5 µg of random hexamers (Promega), and 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Vera et al. 2008; Navarro et al. 2009).

### Primer design, real-time RT-PCR, and cloning of *A. ferrooxidans* genes

Primers for qRT-PCR were designed using the Primer3 software (Rozen and Skaletsky 2000). Since *copA* and *Cus*

system genes are highly conserved, it was not possible to design primers able to distinguish individual genes. Therefore, specific primers (Supplementary Table 1) were designed to analyze the global expression of three groups of genes:  $copA_{Af}=copA1_{Af}+copA2_{Af}$ ;  $cusC_{Af}=cusC1_{Af}+cusC2_{Af}+cusC3_{Af}$  (present only in ATCC 53993);  $cusF_{Af}=cusF1_{Af}+cusF2_{Af}+cusF3_{Af}$  (present only in ATCC 53993)+ $cusF4_{Af}$  (present only in ATCC 53993). Additionally, specific primers were developed to analyze the expression of unique genes from strain ATCC 53993:  $copA3_{Af}$ ,  $cusF4_{Af}$ , and Lferr0186 by choosing specific DNA sequences of these genes which are absent in the rest of the genome. Moreover, the specificity of these primers was confirmed by the lack of qPCR reaction products when using genomic DNA isolated from strain ATCC 23270. DNA melting analysis showed a unique amplification product and no amplification signals from non-specific DNA sequences after 30 cycles. Also, after separating PCR products by electrophoresis in a 1% agarose gel (0.5× Tris–acetate–EDTA pH 8.0 buffer), no cross-amplification or non-specific bands were detected.

Copper-resistance gene expression was analyzed by qRT-PCR by using the Corbett Rotor Gene 6000 system as described previously (Navarro et al. 2009), except that the Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) was used. A housekeeping analysis using three genes was carried out using the Normfinder algorithm (Andersen et al. 2004).  $alaS_{Af}$  was selected as a reference gene since its expression was found to be the most stable under our experimental conditions.

*A. ferrooxidans* genes of interest were cloned in vector pBAD-TOPO (Invitrogen) by following the manufacturer's instructions. Ligation reactions and determination of the correct orientation of the genes cloned and the expected sizes for PCR fragments were carried out as described previously (Navarro et al. 2009). All cloned gene insertions were checked by DNA sequencing.

#### Copper resistance, functional assays, and mixed cultures of *A. ferrooxidans* strains

Since there is currently no efficient and reproducible methodology for the generation of knockouts in *A. ferrooxidans*, the functionality of the different putative copper-resistance genes from *A. ferrooxidans* was tested by using heterologous expression in *E. coli*. Copper-sensitive *E. coli* K-12  $\Delta copA$  or  $\Delta cusCFBA/\Delta cueO$  mutants were transformed with vector pBAD-TOPO containing the genes of interest ( $cusF3_{Af}$ ,  $cusF4_{Af}$ , or  $copA3_{Af}$ ) and the minimal inhibitory concentration (MIC) values of these transformants were determined as described before (Navarro et al. 2009).

A mixture of about  $5 \times 10^6$  cells/ml of each *A. ferrooxidans* strain was grown in the absence or presence of  $CuSO_4$ . Relative proportions of each kind of bacterium were

estimated by means of qPCR, by using strain-specific marker primers able to identify each strain in the presence of the other. ORFs AFE1334 and LFERR167 were the DNA marker sequences used for *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and ATCC 53993, respectively. Strain-specificity was confirmed by PCR and qPCR. No cross-reaction between strains was detected by qPCR after 30 cycles of amplification. Three independent cultures for a control and a 50-mM  $CuSO_4$  condition were tested. Cells were collected at the end of the exponential growth phase (approximately  $2 \times 10^8$  cells/ml) by centrifugation at  $5,000 \times g$  for 15 min. Bacteria were then washed and lysed as described before in the RNA preparation section. DNA extractions were performed with the Wizard® Genomic DNA Extraction Kit (Promega), and DNA was quantified by using the Epoch Spectrophotometer System (Biotek). DNA preparations for each condition were used as templates in qPCR reactions. To obtain the relative percentages of each strain in the mixture, the relative marker gene copy numbers were quantified (Whelan et al. 2003). Since each strain contains only a single copy of *cyc2* per cell, this gene was used as a reference to estimate the total numbers of bacteria present in the mixture.

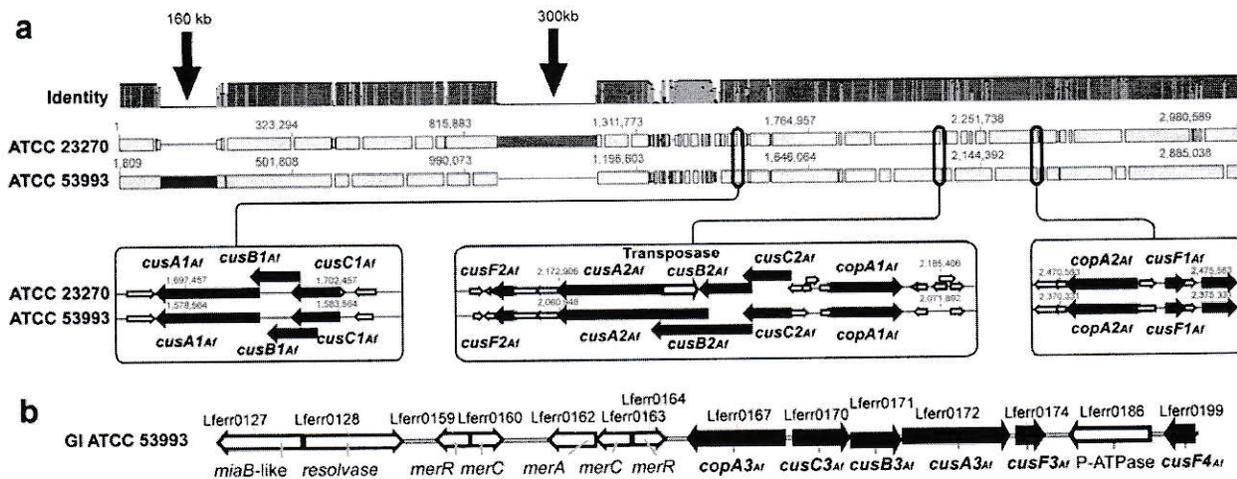
## Results

### Genomic islands in *A. ferrooxidans* strains

Figure 1a shows that *A. ferrooxidans* strain ATCC 53993 contains a GI of about 160 kb which is absent from strain ATCC 23270. Additionally, strain ATCC 23270 has a 300-kb region which is not complementary to the genome of strain ATCC 53993 (Cardenas et al. 2010). Copper-resistance genes previously described for *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Luo et al. 2008; Navarro et al. 2009) are present in both strains. Strain ATCC 23270 contains a second Cus-like operon interrupted by a transposase gene which is absent in the genome of strain ATCC 53993 (central expanded region in Fig. 1a).

Initial bioinformatic analysis of the GI found exclusively in *A. ferrooxidans* ATCC 53993 predicted the presence of genes encoding heavy metal-resistance determinants, such as mercury detoxification (*merA*), extrusion (*merC*), and the transcriptional regulator (*merR*), as well as a copper-translocating P-type ATPase. Amongst the other ORFs, a five-gene cluster potentially encoding arsenic resistance components and heavy metal P-type ATPase were present (Cardenas et al. 2010).

Our more detailed analysis (Fig. 1b) indicates that the GI exclusive to strain ATCC 53993 is inserted after ORF Lferr0127, which has been annotated as an enzyme related to tRNA metabolism (MiaB type). Six ORFs possibly related to Cu resistance in this microorganism are indicated by our



**Fig. 1** Presence of genomic islands in *A. ferrooxidans* strains. **a** Whole-genome alignment of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 and *A. ferrooxidans* ATCC 23270. The upper graph indicates the percentage identity between strains in specific zones along the genome alignment. Vertical black arrows indicate the respective exclusive genomic islands in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 DNA and in strain ATCC 53993.

Expanded segments indicated by vertical rectangles show copper-resistance determinants shared by both strains. **b** Fragment of the GI of *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Copper-resistance genes present in the GI are named with bold lettering and are indicated by large black arrows

proposed function (names in bold letters in Fig. 1b). A P-type ATPase (ORF Lferr0167) was previously annotated as a possible Cu-resistance determinant (Cardenas et al. 2010), and we have named it *copA3Af*. All Cop-like proteins found so far in *A. ferrooxidans*, including CopA3<sub>AB</sub> analyzed in the present communication, contain the metal binding motifs which are highly conserved in Cop proteins from other microorganisms (Orell et al. 2010).

Other ORFs correspond to members of a putative Cus system (*cusA3Af*, *cusB3Af*, and *cusC3Af*). Lferr0174 and Lferr0199 (Fig. 1b) have a strong similarity to CusF-like chaperones previously described in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Navarro et al. 2009). Lferr0186 has been annotated only as a heavy metal P-type ATPase.

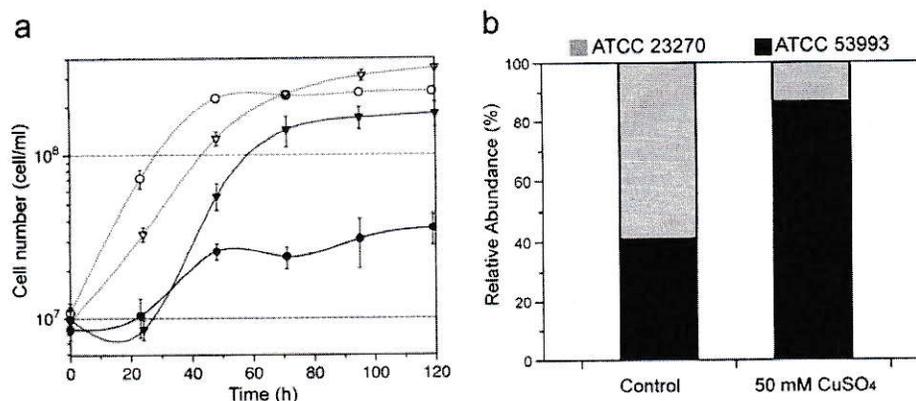
The copper-binding site of *E. coli* CusF contains one His and two Met in addition to an unusual Trp that presumably interacts with copper through a cation- $\pi$  interaction (Xue et al. 2008). All the putative CusF-like proteins from *A. ferrooxidans* strains ATCC 23270 and ATCC 53993 contain a Met instead of a His in their putative binding sites (results not shown). In addition, their amino acid sequences have possible signal peptides, suggesting that all are exported, most likely to the periplasmic space.

#### Effect of copper concentration on growth and survival of *A. ferrooxidans* strains

It is expected that the additional multiplicity of possible copper-resistance determinants in the GI of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 would confer a higher tolerance to the metal compared to strain ATCC 23270. To test this hypothesis, the

growth capacity of both *A. ferrooxidans* strains in the presence of copper was determined. When *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cells, which had not been adapted to grow in the presence of CuSO<sub>4</sub>, were grown in different increasing concentrations of the metal, a 50% inhibition of growth was observed in 10 mM CuSO<sub>4</sub>. On the other hand, *A. ferrooxidans* ATCC 53993 had an equivalent percentage of growth inhibition at a concentration of CuSO<sub>4</sub> higher than 100 mM (results not shown). Figure 2a illustrates the effect of 100 mM CuSO<sub>4</sub> on the growth of both *A. ferrooxidans* strains. In the absence of copper, only minor differences in growth kinetics were observed between the two strains. On the other hand, cell numbers of ATCC 23270 were reduced by sevenfold when grown in 100 mM CuSO<sub>4</sub>, whereas those of ATCC 53993 were diminished by only twofold. This additional capacity of strain ATCC 53993 to tolerate copper should confer it an adaptational advantage when growing in a microbial consortium such as the one usually found in their habitat.

A preliminary test for this idea was carried out by growing a mixture of approximately equivalent numbers of each strain in the absence or presence of copper. The relative proportions of each kind of bacterium were estimated by means of qPCR by using the strain-specific primers. These results are shown in Fig. 2b. Clearly, *A. ferrooxidans* ATCC 53993 was able to outgrow strain ATCC 23270 in the presence of 50 mM CuSO<sub>4</sub> (Supplementary Table 2 shows the relative copy numbers of the strain-specific marker genes). This effect would probably have been much more dramatic at the higher copper concentrations that strain ATCC 53993 can tolerate.



**Fig. 2** Effect of copper on growth of individual and mixed *A. ferrooxidans* strains. **a** *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (empty and filled circles) and ATCC 53993 (empty and filled triangles) were inoculated in a fresh medium in the absence of copper (empty symbols) or in the presence of 100 mM copper (filled symbols). In each case, cells had not been previously exposed to copper. Error bars indicate standard deviations based on three independent cultures for each condition. **b** Effect of copper on a mixed culture of *A. ferrooxidans* strains. A mixed culture of about 1:1 *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (black bars)

and *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (gray bars) was prepared as described in Materials and methods. After incubation and harvesting of the cell mixture, total DNA was extracted, and qPCR was performed to quantify the relative proportions of each strain in the culture. Percentage values were calculated by quantifying the relative copy numbers of the specific marker genes chosen to estimate the relative abundance of each strain. Values are based on three different experimental assays

Higher copper resistance of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 appears to be related to the expression of genes in its exclusive genomic island

Both *cusC<sub>Af</sub>* and *cusF<sub>Af</sub>* groups of genes showed a high upregulation in the presence of copper in both *A. ferrooxidans* strains (Fig. 3a). However, at 5 and 25 mM CuSO<sub>4</sub>, ATCC 23270 showed slightly higher upregulation of these genes compared to ATCC 53993. On the other hand, *copA<sub>Af</sub>* genes showed an unexpected decreased expression with increasing copper concentrations. Obviously, further experimental work is required to understand this observation. A speculative explanation is that in the presence of higher CuSO<sub>4</sub> concentrations, the microorganisms would preferentially use Cu chaperones and the Cus systems instead of the P-type ATPases. In this way, the microorganism can save ATP to respond to the stress caused by the presence of the metal.

If the higher copper resistance of strain ATCC 53993 is due to the additional putative copper-resistance determinants present in its GI, an upregulation of the transcriptional expression of the genes coding for these proteins should be observed when cells are grown in the presence of increasing CuSO<sub>4</sub> concentrations. Genes *copA3<sub>Af</sub>* and *cusF4<sub>Af</sub>* which are present exclusively in the GI of strain ATCC 53993 were also upregulated by the presence of copper. The transcript levels of the putative ATPase *copA3<sub>Af</sub>* increased as a function of a higher CuSO<sub>4</sub> concentration. Additionally, the levels of the copper chaperone *cusF4<sub>Af</sub>* were increased at 5 mM CuSO<sub>4</sub>, and this expression remained relatively constant up to 100 mM CuSO<sub>4</sub> (Fig. 3

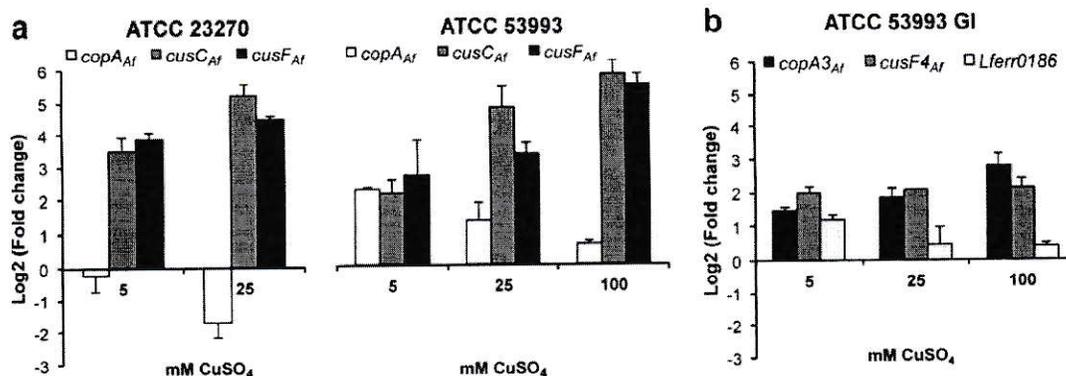
b). On the other hand, ORF Lferr0186 expression was downregulated under the conditions studied. This putative ATPase does not contain the copper-binding amino acid motif common to the known copper P-type ATPases (Orell et al. 2010 and references therein). Therefore, its relationship to Cu resistance if any is currently unknown.

Copper-resistance genes exclusively found in *A. ferrooxidans* ATCC 53993 are functional when expressed in *E. coli*

The possible functionality of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 copper-resistance determinants was studied by their capacity to genetically complement copper-sensitive *E. coli* mutants. Strain  $\Delta copA$  was used to check the functionality of *copA3<sub>Af</sub>*, and strain  $\Delta cueO/\Delta cusCFBA$  was used for that of *cusF3<sub>Af</sub>* and *cusF4<sub>Af</sub>*. Figure 4 shows that when the expression of *copA3<sub>Af</sub>* cloned in the plasmid pBAD-TOPO was induced in *E. coli*  $\Delta copA$ , about a 50% increase in the MIC value was observed compared with the non-induced control. Induction of the expression of the copper chaperones *cusF3<sub>Af</sub>* and *cusF4<sub>Af</sub>* in *E. coli*  $\Delta cueO/\Delta cusCFBA$  increased copper resistance of this microorganism by 78% and 69%, respectively. These results strongly support the functionality of the copper-resistance determinants present in the GI of *A. ferrooxidans* ATCC 53993.

## Discussion

Previous reports have indicated that *A. ferrooxidans* ATCC 23270 resists copper, in part, by the use of a combination of



**Fig. 3** Relative transcript levels of copper-resistance genes present in *A. ferrooxidans*. Expression of copper-resistance genes in both ATCC 23270 and ATCC 53993 strains (a) and those genes exclusive to *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (b) was measured by means of qRT-PCR. Induction ratios were determined by comparing the relative transcript

cDNA levels from each *A. ferrooxidans* strain grown in the copper concentrations indicated versus those obtained in control cells grown in the absence of the metal and normalized by *alaS<sub>Af</sub>* expression in each case. Error bars indicate standard deviations, and values were obtained with three biological replicates

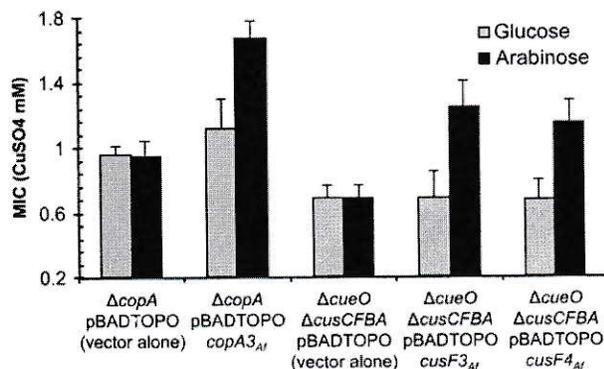
an ample collection of recognized copper-resistance genes (Orell et al. 2010; Wu et al. 2010) and a possible metal-resistance system based on inorganic polyphosphate (Keasling 1997; Alvarez and Jerez 2004; Franke and Rensing 2007). The results presented in this work show that *A. ferrooxidans* ATCC 53993 has a much higher resistance to copper than strain ATCC 23270. Although we cannot currently discount the participation of other unknown genes in the high Cu resistance of strain ATCC 53993, our findings constitute the first experimental evidence for high copper resistance due to the expression of genes present in a GI of an acidophilic chemolithoautotrophic bacterium. There was an increased transcriptional expression of almost

all these genes related to copper resistance. In addition, the possible functionality of some of them was determined by their capacity to confer *E. coli* a higher copper resistance. These results strongly suggest their involvement in higher metal tolerance in *A. ferrooxidans* ATCC 53993. This additional capacity of strain ATCC 53993 to resist copper may confer it an adaptational advantage when growing in a microbial community such as the one normally found in their extreme habitat.

*A. ferrooxidans* strains have been described as being able to grow in extremely high CuSO<sub>4</sub> concentrations (100–800 mM range) (Das et al. 1998; Wu et al. 2010). Other non-acidophilic microorganisms able to grow in the presence of several toxic metals, such as *Cupriavidus metallidurans*, tolerate CuSO<sub>4</sub> in a much lower range (1.5–12.5 mM) (Chen et al. 2008). Nevertheless, this property of *C. metallidurans* has also been attributed to the presence of GIs related to metal resistance (van Houdt et al. 2009). Therefore, this phenomenon may be a general strategy used by environmental microorganisms to tolerate high levels of toxic metals.

It will be of great interest to establish in future studies whether all the remaining putative and hypothetical genes present in the GI of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 have a role in conferring extra resistance, not only to copper but also to several other metals found in bioleaching habitats. Furthermore, the characterization of metal-resistance determinants will not only contribute to our understanding of the mechanisms that acidophilic bioleaching microorganisms use to adapt to their extreme environment but to eventually improve biomining processes as well.

Finally, the study of novel metal-resistance determinants in acidophilic extremophiles will also help with the functional annotation of these genes in the available genomic sequences of biomining extremophiles.



**Fig. 4** Heterologous functional analysis of *A. ferrooxidans* ATCC 53993 genes expressed in copper-sensitive mutants of *E. coli*. Copper-resistance genes present in the GI of *A. ferrooxidans* strain ATCC 53993 were cloned in the pBAD-TOPO vector, and these constructions were used to transform either  $\Delta copA$  or  $\Delta cueO/\Delta cusCFBA$  *E. coli* mutants. Gene expression was induced by the addition of 0.1% arabinose or repressed by the presence of 0.1% glucose in the growth media. The ability of these *E. coli* mutants to resist copper was determined by measuring the MIC values. Error bars indicate the standard deviations based on three different experimental values

**Acknowledgments** This work was supported by grant FONDECYT 1110214 and in part by ICM P-05-001-F project. We thank M. Handford and A. Hooker for proofreading the manuscript and helpful comments. We also thank TIGR for the use of their complete *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome sequence ([www.tigr.org/db.shtml](http://www.tigr.org/db.shtml)), as well as the U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (<http://www.jgi.doe.gov/>) for the *A. ferrooxidans* ATCC 53993 genome sequence.

## References

- Alvarez S, Jerez CA (2004) Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 70:5177–5182
- Andersen CL, Jensen JJ, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization applied to bladder and colon-cancer data-sets. *Cancer Res* 64:5245–5250
- Cárdenas JP, Valdés J, Quatrini R, Duarte F, Holmes DS (2010) Lessons from genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:605–620
- Chen WM, Wu CH, James EK, Chang JS (2008) Metal biosorption capability of *Cupriavidus taiwanensis* and its effects on heavy metal removal by nodulation *Mimosa pudica*. *J Hazardous Mat* 151:364–371
- Darling AE, Mau B, Perna NT (2010) Progressive Mauve: multiple genome alignment with gene gain, loss, and rearrangement. *PLoS One* 6:e11147
- Das A, Modak JM, Natarajan KA (1998) Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:215–222
- Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev Microbiol* 2:414–424
- Franke S, Rensing C (2007) Acidophiles. Mechanisms to tolerate metal and acid toxicity. In: Gerday C, Glansdorff N (eds) *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington DC, pp 271–278
- Jerez CA (2008) The use of genomics, proteomics and other OMIC technologies for the global understanding of biomining microorganisms. *Hydrometallurgy* 94:162–169
- Keasling JD (1997) Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann NY Acad Sci* 829:242–249
- Luo Y, Liu Y, Zhang C, Luo H, Guan H, Liao H, Qiu G, Liu X (2008) Insights into two high homogenous genes involved in copper homeostasis in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol* 57:274–280
- Magnani D, Solioz M (2007) How bacteria handle copper. In: Nies DH, Silver S (eds) *Bacterial transition metal homeostasis*. Springer, Heidelberg, pp 259–285
- Navarro CA, Orellana LH, Mauriaca C, Jerez CA (2009) Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl Environ Microbiol* 75:6102–6109
- Orell A, Navarro CA, Arancibia R, Mobarec JC, Jerez CA (2010) Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnol Adv* 28:839–848
- Outten FW, Huffman DL, Hale JA, Ó Halloran TV (2001) The independent *cue* and *cus* system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 276:30670–30677
- Puig S, Rees EM, Thiele DJ (2002) The ABCDs of periplasmic copper trafficking. *Structure* 10:1292–1295
- Ramirez P, Toledo H, Guiliani N, Jerez CA (2002) An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl Environ Microbiol* 68:1837–1845
- Rawlings DE (2005) Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb Cell Fact* 4:13
- Rensing C, Grass G (2003) *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27:197–213
- Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W (2002) Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanism of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:239–248
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Biol Mol* 132:365–386
- Simmons SL, DiBartolo G, Deneff VJ, Goltsman DSA, Thelen MP, Banfield JF (2008) Population genomic analysis of strain variation in *Leptospirillum* group II bacteria involved in acid mine drainage formation. *PLoS Biol* 7:e177
- Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA (2006) Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotech Adv* 24:197–211
- Van Houdt R, Monchy S, Leys N, Mergeay M (2009) New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96:205–226
- Vera M, Pagliai F, Guiliani N, Jerez CA (2008) The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* can survive under phosphate-limiting conditions by the expression of a C-P lyase operon that allows it to grow on phosphonates. *Appl Environ Microbiol* 74:1829–1835
- Watling HR (2006) The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—a review. *Hydrometallurgy* 84:81–108
- Whelan JA, Russell NNB, Whelan MA (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods* 278:261–269
- Wu X, Hu Q, Hou D, Miao B, Liu X (2010) Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains possessing dissimilar copper resistance. *J Gen Appl Microbiol* 56:491–498
- Xue Y, Davis AV, Balakrishnan G, Stasser JP, Staehlin BM, Focia P, Spiro TG, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV (2008) Cu (I) recognition via cation- $\pi$  and methionine interactions in CusF. *Nature Chem Biol* 4:107–109