

UCH-FC
Doc-Microb
C 355
C1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS



**Caracterización de la vía del c-di-GMP y de su relación
con los fenotipos de adherencia y motilidad en la bacteria
biominera *Acidithiobacillus caldus*: el desafío de
construir el mutante nulo Δ ACA_1413**

MATÍAS ESTEBAN CASTRO GONZÁLEZ

2013

**Caracterización de la vía del c-di-GMP y de su relación con los
fenotipos de adherencia y motilidad en la bacteria biominera
Acidithiobacillus caldus: el desafío de construir el mutante nulo
 Δ ACA_1413**

Tesis entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Matías Esteban Castro González

Septiembre de 2013

Director de Tesis: Dr. Nicolas Simon Guiliani Guerin

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO



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

Matías Esteban Castro González

ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día martes 3 de Septiembre de 2013

Director de Tesis:

Dr. Nicolas Simon Guilliani Guerin

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "N. Simon Guilliani Guerin", written over a dotted line.

Comisión Evaluadora de la Tesis:

Dra. Rosalba Lucía Lagos Mónaco

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Rosalba Lucía Lagos Mónaco", written over a dotted line.

Dra. Margarita María Carú Marambio

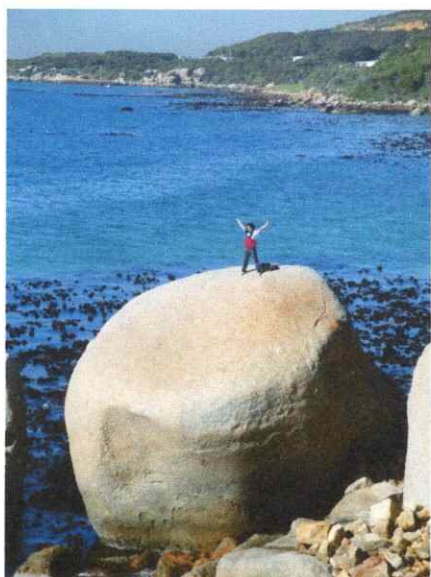
A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Margarita María Carú Marambio", written over a dotted line.

Dr. Romilio Hernán Espejo Torres

A dotted line indicating the signature area for Dr. Romilio Hernán Espejo Torres.



Para María Francisca



Cape Point, Sudáfrica, 2010.



Nací el día 28 de Diciembre del año 1981. Soy hijo de Patricia y Armando, ambos periodistas especializados en política. El “bichito” de la ciencia me picó en la época escolar gracias a las clases de química orgánica dictadas por el profesor Javier Guzmán, quien logró abrir en mi esa caprichosa ventana hacia la molecularidad. El año 2001 ingresé a la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Universidad de Chile, donde me incorporé al Laboratorio de Comunicación Bacteriana para realizar mi seminario de título el año 2005, estadía que se extendió al decidir realizar mis estudios doctorales allí. Aunque han pasado cerca de 8 años desde ese entonces, me parece como si hubiese sido ayer. Ahí, y en distintos laboratorios colaboradores, conocí gente preciosa, quienes forjaron en mí cierto temple difícil de explicar en estas páginas. Hoy, quiero agradecer las oportunidades que me ha dado esta Universidad para desarrollarme como científico, pero sobretodo como ser humano.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. A mi hijo Martín y a mi mujer María Francisca, quienes le dan sentido a mi vida. A mi madre por su incondicionalidad. A mi padre por sembrar la consecuencia y la reflexión. A mi hermano Simón por esparcir su talento donde quiera que vaya. A mi hermano Pablo por su comprensión y alegría. A Joel, maestro de la vida. A Pablito, por aprender de nuestros errores, por demostrar que querer es poder. A mi abuela por enseñarme a amar la tierra. A mi madrina por ser mi madre también. A María Eugenia y Juan Emilio, por su constante apoyo y por amar a mis padres.

Al Laboratorio de Comunicación Bacteriana. Al Dr. Nicolas Guiliani por permitirme cometer todos los errores necesarios para aprender. Por su rigurosidad científica. Por su amistad. A la Dra. Lina Ruíz por sus consejos y por abrir en el laboratorio la línea de investigación bajo la cual se desarrolló esta tesis. A Alex González por su espíritu emprendedor y aventurero. A Álvaro Banderas por la inspiración y locura. A Valentina Abarca por su complicidad. A Mauricio Díaz por su infinito apetito por aprender. A Oscar Arriagada por su amena compañía, por las charlas de fútbol y por su fundamental ayuda técnica

Al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología. Al Dr. Carlos Jerez por haberme abierto siempre las puertas de su laboratorio, por sus reiteradas muestras de apoyo. Al Dr. Claudio Navarro por los innumerables y valiosos consejos, por caminar por la vida de forma sencilla, por recordarme no claudicar hasta el final. A Juan Araos por su tenacidad, paciencia, empeño, grandeza, sabiduría.

Al Laboratorio de Microbiología de Sistemas. Al Dr. Francisco Chávez por contagiar alegría, por irradiar energía, por su talento, por su amistad. A Javiera Ortiz y Macarena Varas por hacer del día a día un lugar más acogedor.

Al Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. A la Dra. Victoria Guixé por permitirme aprender el arte de pipetear en su laboratorio. Al Dr. Ricardo Cabrera por su temple, carisma y sabiduría.

Al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Stellenbosch, Sudáfrica. Al Dr. Douglas Rawlings por permitirme desarrollar la parte más importante de esta tesis en su laboratorio. A la Dra. Shelly Deane por recibirme en su hogar y por su valiosa ayuda científica. A Wesley Loftie-Eaton, Leonard van Zyl, Christin Barnard, Veronique Meyer, Penny Dobrowsky, Inge Laubscher y Michael Frew por haber hecho de mi estadía en Sudáfrica una de las mejores experiencias de mi vida.

Al Dr. Mark Dopson de la Universidad Linnaeus, Suecia, por su amable donación de la cepa de *Acidithiobacillus caldus*.

A la Dra. Üte Romling del Instituto Karolinska, Suecia, por la donación de las cepas de *Salmonella typhimurium*.

Al Dr. Paolo Landini de la Universidad de Milán, Italia, por la donación de las cepas de *Escherichia coli*.

A las becas MECESUP UCh-0407 y MECESUP UCh-0604 por financiar esta tesis.

A mis animales. A mis axolotes Ajo, Chuleta y Limón, a mi perro Oso y a mi gata Lana por los numerosos días de reflexión infinita.

INDICE DE MATERIAS

	Lista de tablas.....	iv
	Lista de figuras.....	v
	Lista de abreviaturas.....	vii
	Resumen.....	viii
	Abstract.....	x
1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	(Bio)oxidación de sulfuros metálicos.....	1
1.1.1	Mecanismo.....	2
1.1.2	Microorganismos involucrados en la biooxidación de minerales.....	4
1.1.3	Adherencia celular a sustrato energético sólido y sustancias poliméricas extracelulares.....	7
1.2	Vía de transducción de señales mediante c-di-GMP.....	10
1.2.1	Metabolismo del c-di-GMP.....	12
1.2.1.1	Diguanilato ciclasas (DGCs).....	12
1.2.1.2	Fosfodiesterasas (PDEs).....	14
1.2.2	Estructura modular de las DGCs y PDEs.....	15
1.2.3	Fenotipos regulados por la vía del c-di-GMP.....	17
1.2.3.1	Formación de biopelículas.....	20
1.2.3.2	Motilidad.....	22
1.2.3.3	Otros fenotipos regulados por c-di-GMP.....	25
1.3	Planteamiento del problema.....	26
1.3.1	Vía del c-di-GMP en <i>Acidithiobacillus</i>	26
1.3.2	<i>Acidithiobacillus caldus</i> como modelo de estudio.....	28
1.4	Hipótesis y objetivos.....	30
2	METODOLOGÍA.....	31
2.1	Cepas y medios de cultivos.....	31
2.2	Herramientas bioinformáticas.....	31
2.3	Detección y cuantificación de c-di-GMP.....	32
2.3.1	Cuantificación de c-di-GMP en <i>At. caldus</i> mediante espectrometría de masas.....	32

2.3.2	Cuantificación de c-di-GMP en <i>S. typhimurium</i> mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	33
2.3.3	Cuantificación de los niveles de c-di-GMP en las cepas silvestre y mutante Δ 1413 de <i>At. caldus</i> mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo.....	34
2.4	Extracción de RNA y PCER de transcripción reversa.....	36
2.5	Clonamiento molecular de genes de <i>At. caldus</i> candidatos a codificar DGCs.....	37
2.6	Evaluación del morfotipo asociado con la síntesis de c-di-GMP en enterobacterias...	36
2.7	Construcción de mutantes nulos en <i>At. caldus</i>	42
2.7.1	Construcción del plasmidio suicida.....	42
2.7.2	Conjugación.....	44
2.7.3	Discriminación entre los mutantes de recombinación simple y doble	44
2.8	Ensayos fenotípicos en <i>At. caldus</i>	46
2.81	Adherencia.....	46
2.8.2	Motilidad.....	47
3	RESULTADOS.....	48
3.1	Identificación y caracterización <i>in silico</i> de los componentes genéticos candidatos para una vía de señalización mediante c-di-GMP en <i>At. caldus</i>	48
3.1.1	Diguanilatociclasas candidatas.....	48
3.1.2	Fosfodiesterasas candidatas.....	53
3.1.3	Posibles efectores de la vía del c-di-GMP en <i>At. caldus</i>	55
3.2	Análisis de la expresión de los ORFs involucrados en la vía del c-di-GMP en <i>At. caldus</i>	62
3.3	Detección de c-di-GMP en <i>At. caldus</i>	62
3.4	Funcionalidad de proteínas de <i>At. caldus</i> con dominio GGDEF como DGCs.....	66
3.5	Síntesis de c-di-GMP en la cepa <i>S. typhimurium aca_1413</i>	71
3.6	Construcción de <i>At. caldus</i> Δ ACA_1413.....	74
3.7	Comparación y caracterización de las cepas ATCC 51756 y Δ ACA_1413.....	78
3.7.1	Comparación de los niveles de c-di-GMP mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo.....	78
3.7.2	Adherencia de <i>At. caldus</i> ATCC 51756 a sustrato	81
3.7.3	Comparación de la adherencia a sustrato de las cepas ATCC 51756 y Δ ACA_1413...	85
3.7.4	Caracterización de la motilidad de <i>At. caldus</i> ATCC 51756.....	87
3.7.5	Comparación de la motilidad de las cepas ATCC 51756 y Δ ACA_1413.....	90

4	DISCUSIÓN.....	94
4.1	Análisis comparativo de la vía del c-di-GMP en <i>Acidithiobacillus</i>	94
4.1.1	Funcionalidad de las DGCs y PDEs.....	94
4.1.2	Dominios sensores y posibles estímulos extracelulares para la regulación del metabolismo del c-di-GMP en <i>Acidithiobacillus</i>	98
4.1.3	Efectores y componentes blanco.....	100
4.1.4	Hipótesis modular.....	103
4.2	<i>Acidithiobacillus caldus</i> Δ ACA_1413 como evidencia directa de una relación entre una vía de c-di-GMP y los fenotipos de formación de biopelículas y motilidad.....	105
4.2.1	Adherencia a sustrato y formación de biopelículas.....	107
4.2.2	Motilidad.....	110
5	CONCLUSIONES.....	112
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
	ANEXOS.....	128
Anexo 1.	Fenotipos relacionados con proteínas con dominio GGDEF y/o EAL en distintas bacterias.....	139
Anexo 2.	Curva de calibración del estándar c-di-GMP Para análisis mediante HPLC.....	133
Anexo 3	Curva de calibración del estándar c-di-GMP para análisis mediante MS-MS.....	134
Anexo 4.	Aminoácidos clave del dominio GGDEF en la unión de GTP y c-di-GMP.....	135
Anexo 5.	Alineamientos de los dominios GGDEF de <i>At. caldus</i> con dominios GGDEF de DGCs.....	136
Anexo 6	Aminoácidos clave del dominio EAL en la actividad PDE.....	137
Anexo 7	Alineamientos de los dominios EAL de <i>At. caldus</i> con dominios EAL de PDEs.....	138
Anexo 8	Cuantificación de c-di-GMP en las cepas silvestre y Δ 1413.....	139
Anexo 9.	Microscopía de transmisión de células de cultivos de <i>A. caldus</i>	140
Anexo 10	Comparación de la motilidad entre las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de <i>At. caldus</i> ...	141
Anexo 11.	Expresión de ACA_1873 (EAL) en la cepa MASE 282 de <i>S. typhimurium</i> (YciR')...	142
Anexo 12.	Presencia de elementos genéticos involucrados con el c-di-GMP en bacterias acidófilas quimiolitotrofas.....	143
Anexo 13.	"Colony blot" para los transformantes de <i>At. caldus</i> con diferentes plasmidios suicidas.....	144
Anexo 14.	Comparación entre diversas proyecciones celulares con similitud a las presentadas por <i>A. caldus</i>	145

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Microorganismos procariontes importantes en la oxidación de sulfuros metálicos.....	5
Tabla 2.	Variedad de arquitectura de dominios en proteínas con actividad DGC y/o PDE.....	16
Tabla 3.	Variedad de estímulos detectados y transducidos por DGCs y PDEs.....	18
Tabla 4.	Efectores y fenotipos regulados por la vía del c-di-GMP.....	19
Tabla 5.	Partidores utilizados en los experimentos de PCR de transcripción reversa.....	38
Tabla 6.	Partidores utilizados en el clonamiento de genes que codifican para proteínas con dominio GGDEF.....	40
Tabla 7.	Plasmidios de expresión utilizados en ensayos de complementación en enterobacterias.....	40
Tabla 8.	Cepas utilizadas en ensayos fenotípicos en placas con Rojo Congo.....	41
Tabla 9.	Aminoácidos involucrados en la funcionalidad de las DGCs presentes en los dominios GGDEF de <i>At. caldus</i>	52
Tabla 10.	Aminoácidos involucrados en la funcionalidad de las PDEs, presentes en los dominios EAL de <i>At. caldus</i>	54
Tabla 11.	Efectores candidatos con dominio PilZ codificados en el genoma de <i>At. caldus</i>	59
Tabla 12.	Cuantificación de c-di-GMP en extractos ricos en nucleótidos de cepas de <i>S. typhimurium</i>	75
Tabla 13.	Dominios relacionados con el c-di-GMP en <i>Acidithiobacillus</i>	95
Tabla 14.	Predicción de la actividad DGC o PDE de los dominios GGDEF y EAL encontrados en <i>Acidithiobacillus</i>	95
Tabla 15.	Dominios sensores presentes en proteínas GGDEF, EAL, GGDEF-EAL y HD-GYP de <i>Acidithiobacillus</i>	199

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Metabolismo del c-di-GMP.....	11
Figura 2.	Conformación activa e inactiva de homodimeros de dominios GGDEF.....	13
Figura 3.	Construcción del plasmidio suicida pOTACA1413:Kan.....	43
Figura 4.	Representación esquemática de la arquitectura de los dominios y de los aminoácidos clave de las DGCs y PDEs candidatas de <i>At. caldus</i>	50
Figura 5.	Identificación de la presencia y expresión del homólogo de PelD de <i>At. caldus</i> ACA_0987.....	57
Figura 6.	Comparación esquemática del contexto genómico de genes codificantes para proteínas con dominio PilZ de <i>At. caldus</i>	60
Figura 7.	Análisis de la expresión transcripcional de los genes que codifican proteínas involucradas con el c-di-GMP en <i>At. caldus</i>	63
Figura 8.	Análisis mediante espectrometría de masas del estándar de c-di-GMP sintetizado químicamente.....	64
Figura 9.	Análisis de la presencia de c-di-GMP en extractos ricos en nucleótidos de <i>At. caldus</i> ATCC51756.....	65
Figura 10.	Ensayos de complementación fenotípica en <i>E. coli</i> con genes codificando dominios GGDEF de <i>At. caldus</i>	67
Figura 11.	Ensayo de complementación heteróloga en <i>S. typhimurium</i> con genes codificando dominios GGDEF de <i>At. caldus</i>	69
Figura 12.	Ensayo de complementación heteróloga en <i>S. typhimurium</i> con genes codificando dominios GGDEF de <i>At. caldus</i>	70
Figura 13.	Contexto genómico de <i>aca_1413</i> . En azul se muestran los genes que codifican dominios GGDEF. PLD, fosfolipasa D.....	72
Figura 14.	Medición de los niveles de c-di-GMP en la cepa recombinante de <i>S. typhimurium</i> mediante HPLC.....	73
Figura 15.	Comprobación de la recombinación entre el plasmidio suicida y el genoma de <i>At. caldus</i>	76
Figura 16.	Análisis mediante Southern blot de DNA genómico de dos transconjugantes de <i>At. caldus</i> digeridos con <i>EcoRI</i> y <i>NheI</i>	77
Figura 17.	Análisis comparativo de los niveles de c-di-GMP de las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de <i>At. caldus</i> mediante espectrometría de masas.....	80

Figura 18.	Red de contacto tridimensional mediada por proyecciones filamentosas de la biopelícula de <i>At. caldus</i> formada sobre un cupón de azufre elemental.....	82
Figura 19.	Cinética de adhesión de células de <i>At. caldus</i> ATCC 51756 a cupones de azufre elemental mediante microscopía de fluorescencia.....	83
Figura 20.	Cinética de adhesión de células de <i>At. caldus</i> ATCC 51756 a cupones de azufre elemental mediante microscopía de barrido.....	84
Figura 21.	Cuantificación de las células plantónicas de las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de <i>At. caldus</i> como medida indirecta de la adherencia a sustrato.....	86
Figura 22.	Evaluación de la adherencia de las cepas cepas silvestre y Δ ACA_1413 de <i>At. caldus</i> a sustrato sólido (azufre elemental) mediante microscopía de fluorescencia.....	88
Figura 23.	Evaluación de la adherencia de las cepas cepas silvestre y Δ ACA_1413 de <i>At. caldus</i> a sustrato sólido (azufre elemental) mediante microscopía de fluorescencia.....	89
Figura 24.	Ensayo de motilidad de <i>At. caldus</i> en medio semisólido [Phytigel 0,2%, pH 4,7].....	91
Figura 25.	Comparación de la motilidad entre las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de <i>At. caldus</i> en el medio [Phytigel 0,08%, pH 4,7].....	92
Figura 26.	Comparación de la motilidad entre las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de <i>At. caldus</i> en el medio [Phytigel 0,08%, pH 2,5].....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

c-di-GMP:	Diguanilato cíclico.
DGC:	Diguanilato ciclasa.
PDE:	Fosfodiesterasa.
RISC:	Compuestos inorgánicos reducidos de azufre, del inglés “reduced inorganic sulfur compounds”.
SPE:	Sustancias poliméricas extracelulares.
GT:	Glicosiltransferasa.
Bcs:	Celulosa sintasa bacteriana, del inglés “bacterial cellulose synthase”.
QS:	Quorum Sensing.
AI:	Autoinductor.
AHL:	Homoserina lactona acilada.
GTP:	Guanosina trifosfato.
Ip:	Sitio de inhibición primario de DGCs.
Is:	Sitio de inhibición secundario de DGCs.
FAD:	Flavina adenina dinucleótido.
BV:	Biliverdina.
FMN:	Flavina mononucleótido.
VPS:	Exopolisacárido de <i>Vibrio</i> , del inglés “ <i>Vibrio polysaccharide</i> ”.
Rdar:	Morfotipo rojo, seco y rugoso , del inglés “red, dry and rough”
ORF:	Marco de lectura abierto.
T4SS:	Sistema de secreción tipo 4.
ICE:	Elementos integrativos y conjugativos.

RESUMEN

Acidithiobacillus caldus es una bacteria Gram-negativa, acidófila, quimiolitioautotrófica que obtiene energía mediante la oxidación de compuestos reducidos de azufre. El metabolismo de este microorganismo extremófilo está directamente relacionado con procesos de importancia ecológica, así como también con la técnica biotecnológica de recuperación de metales preciosos desde minerales llamada biolixiviación. La adherencia celular y posterior formación de biopelículas sobre la superficie de los minerales contribuye a acelerar estos procesos, por lo que entender los mecanismos moleculares que regulan la formación de este tipo de estructuras multicelulares se torna relevante. En diferentes especies bacterianas, el mensajero secundario diguanilato cíclico (c-di-GMP) promueve la transición desde el estado planctónico motil al estado multicelular adherido, favoreciendo la síntesis de exopolisacáridos e inhibiendo la motilidad a través de diversos efectores. Los niveles intracelulares de c-di-GMP están regulados por el balance de las actividades diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs), las que sintetizan y degradan el c-di-GMP, respectivamente. La actividad DGC reside en el dominio proteico GGDEF, mientras que la actividad PDE reside en los dominios EAL y HD-GYP. Si bien estos dominios juegan un rol fundamental en el metabolismo del c-di-GMP, también pueden actuar como efectores de la vía uniendo directamente esta molécula.

En esta tesis, se caracterizó una vía funcional mediante c-di-GMP en *At. caldus*, la cual regula los fenotipos de adherencia y motilidad en este microorganismo. En un inicio, análisis bioinformáticos de la secuencia genómica de la cepa ATCC 51756 de *At. caldus* se identificaron genes que codifican proteínas involucradas con el metabolismo del c-d-GMP. Nueve de ellos contienen un dominio GGDEF, tres contienen un dominio EAL y seis contienen ambos dominios (GGDEF-EAL). Basado en la presencia de aminoácidos clave en las actividades DGC y PDE, se predijo que siete de los nueve dominios EAL serían funcionales como PDEs y once de los quince dominios GGDEF serían funcionales como DGCs. De los cuatro dominios GGDEF predichos como no funcionales, sólo uno,

contenido en la proteína ACA_1412, podría actuar como efector de la vía del c-di-GMP. Además, se identificaron otros efectores putativos, algunos de los cuales estarían involucrados en la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (SPEs). Se identificó un homólogo del efector PelD de *P. aeruginosa*, el que conserva los aminoácidos importantes para la unión de c-di-GMP y un contexto génico similar al operón *pel* de *P. aeruginosa*, cuyos siete genes codifican para proteínas esenciales para la síntesis del polisacárido PEL. También, se identificaron ocho genes que codifican proteínas efectoras con dominio PilZ, seis de los cuales poseen los motivos aminoacídicos descritos para la unión del c-di-GMP. Entre éstos, destacan cuatro proteínas con homología a proteínas de ensamble del pili tipo IV y un homólogo a la subunidad A de celulosa sintasa (BcsA). Experimentos de transcripción reversa determinaron que, a excepción de un ORF que codificaría para una proteína con dominio PilZ, todos los genes involucrados con la vía del c-di-GMP identificados en *At. caldus* se expresan, sugiriendo fuertemente que este microorganismo cuenta con los elementos necesarios para establecer una vía funcional mediante c-di-GMP.

El análisis de extractos ricos en nucleótidos obtenidos desde *At. caldus* mediante espectrometría de masas reveló la presencia de c-di-GMP, indicando que este microorganismo tiene la capacidad de sintetizar este segundo mensajero, y por lo tanto, posee una o más DGCs funcionales. Utilizando ensayos de complementación fenotípica en enterobacterias, se demostró la funcionalidad de cinco dominios GGDEF, dentro de las cuales destacó la DGC ACA_1413 por su categórica respuesta. La cuantificación de los niveles de c-di-GMP en cepas de *Salmonella typhimurium* indicó que la cantidad del segundo mensajero producida por las células que expresan el gen *aca_1413* es cerca de nueve veces mayor que la observada en los extractos de las células control transformadas sólo con el plasmidio, lo que comprobó que ACA_1413 es una DGC funcional y que el fenotipo observado se debe a la alta concentración de c-di-GMP intracelular producida por esta proteína.

Para indagar si la señalización mediante c-di-GMP en *At. caldus* participa en la regulación de los fenotipos de adherencia y/o motilidad, se construyó una cepa mutante en la DGC ACA_1413 y se evaluaron dichos fenotipos en las cepas silvestre y mutante. La inactivación cromosómica del gen *aca_1413* fue generada mediante la técnica llamada “mutación por intercambio de marcador”. La mutación fue comprobada mediante análisis de “colony blot” y “Southern blot”. El estudio comparativo de los niveles de c-di-GMP entre la cepa silvestre y la cepa Δ ACA_1413 de *At. caldus* mediante espectrometría de masas determinó que la cepa Δ ACA_1413 produce 3,5 veces menos c-di-GMP que la cepa silvestre. Además, este resultado reveló que la DGC ACA_1413 es responsable del 71,6% de la producción total de c-di-GMP, sugiriendo que la DGC ACA_1413 podría jugar un rol central en la vía del c-di-GMP en *At. caldus*, y también, en correlación con el análisis bioinformático, indicó que existen otras DGCs actuando en paralelo. Ensayos fenotípicos de las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de *At. caldus* sugieren que la DGC ACA_1413 favorece la adherencia a sustrato sólido e inhibe la motilidad flagelar de esta bacteria. La adherencia a azufre elemental fue evaluada directamente mediante microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica de barrido, e indirectamente cuantificando las células planctónicas remanentes en los cultivos. Mediante estos ensayos, se determinó que en comparación con la cepa silvestre, la cepa mutante posee una menor capacidad para adherirse al azufre a tiempos cortos de incubación con el sustrato (≤ 1 h). Por otro lado, ensayos de motilidad tipo “swarming” en medio semisólido, establecieron que la cepa Δ ACA_1413 presenta un nivel de motilidad mayor que la cepa silvestre. El mecanismo por el cual la DGC ACA_1413 afecta estos fenotipos es aún desconocido, sin embargo el efecto en la adherencia podría explicarse por efectores putativos homólogos a PelD, BcsA y proteínas de ensamble del pili tipo IV. Además, el contexto génico de *aca_1413* indica que ACA_1413 podría regular el funcionamiento del flagelo. Efectivamente, río abajo de *aca_1413* se ubica un gen predicho para codificar la única una proteína con un dominio GGDEF capaz de actuar como efector de la vía (ACA_1412), mientras que río arriba, se encuentran genes que codifican copias de FliL, MotA y MotB. ACA_1412 podría entonces

actuar como efector uniendo el c-di-GMP sintetizado por ACA_1413, reprimiendo la motilidad interviniendo en el funcionamiento de alguno de estos elementos.

ABSTRACT

Acidithiobacillus caldus is an acidophilic chemolithoautotrophic bacterium that obtains energy from the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds (RISCs). *At. caldus* metabolism is related directly with ecologic phenomena and bioleaching, a biotechnological application by which valuable metals are recovered from insoluble ores. Bacterial attachment and subsequent biofilm formation on the mineral surface contributes to accelerating these processes, therefore the understanding of molecular mechanisms that regulate the formation of such multicellular structures becomes relevant. Different bacteria use the second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) to promote the transition from motile planktonic state to the attached multicellular state, by promoting exopolysaccharide synthesis and inhibiting different classes of motility. Intracellular levels of c-di-GMP are regulated by the balance of diguanylate cyclase (DGCs) and phosphodiesterase (PDEs) activities, which synthesize and degrade c-di-GMP, respectively. The DGC activity resides in the GGDEF protein domain, while PDE activity resides in two different domains: EAL and HD-GYP. These three domains play an important role in c-di-GMP metabolism, but also can act like effector proteins by c-di-GMP binding. In this thesis, a functional c-di-GMP pathway was characterized in *At. caldus*, which regulates motility and attachment of this bacterium. By performing a bioinformatic analysis on the genomic sequence of *At. caldus* ATCC51756, several genes involved in the c-di-GMP pathway were identified. Nine of them contain a GGDEF domain, three contains an EAL domain, and six contain both GGDEF and EAL domains. Based in the presence of key aminoacids it was predicted that seven out of nine EAL domains could be functional as PDEs, while eleven out of fiveteen GGDEF domains could be functional as DGCs. From the four GGDEF domain predicted as non fuctional DGCs, only one, contained in ACA_1412 protein, could act as effector of c-di-GMP pathway. Also, putative effector proteins related to synthesis of extracellular polymeric substances were identified. An orthologue of PelD form *P. aeruginosa* which conserves key aminoacids needed for c-di-GMP binding was identified. It bears a similar genetic context to that of the corresponding *pel* operon, whose seven genes

(*pelA-G*) are involved in PEL polysaccharide synthesis. Additionally, eight genes coding proteins containing PilZ domains were identified, six of which have key aminoacids for c-di-GMP binding. Among them, four proteins related to type four pili (T4P) assembly and one orthologue of cellulose catalytic subunit A (BcsA) were found. Reverse transcription experiment determined that, except for one PilZ coding ORF, every c-di-GMP related gene detected was transcribed strongly in *At. caldus*, suggesting that this bacterium have enough elements to construct a functional c-di-GMP pathway.

Mass spectrometry analysis of nucleotide extracts from *At. caldus* cells showed the presence of c-di-GMP, indicating that this microorganism is capable to produce it and therefore it posseses one o more functional DGCs. By using phenotypic complementation assays in enterobacteria, five GGDEF domains were characterized as functional DGCs. Among them, the GGDEF domain-containing protein ACA_1413, showed the strongest phenotype. Quantification of c-di-GMP levels in *Salmonella typhimurium* strains indicated that the amount of c-di-GMP produced by cells expressing *aca_1413* gene is about nine times higher than control cells. This proved that ACA_1413 is a functional DGC, and the phenotype observed is due to high concentration of intracellular c-di-GMP produced by this protein.

To investigate if c-di-GMP signaling in *At. caldus* participates in the regulation of attachment and/or motility phenotypes, a mutant strain deficient in the ACA_1413 DGC was constructed. The chromosomal inactivation of *aca_1413* gene was generated by marker exchange mutagenesis. The insertion was verified by colony blot and Southern blot. Comparative quantification of c-di-GMP levels by mass spectrometry determined that the Δ ACA_1413 mutant strain of *At. caldus* produces about 3,5 times less than the wild type strain. Furthermore, this result revealed that ACA_1413 DGC is responsible for 71,6 % of c-di-GMP production, suggesting that this DGC could play a pivotal rol in c-di-GMP pathway in *At. caldus*. Moreover, in agreement with the bioinformatic this analysis indicates that there are other functional DGCs acting in parallel. Comparative phenotypic assays suggested that

ACA_1413 induce attachment to solid substrate and inhibit flagellar motility. Attachment to sulfur surface was evaluated directly by fluorescence and scanning electron microscopy, and indirectly by quantification of remaining planktonic cells in the culture. By these assays it was determined that, compared to the wild type strain, the Δ ACA_1413 strongly has a decreased ability to attach to sulfur at short times of incubation with substrate (≤ 1 h). On the other hand, the Δ ACA_1413 mutant strain showed a higher degree of motility in swarming assays on semisolid media. The mechanism by which ACA_1413 DGCs act on these phenotypes is still unknown. One possibility is that the attachment effect is mediated by T4P, PelD and/or BcsA putative effector proteins. Additionally, the genetic context of *aca_1413* gene suggests its involvement in flagella functioning. This is plausible due the presence of the *aca_1412* gene downstream, which is predicted to encode the only GGDEF protein capable to act as effector of c-di-GMP pathway, while upstream there are copies of *fliL*, *motA*, and *motB* flagellar genes. Then, ACA_1412 can act as an effector by binding c-di-GMP produced by ACA_1413, inhibiting swarming motility by interfering with some of these elements.

1. INTRODUCCIÓN

Los organismos capaces de vivir en condiciones hostiles o extremas, antropocéntricamente hablando, han sido llamados extremófilos (Macelroy, 1974). Ellos han sido aislados desde hábitats distinguibles por su aridez, radiación, salinidad, acidez, temperatura cercanas al punto de solidificación o vaporización del agua, etc. Si bien los extremófilos comprenden organismos tan diferentes como protozoos, algas, hongos y procariontes, son estos últimos los que dominan a medida que las condiciones se vuelven más extremas (Howland, 1998). Ambientes ricos en minerales sulfurados parecen desafiar el desarrollo de la vida con condiciones de acidez extrema, baja disponibilidad de materia orgánica y concentración elevada de metales pesados, entre otras. Sin embargo, este escenario no solo es tolerado, sino que es utilizado para el desarrollo de una variedad de microorganismos capaces de obtener su energía a partir de la oxidación de los sulfuros metálicos presentes. El metabolismo de estos microorganismos está íntimamente ligado con importantes procesos ecológicos, tales como los ciclos biogeoquímicos del hierro y del azufre, y el fenómeno de acidificación de aguas conocido como drenaje ácido de minas (AMD) o drenaje ácido de roca (ARD). Asimismo, estos microorganismos acidófilos son protagonistas de la técnica biotecnológica conocida como biolixiviación, la que consiste en la recuperación de metales preciosos desde minerales insolubles.

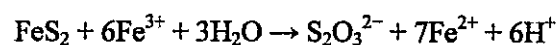
1.1 (Bio)oxidación de sulfuros metálicos

Los sulfuros metálicos son una de las clases de minerales más abundante sobre la tierra. Su composición química consiste en sulfuro (S^{2-}) como anión principal y distintos metales como contraparte catiónica, muchos de los cuales son de gran importancia económica. La oxidación microbiológica de sulfuros metálicos como fuente de energía es un proceso natural que se cree se está llevando a cabo desde poco después que la vida comenzó en la tierra (Wachtershauser, 1990). Este proceso permite la movilización del catión metálico desde el mineral insoluble y ha sido utilizado

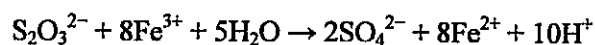
durante las últimas décadas como técnica biotecnológica de recuperación de metales bajo el nombre de biolixiviación. Algunos metales recuperados mediante esta técnica incluyen el cobre, cobalto, níquel, zinc y uranio. No obstante, esta técnica también es utilizada para remover sulfuros metálicos interferentes desde minerales que contienen oro y plata antes de tratamientos químicos para su recuperación. Debido a que los metales solubilizados no son recuperados, este proceso se conoce como biooxidación.

1.1.1 Mecanismo

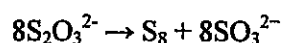
La oxidación de sulfuros metálicos es esencialmente un proceso químico, en el cual el ion férrico (Fe^{3+}) y protones son responsables de la separación del metal y el sulfuro del mineral. No obstante, este proceso se relaciona directamente con la microbiota presente en el mineral, debido a la capacidad que ésta posee de regenerar el ión férrico y los protones consumidos en el proceso. Basados en los intermediarios detectados durante la disolución de diferentes minerales sulfurados, se han propuesto dos vías por las cuales puede ser llevada a cabo este proceso: la vía del tiosulfato y la de los polisulfuros (Rohwerder y cols., 2003, Schippers y Sand, 1999). Si bien ambas vías utilizan el ion férrico como oxidante, los minerales que son disueltos a través de la vía de los polisulfuros además pueden ser oxidados por protones, por lo que han sido llamados minerales ácido-solubles. Por otra parte, los minerales cuya disolución ocurre a través de la vía del tiosulfato sólo utilizan el ión férrico y se han llamado ácido-insolubles. En minerales ácido-insolubles como la pirita (FeS_2), molibdenita (MoS_2) y tungstenita (WS_2), los enlaces entre el azufre y el metal se rompen sólo después de una serie de seis pasos consecutivos, consistentes en la extracción de un electrón por parte del ion férrico, resultando ion ferroso y tiosulfato como primer compuesto sulfurado libre (Schippers y cols., 1996).



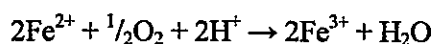
El tiosulfato es inestable a pH ácido y es oxidado por el ion férrico y por bacterias oxidadoras de azufre vía tetrionato y otros politionatos hasta sulfato.



En ausencia de microorganismos oxidadores de azufre, reordenamientos de la molécula de tiosulfato a través de una variedad de intermediarios resultan en la producción y acumulación de azufre elemental (Rohwerder y cols., 2003, Schippers y Sand, 1999).

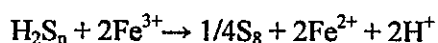
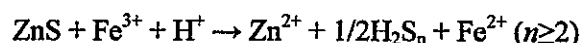


Debido a que el ion ferroso no es oxidado a tasas significativas a pH ácido (Singer y Stumm, 1970), sólo microorganismos oxidadores de hierro pueden regenerar el ion férrico bajo esta condición.



El Fe^{3+} puede volver a oxidar el mineral, permitiendo la solubilización del metal y la regeneración del ion ferroso en el proceso.

Los minerales ácido-solubles como la esfalerita (ZnS), galena (PbS), arsenopirita (FeAsS), calcopirita (CuFeS_2) y hauerita (MnS_2), son disueltos por la acción combinada de la extracción de electrones por el ion férrico y por el ataque de protones. El enlace químico entre el metal y el azufre se rompe después de la unión de dos protones a este último, liberándose sulfuro de hidrógeno. En presencia de ión férrico, la parte sulfurada puede ser oxidada simultáneamente, sufriendo una serie de reordenamientos y oxidaciones vía polisulfuros hasta azufre elemental (Steudel, 1996).



En ausencia de microorganismos oxidadores de azufre, más del 90% del producto de la oxidación resulta en forma de azufre elemental (Schippers y Sand, 1999), el cual puede actuar como un agente atenuador de la oxidación. En presencia de estos microorganismos, el azufre elemental puede ser removido mediante su oxidación hasta ácido sulfúrico.



Debido a que los enlaces entre el azufre y el metal pueden romperse mediante el ataque de protones en ausencia de hierro, los minerales ácido-solubles pueden ser disueltos por microorganismos

oxidadores de azufre (García Jr y cols., 1995, Semenza y cols., 2002), los que son capaces de oxidar el sulfuro de hidrógeno resultante del ataque de los protones vía azufre elemental hasta ácido sulfúrico, regenerando los protones consumidos previamente por la disolución del sulfuro metálico (Schippers y Sand, 1999).

1.1.2 Microorganismos involucrados en la biooxidación de minerales

Si bien existe cierta variedad de microorganismos responsables de la biooxidación de sulfuros metálicos, todos ellos comparten características que les permiten desarrollarse en ambientes con condiciones nutricionales sencillas y acidez extrema. Algunas de las especies más importantes en la oxidación de sulfuros metálicos se enlistan en la tabla 1. Todas ellas son quimiolitotrofas, es decir, obtienen energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos. Algunos microorganismos pueden usar tanto el ion ferroso como compuestos inorgánicos reducidos de azufre (RISCs, del inglés “reduced inorganic sulfur compounds”) como dadores de electrones, mientras que otros sólo son capaces de oxidar uno de estos sustratos. Debido a que el oxígeno es el aceptor final de electrones energéticamente más favorable, la mayoría de estos microorganismos son aeróbicos. No obstante, algunas cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* han mostrado ser anaeróbicos facultativos pudiendo utilizar, por ejemplo, el ion férrico como aceptor de electrones (Ohmura y cols., 2002, Suzuki y cols., 1990). La acidez alcanzada por la oxidación de sulfuros y azufre elemental es sin duda elevada, por lo que otro aspecto fundamental es la tolerancia y resistencia a ambientes con una gran concentración de protones ($\text{pH} \leq 3$). Las condiciones ácidas son importantes para la disolución de sulfuros ácido-solubles, pero también lo son para la oxidación de minerales ácido-insolubles ya que permite que el ion férrico se mantenga en solución. Además, debido a que el citoplasma de estos microorganismos posee un pH

Tabla 1. Microorganismos procariontes importantes en la oxidación de sulfuros metálicos.

Microorganismo	Sustrato	Temperatura	Referencia
Bacteria			
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Hierro y azufre	30-35°C	(Kelly y Wood, 2000, Temple y Colmer, 1951)
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	Hierro y azufre	28-33°C	(Hallberg y cols., 2010)
<i>Acidithiobacillus ferridurans</i>	Hierro y azufre	29°C	(Hedrich y Johnson, 2013)
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	Azufre	28-30°C	(Bryant y cols., 1983)
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	Azufre	28-30°C	(Kelly y Wood, 2000, Waksman y Joffe, 1922)
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	Azufre	45°C	(Hallberg y Lindstrom, 1994)
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> (grupo I)	Hierro	30-40°C	(Breed y cols., 1999, Hippe, 2000)
<i>Leptospirillum ferriphilum</i> (grupo II)	Hierro	40-50°C	(Coram y Rawlings, 2002)
<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> (grupo III)	Hierro	30-42°C	(Tyson y cols., 2005)
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Hierro y azufre	50°C	(Golovacheva, 1979)
<i>Sulfobacillus disulfidooxidans</i>	Hierro y azufre	35°C	(Dufresne y cols., 1996)
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	Azufre	45-50°C	(Norris y cols., 1996)
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Hierro	48°C	(Clark y Norris, 1996)
Archaea			
<i>Ferrimicrobium acidophilus</i>	Hierro	25-35°C	(Johnson y cols., 2009)
<i>Ferroplasma aciditarmanus</i>	Hierro	35-42°C	(Dopson y cols., 2004)
<i>Ferroplasma acidiphilium</i>	Hierro	35-45°C	(Golyschina y cols., 2000)
<i>Thermoplasma acidophilum</i>	Azufre	45-62°C	(Darland y cols., 1970)
<i>Sulfobus metallicus</i>	Hierro y azufre	75°C	(Huber y Stetter, 1991)
<i>Sulfobus acidocaldarius</i>	Azufre	80-85°C	(Grogan, 1989)
<i>Sulfobus solfataricus</i>	Azufre	80-85°C	(Grogan, 1989)
<i>Metallosphaera prunae</i>	Hierro II, RISC	75 °C	(Fuchs y cols., 1995)
<i>Metallosphaera sedula</i>	Hierro y azufre	75°C	(Huber y cols., 1989)
<i>Acidianus infernus</i>	Hierro y azufre	80-95°C	(Seeger y cols., 1986)

cercano a la neutralidad (Cox y cols., 1979), es posible la formación de un gradiente de pH importante para propósitos energéticos (Elbehti y cols., 2000, Brasseur y cols., 2002, Dopson y cols., 2002).

Todos estos microorganismos son autótrofos o autótrofos facultativos por lo que el CO₂ presente en el aire es su fuente de carbono. El aire también actúa como fuente de oxígeno y, en algunos casos, como *At. ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrodiazotrophum*, como fuente de nitrógeno (Mackintosh, 1978, Norris y cols., 1995, Parro y Moreno-Paz, 2003, Parro y Moreno-Paz, 2004, Tyson y cols., 2005). Debido a la presencia de hierro y azufre en la mayoría de los sustratos minerales usados como fuente de energía, la presencia de algún microorganismo en particular no está determinada absolutamente por el tipo de mineral, sino más bien por la temperatura que experimenta el sistema, sea este natural (salares y termas volcánicas) o artificial (tanques y pilas de biolixiviación). Los microorganismos pueden ser clasificados como mesófilos, termófilos moderados y termófilos extremos. Estos últimos se encuentran en sistemas que se desarrollan a temperaturas cercanas a los 75°C y su población es dominada exclusivamente por microorganismos pertenecientes a la división de las Archaeas, cuyos géneros más importantes incluyen *Acidianus*, *Metallosphaera* y *Sulfolobus*. Los bacilos Gram-positivos pertenecientes a los géneros *Sulfobacillus*, *Ferrimicrobium* y *Acidimicrobium*, en conjunto con las especies Gram-negativas *Acidithiobacillus caldus* y *Leptospirillum ferriphilum*, son los microorganismos termófilos moderados más abundantes en sistemas que se desarrollan a temperaturas cercanas a los 50°C (Dopson y Lindstrom, 2004, Okibe y cols., 2003). Por otra parte, en sistemas que se desarrollan bajo los 40°C la población está dominada por un consorcio de especies mesofílicas pertenecientes a los géneros *Leptospirillum* y *Acidithiobacillus* (Baker y Banfield, 2003, Rawlings, 2005). A diferencia de la mayoría de los bacilos Gram positivos y Archaeas mencionados anteriormente, los que pueden usar una mezcla de diferentes fuentes de energía y carbono (mixotrofos), los microorganismos pertenecientes a los géneros *Leptospirillum* y *Acidithiobacillus* son quimiolitautótrofos obligados (Rohwerder y Sand, 2007). Debido a su temprano descubrimiento (Hippe, 2000, Marsh y Norris, 1983, Temple y Colmer, 1951, Waksman y Joffe, 1922) y a su

ubicuidad (Goebel y Stackebrandt, 1994, Goltsman y cols., 2009, Mueller y cols., 2010, Okibe y cols., 2003, Rawlings, 2002, Schrenk y cols., 1998, Vasquez y Espejo, 1997), las especies pertenecientes a estos géneros han sido consideradas las más importantes en la oxidación de sulfuros metálicos, y consecuentemente, han sido las más estudiadas hasta ahora.

1.1.3 Adherencia celular a sustrato energético sólido y sustancias poliméricas extracelulares (SPEs) en *Acidithiobacillus*

La adherencia de células de *Acidithiobacillus thiooxidans* a cristales de azufre elemental fue tempranamente observada mediante microscopía de barrido (Schaeffer y cols., 1963). Posteriormente, la adherencia de *At. ferrooxidans* fue demostrada en sustratos como calcopirita, azufre (McGoran y cols., 1969) y sulfuro de zinc (Gormely y Duncan, 1974). Experimentos cinéticos de adherencia de *At. ferrooxidans* sobre pirita han demostrado que, en condiciones de superficie ilimitada, más del 80% del inoculo se adhiere al mineral en menos de 24 h (Bagdigian y Myerson, 1986, Dispirito y cols., 1983, Gehrke y cols., 1998), lo que subsiguientemente puede resultar en la formación de biopelículas. Tanto para *At. ferrooxidans* como para *At. thiooxidans* se ha demostrado que estas estructuras consisten en una monocapa de células adheridas al mineral (González y cols., 2012, Mangold y cols., 2008). La disolución de minerales como pirita, calcopirita y esfalerita ha sido relacionada positivamente con la adherencia de *Acidithiobacillus* al mineral (Rodríguez y cols., 2003). Al igual que en otras bacterias, el fenómeno de adherencia sería dependiente de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) (González y cols., 2012, Harneit y cols., 2006, Pogliani y Donati, 1999, Sand y Gerke, 2006, Zhu y cols., 2012). Hasta ahora, se ha caracterizado la composición de SPE provenientes de *At. ferrooxidans* (Harneit y cols., 2006, Pogliani y Donati, 1999, Sand y Gerke, 2006) y de *At. thiooxidans* (González y cols., 2012), las que corresponden principalmente a una mezcla de lípidos, proteínas y carbohidratos. En microorganismos capaces de oxidar hierro y azufre la composición de las SPE puede variar dependiendo del sustrato energético utilizado. Por ejemplo, células de *At. ferrooxidans* crecidas en pirita producen SPEs con una alta proporción de ácidos urónicos acomplejados con hierro (III) (Gehrke

y cols., 2001, Gehrke y cols., 1998, Kinzler y cols., 2003), las que favorecen la oxidación del sustrato (Sand y Gerke, 2006). Mientras tanto, el uso de azufre elemental como fuente energética promueve la producción de SPEs principalmente hidrofóbicas con altas proporciones de ácidos grasos. Independientemente de su composición específica, las SPEs proporcionan un espacio en donde los productos de degradación del mineral que son utilizados como fuente energética (azufre elemental, tiosulfato, tetrionato, etc.) se concentran, favoreciendo la oxidación eficiente de estos intermediarios por complejos proteicos de membrana (Rawlings, 2005, Rohwerder y Sand, 2007, Watling, 2006).

El conocimiento acerca de los elementos moleculares involucrados en la síntesis de SPEs en *Acidithiobacillus* es escaso y principalmente se basa en comparaciones bioinformáticas con otras bacterias. Análisis *in silico* del genoma de *At. ferrooxidans* ATCC 23270 en busca de genes involucrados en la síntesis de SPEs, han revelado la presencia de genes que codificarían proteínas involucradas en dos sistemas distintos para la producción de exopolisacáridos, Wz (Barreto y cols., 2005a) y Kps (Bellenberg y cols., 2011), cuyas expresiones se han visto aumentadas en la población adherida respecto de la planctónica (Bellenberg y cols., 2011, Vera y cols., 2011). En bacterias Gram-negativas, ambos complejos proteicos contienen componentes de membrana interna y externa, los que permiten el ensamble de precursores activados (azúcares mono y difosfato) citoplasmáticos sobre una molécula lipídica de anclaje en la membrana interna y la posterior translocación del polímero a través de la membrana plasmática (Whitfield, 2006). La composición del polímero varía dependiendo de las cantidad de unidades monoméricas, del tipo de enlace glicosídico y del tipo de sustituciones (orgánicas y no orgánicas), los que a su vez dependen de la batería de glicosiltransferasas (GTFs) involucradas en proceso de polimerización. En el genoma de *At. ferrooxidans* se han identificado genes candidatos para la síntesis de una molécula lipídica de anclaje y diferentes GTFs que podrían catalizar la elongación del polímero (Barreto y cols., 2005a). Además, se han caracterizado genes involucrados en la síntesis de precursores de azúcares extracelulares como la UDP-glucosa, UDP-galactosa y dTDP-ramnosa, cuya función ha sido corroborada por complementación heteróloga en *E. coli* (Barreto y cols., 2005b).

La producción de SPEs y la formación de biopelículas pueden ser regulada por un sistema de comunicación célula-célula conocido como Quorum Sensing (QS) (Decho y cols., 2011, Labbate y cols., 2007, Marketon y cols., 2003, Riedel y cols., 2001). El mecanismo general comprende la síntesis de señales químicas llamadas autoinductores (AIs) al interior de la célula y su liberación al medio extracelular, donde su concentración aumenta concomitantemente con el crecimiento de la población bacteriana. Una vez que se alcanzan niveles detectables de AI, las células, a través de la coordinación de la expresión génica, responden como un conjunto adoptando determinadas conductas. Desde su inicio en 2002, el Laboratorio de Comunicación Bacteriana (LCB) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile ha investigado los mecanismos moleculares involucrados en la síntesis de SPE en bacterias lixiviantes y su rol en la adherencia a su sustrato. La primera línea de investigación del LCB se relacionó con la búsqueda de un sistema de QS en *At. ferrooxidans*. Producto de estos trabajos se demostró que *At. ferrooxidans* posee un sistema de QS tipo AI-1, el que al igual que en otras bacterias, está compuesto por el AI [homoserinas lactonas aciladas (AHL)], por la sintasa y por el receptor del AI, AfeI y AfeR, respectivamente, y por cajas-*afe* que actúan como sitios de unión del complejo AfeR-AHL (Farah y cols., 2005). Además, se demostró la posibilidad de modular la adherencia de *At. ferrooxidans* a sustratos como pirita y azufre mediante la adición externa de AHLs (González y cols., 2012, Ruiz y cols., 2008), comprobando que el sistema QS tipo AI-1 que posee *At. ferrooxidans* es funcional y puede regular la formación de biopelículas de este microorganismo. Sin embargo, hasta ahora, este tipo de sistemas no han sido caracterizados en otra especie de *Acidithiobacillus*. A pesar de que se ha detectado una señal de tipo AI-1 en sobrenadantes de *At. thiooxidans* (Ruiz y cols., 2008), el genoma de este microorganismo no presenta genes que codifiquen para proteínas I y R (Valdés y cols., 2008). Este hecho, ha impedido definir el QS como un mecanismo común en la regulación de la formación de biopelículas de bacterias lixiviantes, pero a la vez han motivado la búsqueda y caracterización de otros sistemas que regulen la adherencia a sustrato.

1.2 Vía de transducción de señales mediante c-di-GMP

El diguanilato cíclico (c-di-GMP) fue descubierto en 1985 por el grupo de investigación liderado por Moshe Benziman, quienes lo describieron como un activador alostérico del complejo celulosa sintasa de *Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente *Acetobacter xylinum*) (Ross y cols., 1985), una bacteria Gram negativa aeróbica que crece formando biopelículas inmersas en una matriz de celulosa sobre fruta en descomposición. Utilizando guanosina trifosfato (GTP) y extractos de membrana de esta alfa-proteobacteria para la obtención del activador, los autores proponen que la estructura de éste debiese contener GTP (o parte de él). Esto fue comprobado más tarde por análisis químicos, de marcaje radiactivo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (Ross y cols., 1986, Ross y cols., 1987), los que revelaron una estructura cíclica de dos riboguanosinas unidas por enlaces 3'-5' (figura 1). Las actividades de síntesis y degradación del c-di-GMP fueron identificadas tempranamente y se atribuyeron a proteínas ubicadas en la membrana de *G. xylinus* (Ross y cols., 1987). La identificación de productos e intermediarios de las reacciones llevadas a cabo por estas enzimas permitieron definir que la síntesis del c-di-GMP es efectuada por la actividad diguanilato ciclasa (DGC), y que la degradación de este dinucleótido se lleva a cabo mediante la actividad fosfodiesterasa-A (PDE-A), la que rompe un enlace fosfodiéster, produciendo un dímero lineal, el cual a su vez puede ser hidrolizado por fosfodiesterasas tipo B (PDE-B) (Ross y cols., 1987). A continuación, el hallazgo de que la síntesis de celulosa en *Agrobacterium tumefaciens* también fuese dependiente de c-di-GMP (Amikam y Benziman, 1989), indicaba que esta molécula no era exclusiva de *G. xylinus*. Cerca de una década después, los genes que codifican las enzimas responsables de las actividades DGC y PDE fueron revelados no sólo en el genoma de *G. xylinus* (Tal y cols., 1998), sino que en el de varios géneros bacterianos (Galperin y cols., 2001), indicando la ubicuidad de este tipo de genes en Bacteria.

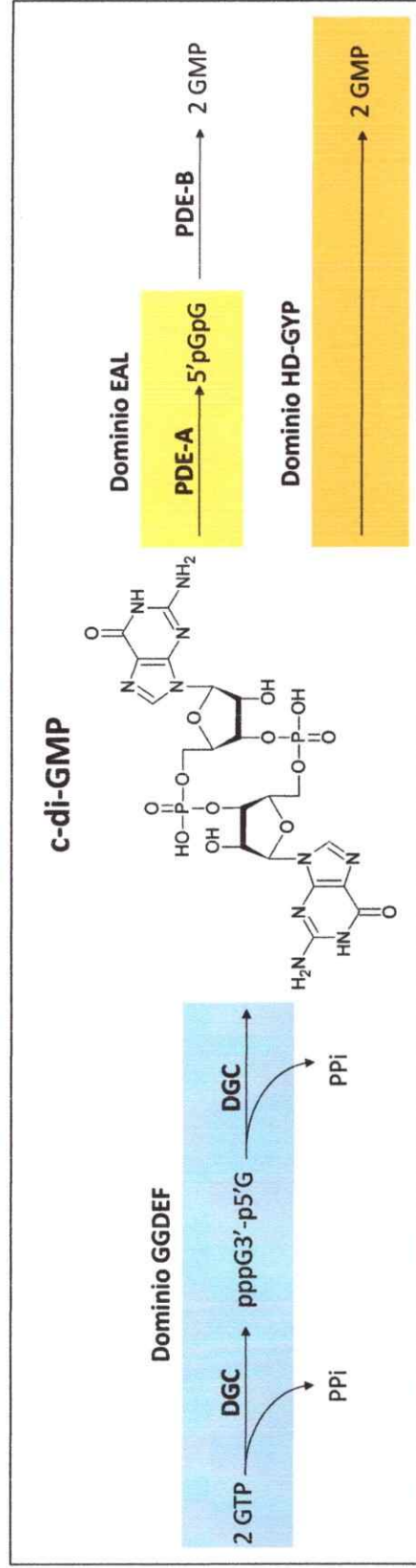


Figura 1. Metabolismo del c-di-GMP. El c-di-GMP es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP mediante las enzimas DGCs, las que contienen el dominio GGDEF (azul). Por otra parte, el dinucleótido es convertido en distintos productos de degradación por dos tipos de fosfodiesterasas, no relacionadas entre sí, con dominios EAL (amarillo) o HD-GYP (naranja).

Además de la producción de celulosa en *G. xylinus* y *A. tumefaciens*, los primeros fenotipos regulados por c-di-GMP reportados fueron la formación de biopelículas en *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* (Simm y cols., 2004) y *Vibrio cholerae* (Tischler y Camilli, 2004), y la regulación del ciclo celular en *Caulobacter crescentus* (Paul y cols., 2004), proceso que también está relacionado con la adherencia de esta bacteria. De ahí en adelante, el número de publicaciones acerca del c-di-GMP creció de forma exponencial. Hoy, sabemos que el c-di-GMP es un segundo mensajero clave en la regulación de diversos fenotipos en distintos phyla bacterianos (Neunuebel y Golden, 2008; Bobrov y cols., 2011; He y cols., 2011; Bharati y cols., 2012; Hull y cols., 2012; Li y He, 2012), sin embargo, su rol central es promover la formación de biopelículas (Rashid y cols., 2003; Kirillina y cols., 2004; Simm y cols., 2004; Kader y cols., 2006; Thormann y cols., 2006; Merritt y cols., 2007; Nakhamchik y cols., 2008; Pesavento y cols., 2008).

1.2.1 Metabolismo del c-di-GMP

1.2.1.1 Diguanilato ciclasas (DGCs)

Las DGCs permiten la síntesis de c-di-GMP a partir de 2 moléculas de GTP y magnesio (Ross y cols., 1987). Estudios bioquímicos y genéticos determinaron que su región activa corresponde al dominio proteico GGDEF (Ausmees y cols., 2001, Paul y cols., 2004, Ryjenkov y cols., 2005, Simm y cols., 2004, Tal y cols., 1998), llamado así debido a uno de sus motivos más conservados: Gly-Gly-Asp-Glu-Phe (Hecht y Newton, 1995). Estudios estructurales han revelado que el motivo GGDEF se ubica en un “ β -hairpin” que es parte fundamental del sitio activo (sitio A) debido a su participación en la unión de una molécula de GTP y dos iones Mg^{2+} (Chan y cols., 2004, De y cols., 2008, Wassmann y cols., 2007). Las DGCs actúan como dímeros (Chan y cols., 2004, Christen y cols., 2006) o tetrámeros (De y cols., 2009), lo que permite el encuentro de cada monómero cargado con una molécula de GTP y la condensación de éstas en una molécula de c-di-GMP (figura 2).

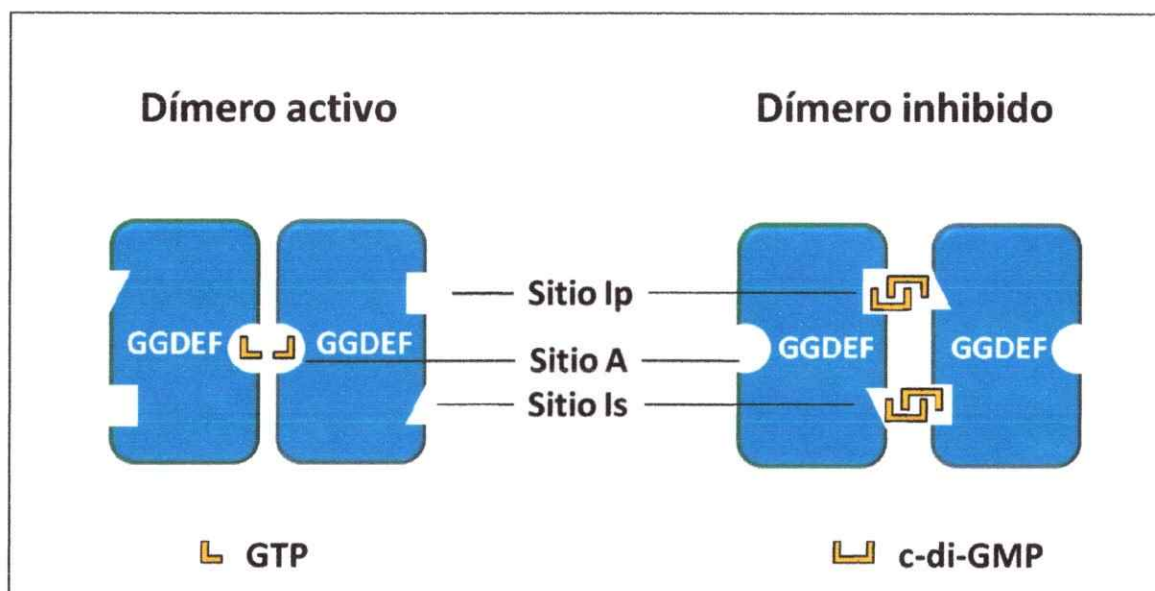


Figura 2. Conformación activa e inactiva de homodímeros de dominios GGDEF. La configuración catalíticamente competente corresponde a un homodímero antiparalelo de dominios GGDEF enfrentados por los sitios de unión a GTP de cada monómero. Un dímero intercalado de c-di-GMP provoca el enfrentamiento de los dominios GGDEF a través de los sitios Ip e Is, ubicados en la cara contraria del sitio de unión de GTP, bloqueando la formación del dímero catalíticamente competente. Adaptado de (Wassmann y cols., 2007).



La actividad de estas enzimas están sujetas a una inhibición no competitiva por producto (Chan y cols., 2004, Christen y cols., 2006), lo que establece una concentración límite de c-di-GMP y previene el gasto de GTP. Cada dominio GGDEF contiene dos sitios de inhibición: el primario (Ip) y el secundario (Is). Un dímero de moléculas de c-di-GMP intercaladas une el Ip de un monómero con el Is del otro, impidiendo la formación del sitio activo y la síntesis de c-di-GMP (Wassmann y cols., 2007) (figura 2). El sitio Ip del dominio GGDEF comprende el motivo RxxD, el cual se encuentra ubicado a cinco aminoácidos río arriba del motivo GGDEF (Chan y cols., 2004; Christen y cols., 2006; Wassmann y cols., 2007) y está conservado en la mayoría de las potenciales DGCs (Christen y cols., 2006).

1.2.1.2 Fosfodiesterasas (PDEs)

Fosfodiesterasas con dominio EAL

La actividad PDE-A permite la apertura del c-di-GMP mediante la hidrólisis de un enlace éster, produciendo el dinucleótido lineal 5'pGpG (Ross y cols., 1987). Al igual que las DGCs, las PDEAs requieren de iones de Mg^{2+} (o Mn^{2+}) para su actividad, sin embargo, a diferencia de las DGCs, las PDEAs son inhibidas fuertemente por Ca^{2+} (Ross y cols., 1987, Schmidt y cols., 2005). Estudios bioquímicos y genéticos determinaron que su región activa corresponde al dominio proteico EAL (Bobrov y cols., 2005, Chang y cols., 2001, Schmidt y cols., 2005, Simm y cols., 2004, Tal y cols., 1998), llamado así debido a uno de sus motivos más conservados: Glu-Ala-Leu (Tal y cols., 1998). Este dominio presenta un plegamiento tipo barril triosafosfato isomerasa ("TIM barrel"), donde el sitio activo corresponde a un bolsillo formado por cerca de 10 aminoácidos que en conjunto coordinan la molécula de c-di-GMP y uno o dos iones Mg^{2+} (Barends y cols., 2009, Minasov y cols., 2009, Rao y cols., 2008, Tchigvintsev y cols., 2010). A pesar de que la mayoría de las PDEs con dominio EAL caracterizadas forman dímeros u oligómeros de mayor orden (Barends y cols., 2009, Tarutina y cols., 2006, Tchigvintsev y cols., 2010), éstas no requieren necesariamente de algún tipo de oligomerización (Schmidt y cols., 2005).

Fosfodiesterasas con dominio HD-GYP

El dominio HD-GYP es un miembro de la superfamilia de fosfohidrolasas dependiente de metal (HD). Inicialmente, este dominio fue postulado como PDE encargada de degradar el c-di-GMP debido a su distribución filogenética (Galperin y cols., 1999, Galperin y cols., 2001), lo que fue comprobado más tarde por análisis bioquímicos con la proteína RpfG de *Xanthomonas campestris*. Estos estudios demostraron que RpfG degrada la molécula de c-di-GMP hasta dos moléculas de GMP (Ryan y cols., 2006). Trabajos genéticos identificaron aminoácidos importantes no sólo en la actividad PDE (Lovering y cols., 2011, Ryan y cols., 2006, Ryan y cols., 2009) sino que también en la interacción proteína-proteína que se ha reportado entre los dominios HD-GYP y GGDEF (Lovering y cols., 2011, Ryan y cols., 2006). Recientemente, se llevó a cabo un análisis estructural del dominio HD-GYP de la proteína Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Lovering y cols., 2011). Al igual que otros miembros de la familia HD, éste dominio muestra una composición de siete α -hélices. Sin embargo, este resultado no permite todavía una extrapolación a la familia HD-GYP, puesto que el dominio cristalizado no posee el residuo de tirosina del motivo conservado GYP, así como tampoco se ha comprobado su actividad como PDE.

1.2.2 Estructura modular de las DGCs y PDEs

Generalmente, las DGCs y PDEs se presentan como proteínas que poseen, además del dominio responsable de su actividad, otros dominios accesorios (tabla 2). En lo que fue inicialmente considerado una “paradoja bioquímica”, muchos dominios GGDEF se presentan acoplados a dominios EAL en una misma cadena polipeptídica. Aunque se ha demostrado la capacidad de algunas de estas proteínas para funcionar como DGC y como PDE (Kumar y Chatterji, 2008, Tarutina y cols., 2006), la mayoría de los estudios apuntan a que sólo uno de los dominios es activo bajo ciertas condiciones (An y cols., 2010, Christen y cols., 2005, Tal y cols., 1998).

Tabla 2. Variedad de arquitectura de dominios en proteínas con actividad DGC y/o PDE

Organismo	Proteína	Arquitectura (NH ₂ -COOH)	Actividad	Referencia
<i>G. xylinus</i>	DGC1	PAS-GGDEF-EAL	DGC	(Tal y cols., 1998)
<i>G. xylinus</i>	DGC3	PAS-GGDEF-EAL	DGC	(Tal y cols., 1998)
<i>E. coli</i>	YeaP	GAF-GGDEF	DGC	(Ryjenkov y cols., 2005)
<i>R. sphaeroides</i>	RSP3513	GAF-GGDEF	DGC	(Ryjenkov y cols., 2005)
<i>T. maritima</i>	TM1163	GAF-GGDEF	DGC	(Ryjenkov y cols., 2005)
<i>D. radiodurans</i>	DRB0044	GAF-GGDEF	DGC	(Ryjenkov y cols., 2005)
<i>Synechocystis sp.</i>	slr1134	GAF-GGDEF	DGC	(Ryjenkov y cols., 2005)
<i>S. typhimurium</i>	AdrA	MASE2-GGDEF	DGC	(Simm y cols., 2004)
<i>G. xylinus</i>	PDEA2	PAS-GGDEF-EAL	PDE	(Tal y cols., 1998)
<i>G. xylinus</i>	PDEA3	PAS-GGDEF-EAL	PDE	(Tal y cols., 1998)
<i>E. coli</i>	YahoraA	HTH-EAL	PDE	(Schmidt y cols., 2005)
<i>V. cholerae</i>	VieA	REC-EAL-HTH	PDE	(Tamayo y cols., 2005)
<i>S. Oneidensis</i>	SO2039	EAL	PDE	(Tchigvintsev y cols., 2010)
<i>N. europea</i>	NE0566	REC-EAL	PDE	(Tchigvintsev y cols., 2010)
<i>R. sphaeroides</i>	BphG1	PAS(bv)-GAF-PHY-GGDEF-EAL ^c	PDE	(Tarutina y cols., 2006)
<i>P. aeruginosa</i>	RocR	REC-EAL ^a	PDE	(Rao y cols., 2008)
<i>T. denitrificans</i>	TBD1265	PBPb-GGDEF-EAL ^a	PDE	(Tchigvintsev y cols., 2010)
<i>S. flexneri</i>	SFV_3559	GGDEF-EAL ^a	PDE	(Tchigvintsev y cols., 2010)
<i>C. violaceum</i>	CV0542	PAS-GGDEF-EAL ^a	PDE	(Tchigvintsev y cols., 2010)
<i>B. burgdorferi</i>	BB0363	EAL	PDE	(Tchigvintsev y cols., 2010)
<i>S. typhimurium</i>	YhjH	EAL	PDE	(Simm y cols., 2004)
<i>M. smegmatis</i>	MSDGC-1	GAF-GGDEF-EAL	DGC, PDE	(Kumar y Chatterji, 2008)
<i>X. campestris</i>	RpfG	REC-HDGYF ^b	PDE	(Ryan y cols., 2006)
<i>P. aeruginosa</i>	PA4781	REC-HDGYF ^b	PDE	(Ryan y cols., 2009)
<i>P. aeruginosa</i>	PA4108	HDGYF ^b	PDE	(Ryan y cols., 2009)
<i>B. burgdorferi</i>	BB0374	HDGYF	PDE	(Sultan y cols., 2011)

^a Sólo los dominios EAL han sido comprobados como PDEs funcionales.

^b Sólo los dominios HDGYF han sido comprobados como PDEs funcionales.

^c En *E. coli*, la PDE BphG1 sufre proteólisis sitio-específica provocando la separación el dominio EAL del resto de la proteína, la que entonces presenta actividad DGC.

El dominio inactivo, el cual generalmente carece de los aminoácidos esenciales para la actividad, puede regular la actividad del dominio activo mediante la unión de ligandos. Por ejemplo, las proteínas CC3396 de *C. crescentus* y RbdA de *P. aeruginosa* utilizan la unión de GTP en su dominio GGDEF para aumentar la actividad PDE del dominio EAL (An y cols., 2010, Christen y cols., 2005). Asimismo, se ha demostrado que otros dominios presentes en DGCs y PDEs pueden modificar estas actividades en respuesta a ciertos estímulos (tabla 3). Por ejemplo, la conformación del homodímero catalíticamente competente de las DGCs PleD y WspR de *C. crescentus* y *P. aeruginosa*, respectivamente, es dependiente de la fosforilación de sus dominios REC (Wassmann y cols., 2007; De y cols., 2009). Hasta ahora, además del c-di-GMP y la fosforilación, se han caracterizado cuatro estímulos (GTP, luz, potencial redox y oxígeno molecular) que modulan las actividades de DGCs y PDEs por la interacción directa con dominios sensores como PAS, REC, GCS y BLUF. Sin embargo, la gran cantidad de genes que codifican proteínas con diversos dominios sensores acoplados a GGDEF, EAL o HD-GYP, hace pensar que otras señales pueden ser transducidas como concentración de c-di-GMP al interior de la célula (Seshasayee y cols., 2010).

1.2.3 Fenotipos regulados por la vía del c-di-GMP

Después del descubrimiento de las DGCs y PDEs, un gran número de proteínas con dominios GGDEF y/o EAL han sido eliminadas o sobre-expresadas en distintas bacterias (Anexo 1). La respuesta celular frente a la variación de las concentraciones intracelulares de c-di-GMP generalmente está relacionada con la transición entre dos estados diferentes adoptados por la mayoría de las bacterias: el estado planctónico motil y el estado comunitario adherido. Recientemente, se han caracterizado distintas clases de efectores (tabla 4) cuya respuesta depende de su unión directa al dinucleótido, explicando así la conexión existente entre los niveles intracelulares del c-di-GMP y los fenotipos regulados.

Tabla 3. Variedad de estímulos detectados y transducidos por DGCs y PDEs

Organismo	Proteína	Arquitectura (NH ₂ -COOH)	Estímulo	Actividad	Referencia
<i>G. xylinum</i>	DGC2	PAS(fad)-GGDEF-EAL	Estado REDOX	DGC	(Qi y cols., 2009)
<i>B. pertussis</i>	BpeGReg	GCS(hem)-X-GGDEF	O ₂	DGC	(Wan y cols., 2009)
<i>E. coli</i>	DosC	GCS(hem)-GGDEF	O ₂ , CO	DGC	(Kitanishi y cols., 2010)
<i>P. fluorescens</i>	WspR	REC-GGDEF	Fosforilación	DGC	(Malone y cols., 2007)
<i>C. crescentus</i>	PleD	REC-REC-GGDEF	Fosforilación	DGC	(Chan y cols., 2004)
<i>B. burgdorferi</i>	Rrp1	REC-GGDEF	Fosforilación	DGC	(Ryjenkov y cols., 2005)
<i>R. sphaeroides</i>	BphG1 ^a	PAS(bv)-GAF-PHY-GGDEF-EAL	Luz	DGC	(Tarutina y cols., 2006)
<i>E. coli</i>	DosP	PAS(hem)-GGDEF-EAL	O ₂	PDE	(Tuckerman y cols., 2009)
<i>G. xylinum</i>	PDEA1	PAS(hem)-GGDEF-EAL	O ₂	PDE	(Chang y cols., 2001)
<i>K. pneumoniae</i>	BirP1	BLUF(fad)-EAL	Luz	PDE	(Barends y cols., 2009)
<i>S. elongatus</i>	SL2 ^b	REC-PAS-PAC-LOV(finn)-GGDEF-EAL	Luz	PDE	(Cao y cols., 2010)
<i>C. crescentus</i>	CC3396	GGDEF-EAL	GTP	PDE	(Christen y cols., 2005)
<i>P. aeruginosa</i>	RbdA	PAS-PAC-GGDEF-EAL	O ₂	PDE	(An y cols., 2010)

^a La dependencia de la actividad DGC con la luz fue demostrada sólo para la proteína trunca sin el dominio EAL (PAS(bv)-GAF-PHY-GGDEF).

^b La dependencia de la actividad PDE con la luz fue sólo demostrada para la proteína trunca LOV(finn)-GGDEF-EAL.

Entre paréntesis aparece el cofactor asociado al dominio sensor: hem, hemo; fad, flavina adenina dinucleótido; bv, biliverdina; fmn, flavina mononucleótido.

Tabla 4. Efectores y fenotipos regulados por la vía del c-di-GMP. Adaptado de (Boyd y O'Toole, 2012).

Efector	Arquitectura (NH ₂ , COOH)	Organismo	Mecanismo	Fenotipo	Referencia
BcsA	CESA-PilZ	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	¿?	Producción de celulosa	(Ryjenkov y cols., 2006, Weinhouse y cols., 1997)
Alg44	PilZ-X-NolF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Interacción proteína-proteína	Producción de alginato	(Merighi y cols., 2007, Oglesby y cols., 2008)
PeID	DUF4118-GAF-GGDEF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	¿?	Producción de polisacárido pel	(Lee y cols., 2007)
FleQ	HTH-AAA-FleQ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Regulación de la transcripción	Formación de biopelículas inhibición de la motilidad	(Hickman y Harwood, 2008)
VpsT	REC-HTH	<i>Vibrio cholerae</i>	Regulación de la transcripción	Producción de VPS	(Kraslava y cols., 2010)
MrkH	X-PilZ	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Regulación de la transcripción	Expresión de pili tipo III y formación de biopelículas	(Fazli y cols., 2011)
Beam1349	X-HTH	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Regulación de la transcripción	formación de biopelículas y virulencia	(Fazli y cols., 2011)
Clp	cNMP-HTH	<i>Xanthomonas campestris</i>	Inhibición de la unión de Clp al DNA	Virulencia	(Chin y cols., 2010, Tao y cols., 2010)
Clp	cNMP-HTH	<i>Xantomonas axonopodis</i>	Inhibición de la unión de Clp al DNA	Virulencia	(Leduc y Roberts, 2009)
LtmA	HTH	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	¿?	Resistencia a antibióticos	(Li y He, 2012)
LapD	Per-HAMP-GGDEF-EAL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Interacción proteína-proteína	Formación de biopelículas	(Navarro y cols., 2011, Newell y cols., 2011a, Newell y cols., 2009)
FimX	REC-PAS-GGDEF-EAL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cambio conformacional	Motilidad tipo "twitching"	(Huang y cols., 2003, Navarro y cols., 2009, Qi y cols., 2011)
CdgG	X-GGDEF	<i>Vibrio cholerae</i>	¿?	Formación de biopelículas y motilidad	(Beyhan y cols., 2008)
PlzA	PilZ	<i>Borrelia burgdorferi</i>	¿?	Motilidad, infectividad	(Freedman y cols., 2010, Pitzer y cols., 2011)
PlzC	X-PilZ-X-PilZ-X	<i>Vibrio cholerae</i>	¿?	Motilidad	(Pratt y cols., 2007)
YegR	YegR-PilZ	<i>Escherichia coli</i>	Interacción proteína-proteína	Motilidad	(Boehm y cols., 2010, Fang y Gornelsky, 2010, Paul y cols., 2010)
DgrA	PilZ	<i>Caulobacter crescentus</i>	Interacción proteína-proteína	Motilidad	(Christen y cols., 2007)
DgrB	PilZ	<i>Caulobacter crescentus</i>	¿?	Motilidad	(Christen y cols., 2007)
PopA	REC-REC-GGDEF	<i>Caulobacter crescentus</i>	Localización en el polo	Progresión del ciclo celular	(Abel y cols., 2011, Duerig y cols., 2009)
PNPasa	RNase PH-RNase PH-KH-S1	<i>Escherichia coli</i>	Activación de la enzima	Procesamiento de RNA	(Tuckerman y cols., 2011)
Vc2	Riboswitch tipo I	<i>Vibrio cholerae</i>	Cambio conformacional	Expresión génica	(Kulshina y cols., 2009, Smith y cols., 2009, Sudarsan y cols., 2008)
84Cd	Riboswitch tipo II	<i>Clostridium difficile</i>	Empalme alternativo de RNA	Control traduccional	(Lee y cols., 2010, Smith y cols., 2011)

1.2.3.1 Formación de biopelículas

El primer fenotipo regulado por c-di-GMP descubierto fue la activación de síntesis de celulosa en *G. xylinus*. Cuando este microorganismo es crecido en cultivos estáticos, en la interfase líquido-aire también se producen densas biopelículas que contienen celulosa. Dependiendo de la cepa de *G. xylinus*, la síntesis de celulosa puede depender de la presencia de los genes *bcsA* y *bcsB* (Mayer y cols., 1991, Wong y cols., 1990) o de una fusión de estos (*acsAB*) (Lin y cols., 1990, Saxena y cols., 1990, Saxena y cols., 1991), cuyos productos génicos constituyen parte integral del complejo celulosa sintasa (Kimura y cols., 2001, Saxena y cols., 1994). Este complejo de membrana es capaz de unir c-di-GMP directamente (Weinhouse y cols., 1997) y aumentar, entonces, hasta doscientas veces su actividad basal (Aloni y cols., 1983, Aloni y cols., 1982, Ross y cols., 1985). Mediante análisis bioinformáticos, se reveló en la subunidad A de este complejo (BcsA) la presencia de un dominio PilZ (Amikam y Galperin, 2006), el que es responsable de la unión a c-di-GMP (Ryjenkov y cols., 2006). El dominio PilZ se encuentra ampliamente diseminado en Bacteria y su distribución filogenética se asemeja a la mostrada por los dominios GGDEF, EAL y HDGYP. Al igual que estos dominios, PilZ puede existir solo o en conjunción con otros dominios en la misma cadena polipeptídica (Amikam y Galperin, 2006), sugiriendo que la unión de c-di-GMP puede gatillar distintos fenómenos intracelulares.

De forma similar a BcsA en *G. xylinus*, la proteína de membrana interna Alg44 de *P. aeruginosa* (Remminghorst y Rehm, 2006a) es capaz de activar la síntesis polisacáridos extracelulares mediante la unión de c-di-GMP. Alg44 une c-di-GMP en su dominio PilZ citoplasmático y activa la síntesis de alginato (Merighi y cols., 2007), un homopolímero lineal formado por residuos de D-manuronato (Evans y Linker, 1973). Otro fenotipo multicelular agregativo de esta bacteria es la película que se desarrolla en la interfase líquido-aire en cultivos estáticos, la que está formada por células inmersas en una matriz extracelular compuesta por el polisacárido PEL (Friedman y Kolter, 2004b), cuya síntesis depende de genes ubicados en el operón *pelABCDEFG* (Friedman y Kolter, 2004a). PelD es una proteína de membrana interna posee un dominio citoplasmático estructuralmente similar al dominio

GGDEF sin actividad DGC, el que contiene un motivo RxxD similar al sitio Ip de las DGC. La unión de c-di-GMP a este sitio permite la activación de la síntesis del polisacárido Pel (Lee y cols., 2007). Además de la regulación alostérica postraduccionaI mediante PelD, el c-di-GMP modula la síntesis del exopolisacárido PEL a través de la regulación de la transcripción del operón *pelABCDEFGHIJ*. FleQ es un regulador transcripcional que actúa como activador de la transcripción de genes involucrados en la síntesis del aparato flagelar (Arora y cols., 1997) y como inhibidor de la transcripción del operón *pelABCDEFGHIJ* (Hickman y Harwood, 2008). FleQ es capaz de unir c-di-GMP en su dominio AAA, lo que por un lado determina una leve disminución de la transcripción de genes flagelares, pero por otro, provoca un gran aumento de la transcripción del operón *pelABCDEFGHIJ* promoviendo la formación de biopelículas (Hickman y Harwood, 2008). De forma similar, el regulador transcripcional VpsT de *V. cholerae* tiene la capacidad de unir c-di-GMP lo que induce la transcripción de genes *vps* involucrados en la producción del exopolisacárido VPS (del inglés “vibrio polysaccharide”) (Krasteva y cols., 2010). Ensayos de motilidad demostraron que la unión de c-di-GMP a VpsT es requerida para disminuir la motilidad, por lo que VpsT regula inversamente la formación de biopelículas y la motilidad en *V. cholerae* (Krasteva y cols., 2010). En otra bacteria del mismo género, *V. parahemolyticus*, un homólogo de VpsT, CpsQ, es capaz de unir c-di-GMP y activar la transcripción del operón *cps* (Ferreira y cols., 2011), el que codifica proteínas requeridas para la síntesis de exopolisacárido y la formación de biopelículas (Boles y McCarter, 2002, Ferreira y cols., 2008). Otro regulador transcripcional involucrado en la síntesis de exopolisacáridos es Bcam1349 de *Burkholderia cenocepacia*, cuya unión a c-di-GMP aumenta su afinidad por el promotor de genes involucrados en la síntesis de celulosa, permitiendo aumentar la formación de biopelículas (Fazli y cols., 2011). Otros reguladores transcripcionales cuya función es modulada por c-di-GMP controlan la síntesis de SPes distintas a los polisacáridos. Por ejemplo, en *Klebsiella pneumoniae*, la adherencia a superficies está mediada por el pili tipo III, cuyos componentes de están codificados en el operón *mrkABCDEF* (Allen y cols., 1991). El factor transcripcional MrkH es capaz de unir c-di-GMP en su dominio PilZ, lo que

induce su unión al promotor del operón *mrkABCD* promoviendo su transcripción y el desarrollo de biopelículas (Wilksch y cols., 2011).

Otros efectores de la vía del c-di-GMP corresponden a los dominios GGDEF y EAL degenerados que no poseen actividad DGC ni PDE, pero que conservan aminoácidos clave en la unión del c-di-GMP. *Pseudomonas fluorescens* es capaz de regular la formación de biopelículas mediante un efector de la vía del c-di-GMP con dominio EAL. La formación de biopelículas de esta bacteria depende del transporte de una adhesina de membrana externa (LapA) mediante un transportador ABC (LapE/B/C) (Hinsa y cols., 2003), y de la proteína LapD (Hinsa y O'Toole, 2006). LapD contiene dominios GGDEF y EAL degenerados, sin embargo, es capaz de unir c-di-GMP en su dominio EAL (Newell y cols., 2009). LapD existe como dímero anclado a la membrana interna a través de los dominios HAMP, presentando una porción citoplasmática (GGDEF-EAL) y otra periplásmica (Navarro y cols., 2011). La unión de c-di-GMP a los dominios EAL del dímero de LapD provoca un cambio conformacional que es transmitido a través del dominio HAMP hasta el dominio periplasmático (Newell y cols., 2009). Esto, a su vez, permite la interacción del dominio periplasmático de LapD con la proteasa periplasmática LapG, (cuyo blanco es el extremo N-terminal de LapA), evitando que la adhesina LapA sea procesada y entonces permanezca anclada a la membrana externa (Navarro y cols., 2011, Newell y cols., 2011a).

1.2.3.2 Motilidad

En bacterias Gram negativas, la motilidad está relacionada directamente con la formación de biopelículas. En un inicio, células motiles planctónicas contactan la superficie y se adhieren a ella de forma reversible. Algunas de ellas lo hacen mediante el flagelo, posicionándose verticalmente respecto a la superficie, lo que posteriormente permite un contacto a lo largo del eje de la célula. Esto promueve un contacto irreversible que se caracteriza por la detención de la motilidad flagelar y la aparición de la motilidad tipo "twitching". La motilidad tipo "twitching" permite el agrupamiento de las células en "microcolonias" (O'Toole y Kolter, 1998, Semmler y cols., 1999), estructuras que posteriormente

crecen tridimensionalmente y experimentan una serie de cambios de expresión génica que conducen, entre otros efectos, a la activación de sistemas de QS y la producción de SPEs (Sauer y cols., 2002).

El aparato flagelar bacteriano está compuesto por un filamento de varios micrómetros de longitud que se comunica mediante una estructura en forma de gancho ("hook") con un cuerpo basal inserto en la membrana plasmática (DePamphilis y Adler, 1971, Joys, 1968). La rotación de este organelo permite los desplazamientos tipo "swarming" y "swimming" en diferentes bacterias (Henrichsen, 1972, Larsen y cols., 1974, Silverman y Simon, 1974). El "swarming" es un movimiento continuo y regular que ocurre sobre una superficie, el que se caracteriza por seguir el eje longitudinal de las células, las que generalmente se encuentra agregadas formando patrones de migración altamente organizados en bandas o remolinos. A diferencia del "swarming", el "swimming" ocurre en cultivos líquidos o cuando la capa de fluido sobre la superficie sólida del medio es suficientemente profunda. Aquí, el movimiento de las células es individual, y a veces azaroso, lo que produce patrones de migración desorganizados. En *E. coli* y *S. typhimurium*, la proteína YcgR une c-di-GMP en su dominio PilZ (Christen y cols., 2007, Ryjenkov y cols., 2006) y afecta negativamente tanto el "swimming" como el "swarming" (Ryjenkov y cols., 2006). El mecanismo de esta inhibición ha sido investigado detalladamente en *E. coli*, donde se ha demostrado que la unión de c-di-GMP a YcgR aumenta su interacción con las proteínas del rotor FliG y FliM, reduciendo la generación de torque (Fang y Gomelsky, 2010, Paul y cols., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la unión de c-di-GMP a YcgR permite su interacción con la proteína del estátor MotA, lo que hipotéticamente aumenta las interacciones electrostáticas entre MotA y FliG, deteniendo la rotación del filamento (Boehm y cols., 2010). Otras proteínas con dominio PilZ que son capaces de unir c-di-GMP y reprimir la motilidad incluyen a PlzC de *V. cholerae* (Pratt y cols., 2007) y DgrA y DgrB de *C. crescentus* (Christen y cols., 2007). Aunque el mecanismo no ha sido completamente dilucidado, en el caso de DgrA, la evidencia indica que su unión a c-di-GMP reduce los niveles de FliL, la que es requerida para la rotación del flagelo en este microorganismo (Christen y cols., 2007, Wolfe y Visick, 2008). Recientemente, se ha demostrado que PlzA de *Borrelia*

burgdorferi tiene la capacidad de unir c-di-GMP en su dominio PilZ (Freedman y cols., 2010). Sin embargo, al contrario de los ejemplos anteriores, mutantes en *plzA* muestran una disminución en “swarming”, indicando que PlzA podría actuar como activador post-transcripcional de la motilidad (Pitzer y cols., 2011).

La motilidad tipo “twitching” ocurre por la extensión, anclaje y retracción del pili tipo IV (Bradley, 1980, Skerker y Berg, 2001), un largo y delgado apéndice proteico que se extiende por varios micrómetros desde la membrana plasmática hacia el exterior. En *P. aeruginosa*, la proteína FimX es requerida para la motilidad tipo “twitching” (Huang y cols., 2003, Kazmierczak y cols., 2006). FimX posee dominios GGDEF y EAL degenerados sin actividad DGC (Kazmierczak y cols., 2006) ni PDE (Rao y cols., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que FimX puede unir c-di-GMP en su dominio EAL, provocando un cambio conformacional en la región N-terminal, lo que a su vez, podría inducir la interacción de FimX con componentes del complejo del pili tipo IV, tal como en ocurre en *Xanthomonas axonopodis pv. citri* (Navarro y cols., 2009; Qi y cols., 2011). El dominio EAL del homólogo de FimX de *X. axonopodis pv. citri*, XAC₂₃₉₈, une c-di-GMP e interactúa con una proteína que contiene un dominio PilZ (incapaz de unir c-di-GMP), PilZ_{XAC1133}, la cual a su vez interactúa con un componente de membrana interna del motor del pili tipo IV (PilB) (Guzzo y cols., 2009).

En *C. crescentus*, se ha encontrado una relación entre el ciclo celular y la transición entre los estados motil y adherido. Las células de *C. crescentus* se dividen asimétricamente produciendo dos células hijas distintas, una pequeña motil y otra de mayor tamaño adherida. La célula hija adherida reinicia la replicación del cromosoma inmediatamente, mientras que el cromosoma de la célula motil permanece quiescente por un tiempo. La transición desde el estado motil al adherido coincide con la suspensión del bloqueo de la replicación provocado por el regulador CtrA, el cual, en su estado fosforilado, bloquea la iniciación de la replicación uniéndose directamente a cinco sitios en la región OriC del cromosoma, donde aparentemente restringe el acceso de los factores de iniciación (Quon et al.

1998). Para iniciar la replicación del cromosoma, CtrA-P es eliminado de la célula por dos mecanismos: defosforilación y proteólisis (Domian et al. 1997). Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que CtrA es degradado por la proteasa ClpXP (Jenal and Fuchs 1998; Chien et al. 2007). El efector de la vía del c-di-GMP PopA posee un dominio GGDEF con el sitio activo alterado, pero conserva intacto el sitio de inhibición alosterica (RxxD) (Duerig y cols., 2009). Se ha demostrado que la unión de c-di-GMP al sitio-I de PopA permite su localización en el polo adherido de la célula, donde recluta a CtrA para su procesamiento por ClpXP, lo que a su vez, permite la replicación del DNA y la progresión del ciclo celular (Duerig y cols., 2009).

1.2.3.3 Otros fenotipos regulados por c-di-GMP

Aunque el rol principal de la vía del c-di-GMP es la regulación de la transición entre los estados planctónico/motil y adherido/agregado, recientemente se han descrito funciones celulares controladas por este segundo mensajero que no se relacionan directamente con estos fenotipos. La inactivación de DGCs y PDEs específicas en distintas bacterias ha permitido determinar que el c-di-GMP juega un rol en la sobrevivencia de patógenos intracelulares en distintos hospederos (Bharati y cols., 2012, He y cols., 2011), la formación de heterocistos en la cianobacteria *Anabaena* sp., el comportamiento depredador de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Hobley y cols., 2012), y la regulación de la esporulación *Streptomyces coelicolor* (Hull y cols., 2012). Estudios de proteínas efectoras también han sido de utilidad en la determinación de la regulación por c-di-GMP de ciertos fenotipos. Por ejemplo, se ha demostrado que la unión de c-di-GMP al regulador transcripcional LtmA de *Mycobacterium smegmatis* induce su unión con promotores río arriba de genes involucrados en el metabolismo y el transporte de lípidos, e induce su expresión (Li y He, 2012). La sobreexpresión de LtmA resulta en la disminución de la permeabilidad de la membrana y en un incremento en la resistencia a ciertos antibióticos. El regulador transcripcional Clp de *Xanthomonas campestris* y *X. axonopodis* son capaces de unir c-di-GMP, lo que evita su unión al promotor de los genes *engXCA* que codifican para factores de virulencia (Leduc y Roberts, 2009, Tamayo y cols., 2005, Tao y cols., 2010). Estos hechos implican que la

funcionalidad de DGCs, PDEs y/o efectores no asegura de ningún modo que estos elementos estén involucrados en regular la adherencia a sustrato y el desarrollo de biopelículas. De hecho, en ciertas bacterias, la regulación de la formación de biopelículas ocurre de forma independiente del c-di-GMP (Holland y cols., 2008).

1.3 Planteamiento del problema

1.3.1 Vía del c-di-GMP en *Acidithiobacillus*

Al comienzo de esta tesis, la única relación entre c-di-GMP y bacterias pertenecientes al género *Acidithiobacillus* había sido revelada en *At. ferrooxidans* por nuestro laboratorio (Ruíz y cols., 2007). Esta bacteria posee una vía del c-di-GMP funcional que involucra cuatro proteínas con ambos dominios, GGDEF y EAL, una con dominio EAL y dos con tipo PilZ. La sobreexpresión de cada uno de los cuatro genes con dominio GGDEF en *E. coli* indica la funcionalidad de estas proteínas como DGCs (Ruiz y cols., 2012). Por otra parte, células de *At. ferrooxidans* adheridas a sustrato sólido poseen niveles superiores de c-di-GMP respecto de células planctónicas, sugiriendo que el dinucleótido podría estar involucrado en la regulación de fenotipos como la adherencia a sustrato. Por otra parte, puesto que el QS tipo AI-1 parece ser exclusivo de *At. ferrooxidans* (Valdés y cols., 2008), para iniciar esta tesis formulamos la siguiente pregunta: ¿Es la vía del c-di-GMP un mecanismo regulatorio común utilizado por otros miembros del género *Acidithiobacillus*? Como resultados iniciales de esta tesis, se habían identificado en *At. thiooxidans* y *At. caldus*, elementos genéticos que codificarían para DGCs, PDEs y efectores de la vía del c-di-GMP, entregando los primeros indicios para afirmar que ésta vía estaría ampliamente distribuida en *Acidithiobacillus* (Castro y cols., 2009). No obstante, no existían mayores antecedentes acerca de qué funciones celulares están reguladas por esta vía en distintos *Acidithiobacillus*, y si éstas comprenden el desarrollo de biopelículas y/o la motilidad.

Debido al rol fundamental que cumplen las DGCs en la regulación mediante c-di-GMP, es relevante caracterizar este tipo de enzimas como primer paso para establecer la funcionalidad de la vía. La función de un determinado gen puede ser investigada mediante su expresión heteróloga en otro hospedero o bien mediante su mutación en el propio organismo. Sin embargo, retornar genes a microorganismos lixiviantes una vez que han sido estudiados en un hospedero sustituto ha sido un desafío durante décadas. Esto implica que la función del gen no puede ser probada directamente en el microorganismo en cuestión, lo que ha impedido seriamente el progreso del entendimiento de la fisiología de bacterias lixiviantes y de la obtención de cepas modificadas genéticamente. La transferencia de plasmidios mediante conjugación con *E. coli* y la expresión de genes heterólogos se ha reportado para *At. ferrooxidans* (Liu y cols., 2001, Peng y cols., 1994), *At. thiooxidans* (Jin y cols., 1992, Tian y cols., 2003) y *At. caldus* (Kotze y cols., 2006, Liu y cols., 2007, Zhao y cols., 2005). Esto también ha sido logrado mediante electroporación de *At. ferrooxidans* (Kusano y cols., 1992) y recientemente de *At. caldus* (Chen y cols., 2010). La sobreexpresión de una DGC puede aumentar cientos de veces los niveles de c-di-GMP (Nakayama y cols., 2011, Simm y cols., 2004) lo que podría afectar uno o más fenotipos a través de distintos efectores. Entonces, para determinar la influencia de una DGC en la regulación de un fenotipo dado, la obtención de un mutante nulo en una DGC es más correcta desde un punto de vista fisiológico. En *Acidithiobacillus*, la obtención de mutantes definidos precisamente al nivel molecular ha sido particularmente más complicada que la incorporación de plasmidios. En el año 2000, se obtuvo el primer mutante nulo en estos microorganismos (*At. ferrooxidans*) mediante mutagénesis de intercambio de marcador (MEM) (Liu y cols., 2000). Esta técnica permite la construcción de mutantes especialmente diseñados y consiste en la introducción de un "plasmidio suicida" en el microorganismo mediante conjugación con *E. coli*. El plasmidio suicida lleva un marcador seleccionable insertado dentro del gen que será mutado y es incapaz de replicar en el hospedero, por lo que la única manera de mantener la selección es por la inserción del plasmidio en el cromosoma (lo que involucra un evento de recombinación) o por un intercambio entre el gen silvestre del cromosoma y el gen mutado del plasmidio (dos eventos de recombinación). No obstante, no fue

hasta el año 2008 que esta técnica fue aplicada exitosamente de nuevo. Esta vez, la obtención de dos mutantes nulos de *At. caldus* indicaba la factibilidad de la utilización esta técnica en esta bacteria (van Zyl y cols., 2008). Recientemente, y en forma paralela a esta tesis, se ha obtenido un tercer mutante en *At. caldus*, donde la introducción del plasmidio suicida se logró mediante electroporación (Chen y cols., 2012).

1.3.2 *Acidithiobacillus caldus* como modelo de estudio

Acidithiobacillus caldus fue aislado desde una mina de carbón en 1983 (Marsh y Norris, 1983) y caracterizado como una bacteria Gram negativa acidófila (pH 2-2,5) capaz de obtener energía quimiolitotroficamente a partir de la oxidación de azufre elemental, tetrionato, tiosulfato, sulfuros, sulfito e hidrógeno molecular (Hallberg y cols., 1996a, Hallberg y Lindstrom, 1994). A diferencia de los otros miembros del género *Acidithiobacillus*, (*At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *At. albertensis* y *At. ferrivorans*), el crecimiento de *At. caldus* no es inhibido por material orgánico, siendo capaz de crecer mixotróficamente con extracto de levadura o glucosa. Además, es un microorganismo termófilo moderado (45°C) (Hallberg y Lindstrom, 1994) y presenta alta resistencia a arsénico (Dopson y Lindstrom, 1999, Hallberg y cols., 1996b, Kotze y cols., 2006, Tuffin y cols., 2005). Estas características permiten que *At. caldus* sea el oxidador de azufre más abundante en procesos de biooxidación que operan entre 40 y 55°C. Junto con el oxidador de hierro *Leptospirillum ferrooxidans*, *At. caldus* domina las poblaciones en procesos de biooxidación de sulfuros polimetálicos (Okibe y cols., 2003) y concentrados de arsenopirita, cobre y níquel (Rawlings, 2002, Rawlings y cols., 1999). Asimismo, en conjunto con otro oxidador de hierro (y azufre), *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *At. caldus* domina las poblaciones de procesos de biooxidación de arsenopirita, piritita y calcopirita (Dopson y Lindstrom, 2004). A pesar de que la oxidación de minerales como la piritita y arsenopirita ocurre más rápido con cultivos mixtos de *At. caldus* y *Leptospirillum* (Okibe y cols., 2003, Okibe y Johnson, 2004) o de *At. caldus* y *S. thermosulfidooxidans* (Dopson y Lindstrom, 1999) que con cultivos axénicos, se ha demostrado que *At. caldus* es capaz de oxidar eficientemente minerales como

la esfalerita (ZnS) (Semenza y cols., 2002). Estos trabajos han propuesto posibles roles de *At. caldus* en la oxidación de minerales. Por una parte, *At. caldus* produce los protones necesarios para la disolución de minerales ácido-solubles como la esfalerita y para la mantención de Fe^{3+} en solución. Por otra parte, *At. caldus* puede remover la capa de azufre que se deposita sobre el mineral durante el proceso, permitiendo el acceso de Fe^{3+} al mineral (Dopson y Lindstrom, 1999).

Al igual que otras bacterias lixiviantes, gran parte de las células de *At. caldus* permanecen adheridas al mineral (pirita, marcasita y arsenopirita) (Edwards y cols., 2000). Se ha demostrado cierta preferencia de adherencia a sitios que presentan imperfecciones y/o depósitos de azufre elemental (Edwards y Rutenberg, 2001), por lo que se ha propuesto que *At. caldus* podría seleccionar quimiotácticamente el lugar de adherencia respondiendo a gradientes de azufre (Edwards y cols., 2000). En comparación con la población planctónica, las células adheridas a azufre elemental parecen estar menos necesitadas energéticamente, lo que concuerda con la proximidad inmediata del sustrato y con la sobreexpresión de proteínas involucradas en la oxidación de éste (Mangold y cols., 2011). La importancia y ubicuidad de *At. caldus* en procesos de recuperación de diversos metales, así como también su capacidad de desplazarse mediante motilidad flagelar y adherirse a sustratos sólidos, hacen que esta bacteria sea un excelente candidato para indagar la existencia de una vía funcional mediante c-di-GMP en otro miembro del género *Acidithiobacillus* y evaluar si ésta se relaciona directamente con la motilidad celular y regulación de la adherencia a sustrato y formación de biopelículas.

1.4 Hipótesis y objetivos

Hipótesis:

Acidithiobacillus caldus ATCC 51756 posee una vía de señalización mediante c-di-GMP funcional, la cual regula los fenotipos de motilidad y adherencia.

Objetivo General:

Caracterizar la vía del c-di-GMP en *At. caldus* ATCC 51756 y su relación con los fenotipos de motilidad y adherencia.

Objetivos Específicos:

- 1.- Búsqueda y análisis bioinformático de componentes genéticos involucrados la vía del c-di-GMP el genoma de *At. caldus* ATCC 51756.
- 2.- Detección del mensajero secundario c-di-GMP en células de *At. caldus* ATCC 51756.
- 3.- Evaluación de la funcionalidad de putativas diguanilato ciclasas codificadas en el genoma *At. caldus* ATCC 51756.
- 4.- Construcción y caracterización de la cepa $\Delta 1413$ DGC⁻ de *At. caldus*.
 - 4.1.- Obtención de la cepa $\Delta 1413$ DGC⁻
 - 4.2.- Medición comparativa de los niveles intracelulares de c-di-GMP de las cepas ATCC 51756 y $\Delta 1413$ de *At. caldus*.
 - 4.3.- Caracterización de los fenotipos de motilidad y adherencia de las cepas ATCC 51756 y $\Delta 1413$ de *At. caldus*.

2. METODOLOGÍA

2.1 Cepas y medios de cultivo

Acidithiobacillus caldus ATCC 51756 fue donado gentilmente por el Dr. Mark Dopson del Departamento de Biología Molecular de la universidad de UMEA, Suecia. *At. caldus* fue cultivado en medio de sales minerales (MSM), consistente en lo siguiente: (g/l): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3), $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$ (3,2), KCl (0,1), K_2HPO_4 (0,05), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (0,01). El medio también contuvo los siguientes elementos traza (mg/l): $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (11), $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5), HBO_3 (2,0), $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (2,0), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,8), $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ (0,6), $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,9), Na_2SeO_4 . Se prepararon concentrados de las sales basales (10X) y de las sales traza (100X), los cuales posteriormente fueron diluidos adecuadamente con agua destilada estéril para el cultivo del microorganismo. Cuando se utilizó azufre elemental (50 g/l) como fuente energética, los concentrados fueron ajustados con ácido sulfúrico hasta alcanzar pH 2,5. Por otro lado, cuando se usaron fuentes energéticas solubles como tetrionato ($\text{K}_2\text{S}_4\text{O}_6$) (2 mg/ml), los concentrados fueron ajustadas a pH 4,7. El medio sólido fue preparado mezclando sales basales 2X pH 4,7 y phytigel 1,75% (p/v) (Sigma-Aldrich), ambos a 50°C, a lo que posteriormente se le agregó sales traza pH 4,7 y tetrionato a una concentración final de 0,2%.

Las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium* utilizadas en esta tesis fueron amablemente aportadas por el Dr. Paolo Landini (University of Milan) y la Dra. Ute Römling (Karolinska Institute), respectivamente (tabla 8, sección 2.6 de este capítulo, página 41).

2.2 Herramientas Bionfórmáticas

El genoma parcialmente secuenciado de *At. caldus* ATCC 51756 fue amablemente aportado por el "Center for Bioinformatics and Genome Biology" de la Fundación Ciencias para la Vida dirigido por el Dr. David Holmes. Para identificar genes relacionados con la vía de señalización mediante c-di-

GMP en *At. caldus*, los modelos de los marcos ocultos de Markov (HMM) de los dominios GGDEF, EAL, HD y PilZ, fueron obtenidos desde Trust Sanger Institute server, Pfam. La búsqueda fue realizada mediante HMMER 2.3.2 (Finn y cols., 2011) usando los HMM como entradas y el proteoma de *At. caldus* ATCC52756 como base de datos. La búsqueda de homólogos a PelD, FleQ y Clp en *At. caldus*, fue realizada mediante análisis de BLASTP (Altschul y cols., 1997), utilizando las secuencias con números de acceso NCBI: AAG06449.1 (PelD), AAY47667 (FleQ) y AAC37124.1 (Clp) como entradas y el proteoma de *At. caldus* ATCC52756 como base de datos. La anotación de las secuencias seleccionadas fue llevada a cabo con ARTEMIS (Rutherford y cols., 2000). Los homólogos más cercanos a las proteínas candidatas fueron identificados mediante BlastP utilizando la base de datos de proteínas no redundante de GenBank. Asimismo, los dominios presentes en las proteínas candidatas fueron predichos por BlastP usando la base de datos de dominios conservados de Swissprot. Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas usando ClustalW (Larkin y cols., 2007). Los alineamientos fueron editados manualmente mediante javalview (www.jalview.org) y visualizados a través de ESPRIPT (Gouet y cols., 1999). Los dominios transmembrana fueron predichos por el servidor SubCell (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SubCell/abstract.php>). Posteriores análisis fueron realizados con Expert Protein Analysis System portal (<http://www.expasy.org/>).

2.3. Detección y cuantificación de c-di-GMP

2.3.1 Cuantificación de c-di-GMP en *At. caldus* mediante espectrometría de masas

Los nucleótidos fueron extraídos con solventes orgánicos en base a lo descrito previamente por Ruiz y colaboradores (2012). Las bacterias se cosecharon desde cultivos en fase exponencial tardía y fueron lavadas dos veces con agua ácida pH 1,5. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 1 ml de 50 mM Tris, pH 8,5 y fueron sonicadas por cuatro ciclos de 30 segundos seguido de incubación a -80 °C por 5 min, lo que a su vez se repitió tres veces. El extracto proteico fue mezclado con 1 ml de cloroformo, 4 ml de metanol y 3 ml de agua nanopura y se centrifugo a 13.000 rpm por 15

min. La fase acuosa enriquecida en nucleótidos fue rescatada para el análisis mediante espectrometría de masas. El estándar de c-di-GMP consistente en el compuesto sintetizado químicamente, fue donado por el profesor Nicolas Amiot de la Universidad de Basilea, Suiza. El estándar se preparó a una concentración de 0,175 mg/ml en acetonitrilo 80% v/v y acetato de amonio 20 mM. Los extractos ricos en nucleótidos obtenidos desde *At. caldus* se diluyeron 1:10 en acetonitrilo 80% v/v y acetato de amonio 20 mM. Los espectrogramas se obtuvieron en un espectrómetro de masas de tipo electrospray-trampa iónica Esquire 4000 ESI-IT (Bruker Daltonics, Inc., MA-USA). Se inyectaron en forma directa 100 µL de estándar y de muestra utilizando una bomba de jeringa (Cole-Parmer, IL-USA) a un flujo de 3 µL/min. La nebulización se realizó utilizando los parámetros seleccionados por defecto (temperatura de nebulización, 300 °C; presión de nebulización, 10 psi; flujo de gas nebulizador, 5 L/min). La adquisición de los cromatogramas MS se realizó en modo polaridad negativa, en el cual la especie $[M-H]^-$ del c-di-GMP corresponde a iones con razón masa/carga (m/z) 689. Para las distintas muestras se obtuvieron los cromatogramas de la corriente total de iones. Para visualización de la especie m/z 689 en los extractos ricos en nucleótidos obtenidos desde *At. caldus*, se generó un cromatograma específico seleccionando dicho ión con una precisión de $\pm 0,5$ m/z (filtro de selección "all ms"). La obtención de los cromatogramas MS/MS se obtuvieron para la totalidad de los iones provenientes del fraccionamiento del ion m/z 689 $\pm 0,5$, destacándose las transiciones m/z 689 \rightarrow 344 y m/z 689 \rightarrow 538, características del c-di-GMP.

2.3.2 Cuantificación de c-di-GMP en *S. typhimurium* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La expresión de los genes río abajo del promotor *ara* fue realizada como sugiere Guzmán y colaboradores (1995). Las cepas de *S. typhimurium* transformadas con los plasmidios pBAD24, pBAD24_AdrA y pBAD24_1413 fueron crecidas toda la noche en medio LB con los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml). Las células fueron separadas del medio de cultivo mediante centrifugación y lavadas dos veces con agua estéril. La inducción fue iniciada reinoculando

las células en medio definido M9 suplementado con 1% de glicerol y 0,2% L-arabinosa, manteniéndose por 4 h a 37°C con agitación. La extracción de c-di-GMP fue realizada mediante una modificación del método descrito por Antoniani y colaboradores (2010). Las células se colectaron mediante centrifugación, fueron resuspendidas en 0,7 ml de Tris 50 mM pH 8,5 y lisadas mediante sonicación. Los restos celulares fueron removidos mediante centrifugación y el sobrenadante fue sometido a una extracción ácida con 0,35 ml de HClO₄ 1,2 M (concentración final 0,4 M). Los sobrenadantes fueron neutralizados con 0,3 ml de K₂CO₃ 1,6 M, mantenidos 15 min en un baño de hielo y centrifugados a 12.000 × g por 10 min. Los extractos ricos en nucleótidos fueron rescatados, filtrados y concentrados hasta 200 µl mediante evaporación bajo vacío a 40°C (“speedvacc”). Veinte µl fueron inyectados en el sistema de HPLC. Se utilizó una columna Supelcosil de fase reversa C18 con un tamaño de partícula de 3 µm, una longitud de 15 cm y 3 mm de diámetro (LC-18-DB). La elución se realizó a 22°C con un flujo de 0,5 ml/min, comenzando con 5 ml de amortiguador A (120 mM KH₂PO₄, pH 6,0), continuando con un gradiente lineal hasta alcanzar 20% de metanol en un volumen de 5 ml, finalizando con 5 ml más de amortiguador A. El cromatograma fue registrado a una absorbancia de 254 nm. El pico correspondiente al c-di-GMP fue determinado por coelución con 2 nmoles de la molécula pura comercial (Biolog, Bremen, Alemania) y por la comparación del espectro de absorción. La cantidad de c-di-GMP fue calculada sobre la base de la curva de calibración obtenida con el estándar de c-di-GMP (anexo 2).

2.3.3 Cuantificación de los niveles de c-di-GMP en las cepas silvestre y mutante Δ1413 de *At. caldus* mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Las cepas ATCC51756 y ΔACA_1413 de *At. caldus* fueron crecidas en azufre elemental. Cultivos de 400 ml fueron centrifugados y las células cosechadas fueron lavadas dos veces con agua ácida (pH 1,5) y luego resuspendidas en 0,7 ml de Tris 50 mM pH 8,5 para ser lisadas mediante sonicación. Los restos celulares fueron removidos mediante centrifugación y el sobrenadante fue sometido a una extracción ácida con 0,35 ml de HClO₄ 1,2 M (concentración final 0.4 M). Los sobrenadantes fueron

neutralizados con 0,3 ml de K_2CO_3 1.6 M, mantenidos 15 min en un baño de hielo y centrifugados a $12,000 \times g$ por 10 min. Los extractos ricos en nucleótidos fueron rescatados, filtrados y liofilizados. La cuantificación de los niveles de c-di-GMP se realizó en el Centro de Metabolómica y espectrometría de masas del instituto de investigación Scripps (The Scripps Research Institute), California, EEUU. Las muestras fueron resuspendidas en 200 μ L de acetato de amonio 10 mM. Cinco μ l de las muestras fueron inyectados a un sistema de HPLC Agilent 1290 equipado con una columna Keystone Scientific Nucleosil 2.0 x 50 mm, C18 fase reversa. Las corridas de las muestras se realizaron con un flujo de 400 μ L/min, comenzando con 3 min de amortiguador A (NH_4OAc 10 mM), seguido de un gradiente de 3 min hasta alcanzar 100% amortiguador B (metanol), condición que se continuó hasta los 10 min. El eflujo del HPLC fue directamente conectado al espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6490 equipado con un electrosprey. La detección del c-di-GMP se realizó utilizando la técnica de monitoreo de una reacción seleccionada (SRM), en la cual un ion particular proveniente de la fragmentación de un ion parental determinado es monitoreado. Los valores m/z de estos iones se les conoce como "transición". Utilizando el modo de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) en polaridad positiva, fue posible medir simultáneamente las transiciones +691,1 \rightarrow 151,9 (ion cuantificador) y +691,1 \rightarrow 135,0 (ion calificador), las que se han reportado con anterioridad como transiciones correspondientes a la fragmentación del ion parental de c-di-GMP (m/z 691,1) (Hickman y Harwood, 2008, Spangler y cols., 2010). La transición cuantificadora es la más intensa y es utilizada para cuantificar. Por otra parte, la transición calificadora es usada para confirmar la identidad del c-di-GMP mediante la razón ion cuantificador/ion calificador (46,9 para el estándar de c-di-GMP). La cuantificación del dinucleótido se obtuvo interpolando la respuesta del ion cuantificador en la curva de calibración obtenida con el estándar de c-di-GMP (anexo 3).

2.4 Extracción de RNA y PCR de transcripción reversa

At. caldus fue crecido a 45°C en MSM usando separadamente tetrionato y azufre elemental como fuentes energéticas. Las células se colectaron por centrifugación a 8000 x g por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con agua ácida, pH 1,5. Fracciones de 10 mg (peso húmedo) de células fueron resuspendidas en 300 µL de solución de lisis (acetato de sodio 0,02 M pH 5,5; SDS, 0,5 %; EDTA, 1 mM). La obtención del total del RNA fue realizada mediante la técnica de fenol ácido caliente (Guiliani y cols., 1997, Ruiz y cols., 2012). A cada una de las resuspensiones se le agregaron 600 µl de fenol saturado ácido precalentado a 65 °C y esta mezcla se incubó durante 7 min a 65°C con agitación por inversión cada 45 segundos. Luego de centrifugar por 4 min a 13000 x g, la fase acuosa se re-extrajo nuevamente con el mismo volumen de fenol ácido por 7 min a 65°C. Después, se realizó una extracción con 600 µL de fenol ácido/cloroformo a temperatura ambiente y dos extracciones con 600 µL de cloroformo, centrifugando durante 4 min a 13000 x g entre cada uno de los pasos anteriormente descritos. El RNA se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 3 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C durante toda la noche. Luego de la precipitación, el RNA se recuperó por centrifugación a 13000 x g durante 30 min a 4 °C, se lavó 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en 100 µL de agua libre de nucleasas. Para eliminar los restos de DNA presentes en la preparación, 89 µL de RNA se trataron con 10 U (1µL) de DNAsa I (ROCHE) por 20 min a 37°C, en un volumen final de 100 µL en presencia de 6 mM MgCl₂. La inactivación de la enzima se realizó mediante la incubación a 75°C con EDTA a una concentración final de 8 mM. El RNA se extrajo una vez con 400 µL de fenol/cloroformo ácido y dos veces con 400 µL de cloroformo. Luego se precipitó con acetato de sodio 3 M pH 5,2 de la forma anteriormente descrita. Después de dos lavados con etanol al 70%, éste se resuspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas. La integridad del RNA se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. Para determinar la concentración del RNA se midió la absorbancia a 260 nm de una dilución 1/500 y se utilizó la relación $1 \text{ ABS}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$. La pureza de éste se estimó por la razón de las absorbancias a 260/280 nm. Un µg de RNA fue hibridado

con hexámeros al azar (0,5 µg) y la síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante la transcriptasa inversa IMPROM II (promega ®) incubando 1 h a 42°C. El cDNA obtenido fue usado como templado para amplificar cada ORF mediante un PCR convencional utilizando partidores específicos (tabla 5).

2.5 Clonamiento molecular de genes de *At. caldus* candidatos a codificar DGCs

El DNA genómico de *At. caldus* fue purificado desde las células mediante el “kit Wizard Genomic DNA purification” de Promega ®. Los genes de interés fueron amplificados mediante PCR con partidores que contienen sitios de restricción y una caja Shine Dalgarno (Tabla 6) para propósitos de clonamiento y expresión, respectivamente. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis y los amplicones fueron purificados desde geles de agarosa 1% usando el “kit Wizard DNA clean Up system” de Promega. Los amplicones purificados fueron clonados en el vector pGEM-T easy (Promega). Cepas de *E. coli* JM109 electrocompetentes fueron transformadas con las distintas construcciones. Los plasmidios fueron digeridos con enzimas de restricción apropiadas y los fragmentos de interés fueron clonados en el vector pBAD24 para la expresión en *S. typhimurium* o en pTOPO 2.1 para la expresión en *E. coli* AM70 (tabla 7). Las construcciones fueron comprobadas por secuenciación (Macrogen, Korea).

2.6 Evaluación del morfotipo asociado con la síntesis de c-di-GMP en enterobacterias

Las cepas de *E. coli* y *S. typhimurium* (tabla 8) fueron crecidas toda la noche en medio LB con los antibióticos ampicilina (100 µg/ml) y/o cloranfenicol (20 µg/ml) y/o kanamicina (30 µg/ml). La densidad óptica absorbancia de cada cultivo fue determinada a una longitud de onda de 600 nanómetros y ajustada a 3,0 unidades de absorbancia mediante la adición de medio LB estéril.

Tabla 5. Partidores utilizados en los experimentos de PCR de transcripción reversa.

Gen	Partidor	Secuencia 5'→3'	Longitud (pb)	Tm (°C)
ACA_1621	C95_orf2_F	GTTTGTCGTAGGAGACACATTT	216	60,2
	C95_orf2_R	ATCGACGATGCGTTTCA		60,6
ACA_1622	C95_orf4_F1	TGTTGGGCATGGAAGTAATTG	239	60,0
	C95_orf4_R1	TGGAGGAACTCCTGCACA		59,9
ACA_2353	C65_orf4 F	TCAACTTCAGCACGGGT	218	60,3
	C65_orf4 R	AGATGCGTTCCAGTTCAC		60,5
ACA_1319	C34_orf25 F	GTCGTGCTTGCCGTAGA	226	60,0
	C34_orf25 R	AAGACCTTGTGTGCGATCA		59,8
ACA_0268	C78_orf2 F	TATCCCTTTCAGGCAGGT	219	59,3
	C78_orf2 R	CCAGGCTCTTGAGGATT		59,5
ACA_0272	C78_orf8 F	CAGTTGGAGTACGAATCGC	200	60,1
	C78_orf8 R	CACCACCTTGAGCACCA		59,2
ACA_0279	C78_orf17 F	CGATATCAGCGCCGAAA	226	59,3
	C78_orf17 R	CCCGCAACACATGGTCA		59,7
ACA_0280	C78_orf19 F	GCCTGATCTTTGTGGAGTT	222	60,3
	C78_orf19 R	CCGTTGAGACTGAAATCGTGTA		60,1
ACA_0320	C78_orf80 F	GAAGTCTGGCAGGGCTA	218	59,8
	C78_orf80 R	GCCCACACTCAGGGGATA		60,7
ACA_1266	C74_orf5 F	TGGAGGAGTACTGGTCGAAA	213	59,5
	C74_orf5 R	GAGGATGTTCTGGATGCG		60,0
ACA_1270	C74_orf11 F	CTCGGTGTGGAAGGAAT	202	59,2
	C74_orf11 R	GCTTTGAAGTGATCGAGGTC		60,2
ACA_0095	C67_orf2 F	TAGAACAGGATGGCCGC	224	60,1
	C67_orf2 R	GCTCATCCGTGTAGAAACT		60,0
ACA_0096	C67_orf4 F1	GGATGTTGGCCTGGAGA	243	61,1
	C67_orf4 R1	CGGAGGAACTCCTGCAC		61,1

Tabla 5. Continuación

Gen	Partidor	Secuencia 5'→3'	Longitud (pb)	Tm (°C)
ACA_1872	C127_orf7 F	CACCGCCAAGATGATTT	207	59,8
	C127_orf7 R	CACCATCGGCTCTCGATA		59,3
ACA_1873	C127_orf9 F1	CGAGGCCGTCTGGATA	210	60,1
	C127_orf9 R1	CGTAGGATTGATGGTCAGC		60,2
ACA_1412	C79_orf49 F	CCACGAACTGGAGGAAGAA	199	60,3
	C79_orf49 R	GATCGTGTCCATAACGATCA		59,7
ACA_1413	C79_orf50 F	TGTCGTCTACCCGATGC	204	60,4
	C79_orf50 R	CGATCATGGCGACAAAG		60,3
ACA_1419	C79_orf58 F	TCTGCCAGTACACGAA	205	60,1
	C70_orf58 R	CAGATCCAGGATGCAGAGAA		60,0
ACA_2590	C122_orf32 F	ATTCTTGCCCGCTTCAT	205	60,4
	C122_orf32 R	TCGTCCAGATCCAGCATCA		60,1
ACA_1563	C118_orf61 F1	GACGCCGTGAATCTGTT	203	59,6
	C118_orf61 R2	GGCCATATCGACGATGC		60,3
ACA_2498	C83_orf70 F1	GAAGGCACCGAATCGAAAG	215	60,1
	C83_orf70 R1	GCAGTCCCAGGATTTCAA		59,8
ACA_2866	C6_orf4 F1	GGCTCTATCCCTTGCAGAGAA	205	60,3
	C6_orf4 R1	CTCAAGGATCTGGTTGGTCA		60,2
ACA_1660	C61_orf25 F1	TGGAAGATCTCAGCATCCT	207	60,3
	C61_orf25 R1	TCGGTGCCAGTCGATAAA		60,1
ACA_0801	C120_orf10 F1	GATCTCGCGCTCTATGC	210	59,4
	C120_orf10 R1	GATGGTCGAGACGGAGT		60,2
ACA_0994	C57_orf152 F	CAGTTTGCCGGAACCTT	199	60,7
	C57_orf152 R	CCCAGCTCGTCATTGAT		59,7
ACA_1348	C56_orf31 F	GAGCCCTCACCCTCATC	219	60,0
	C56_orf31 R	CCTTCGGCAGCAAGTAG		60,2
ACA_0987	pelD_F	ACCTGCAAGTGGAGCGCATT	200	59,7
	pelD_R	AGCGGGATAGCAGTTCCTGA		57,3

Tabla 6. Partidores utilizados en el clonamiento de genes que codifican para proteínas con dominio GGDEF

Gen	Partidor	Secuencia 5'→3'
ACA_1872	127_7_F	ACCTCTAGATAAGGAGGGCAAAGGATGACCGAAGCTCAG
	127_7_R	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGAACATGATCTCGGATCGCT
ACA_1413	79_50_F	ACCTCTAGATAAGGAGGTTGGAACATGGTCCGAACCAA
	79_50_R	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGGCCCATGGAATAGCTGACT
ACA_1419	79_58_F	ACCTCTAGATAAGGAGGTCTCGACATGCGCTCCGATTCC
	79_58_R	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGGCAAATGCTCATAACACCAA
ACA_1270	74_11_F	ACCTCTAGATAAGGAGGCGCGCTGATGAACCTTGCCGGA
	74_11_R	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGGGGGTAAGTGGGCAAGAAC
ACA_0279	78_17_F	ACCTCTAGATAAGGAGGGCCTGCGATGCGCAAATCCGAT
	78_17_R	ACCGTCGACCAATGATGATGATGATGATGATGATGCGAGGGTAATCCTTGGGAA
ACA_2590	122_32_F	ACCGTCGACTAAGGAGGTGGGCGCATGGCCAACTGTCTG
	122_32_R	ACCAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGATGATGGCCATGGATGTCTAGATCT

Las regiones nucleotídicas subrayadas corresponden a los sitios de restricción incorporados en los partidores.

Tabla 7. Plasmidios de expresión utilizados en ensayos de complementación en enterobacterias

Plasmidios	Construcción/características	Referencias
pBAD24	Amp ^r . Inducible por Arabinosa	(Guzman y cols., 1995)
pBAD24_AdrA	pBAD24:: <i>adrA</i>	Este estudio
pBAD24_1872	pBAD24:: <i>ACA_1872</i>	Este estudio
pBAD24_1413	pBAD24:: <i>ACA_1413</i>	Este estudio
pBAD24_1419	pBAD24:: <i>ACA_1419</i>	Este estudio
pTOPO	Amp ^r , Kan ^r . Inducible por IPTG	Invitrogen
pTOPOAdrA _{wt}	pTOPO:: <i>adrA</i>	(Antoniani y cols., 2010)
pTOPOYdaM	pTOPO:: <i>ydaM</i>	(Antoniani y cols., 2010)
pTOPOWspR	pTOPO:: <i>wspR</i>	(Antoniani y cols., 2010)
pTOPO_1872	pTOPO:: <i>ACA_1872</i>	Este estudio
pTOPO_1413	pTOPO:: <i>ACA_1413</i>	Este estudio
pTOPO_1419	pTOPO:: <i>ACA_1419</i>	Este estudio
pTOPO_1270	pTOPO:: <i>ACA_1270</i>	Este estudio
pTOPO_0279	pTOPO:: <i>ACA_0279</i>	Este estudio
pTOPO_2590	pTOPO:: <i>ACA_2590</i>	Este estudio

Tabla 8. Cepas utilizadas en ensayos fenotípicos en placas con Rojo Congo

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Salmonella Typhimurium</i>		
UMR1	ATCC 14028-1 s NaI ^f	(Romling y cols., 1998)
MAE282	UMR1 <i>STM1703::Cm^f</i>	(Kader y cols., 2006)
AdrA1f	UMR1 <i>adrA101::MudJ</i>	(Romling y cols., 2000)
AdrA1f_p24	AdrA1f, transformada con pBAD24	Este estudio
AdrA1f_AdrA	AdrA1f, transformada con pBAD24_AdrA	Este estudio
AdrA1f_1872	AdrA1f, transformada con pBAD24_1872	Este estudio
AdrA1f_1413	AdrA1f, transformada con pBAD24_1413	Este estudio
AdrA1f_1419	AdrA1f, transformada con pBAD24_1419	Este estudio
<i>Escherichia coli</i>		
MG1655	F ⁻ , λ ⁻ , rph-1 ^a	(Antoniani y cols., 2010)
AM70	MG1655 Δ <i>csgA::cat^a</i>	(Antoniani y cols., 2010)
AM70_pTOPO	AM70, transformada con pTOPO	Este estudio
AM70_AdrA _{wt}	AM70, transformada con pTOPO:: <i>adrA</i>	(Antoniani y cols., 2010)
AM70_YdaM	AM70, transformada con pTOPO:: <i>ydaM</i>	(Antoniani y cols., 2010)
AM70_WspR	AM70, transformada con pTOPO:: <i>wspR</i>	(Antoniani y cols., 2010)
AM70_1872	AM70, transformada con pTOPO:: <i>ACA_1872</i>	Este estudio
AM70_1413	AM70, transformada con pTOPO:: <i>ACA_1413</i>	Este estudio
AM70_1419	AM70, transformada con pTOPO:: <i>ACA_1419</i>	Este estudio
AM70_1270	AM70, transformada con pTOPO:: <i>ACA_1270</i>	Este estudio
AM70_0279	AM70, transformada con pTOPO:: <i>ACA_0279</i>	Este estudio
AM70_2590	AM70, transformada con pTOPO:: <i>ACA_2590</i>	Este estudio

Una gota de 5 μ L de cada cultivo fue depositada sobre placas con medio LB semisólido sin cloruro de sodio, suplementado con Rojo Congo (40 μ g/ml), azul de coomasie G-250 (10 μ g/ml) y los antibióticos correspondientes. Para inducir la expresión de los genes río abajo de los promotores P_{BAD} (pBAD24) o lac (pTOPO 2.1) las placas también contenían L(+)-arabinosa (0,2%) o IPTG (1 mM). El morfotipo rojo de *E. coli* fue evaluado después de incubar las placas 48 h a 30°C. El morfotipo rojo, seco y rugoso (rdar) de *S. typhimurium* fue evaluado después de incubar las placas 48 h a 28°C. La producción de celulosa fue evaluada cualitativamente mediante la unión de calcofluor a las distintas cepas de *S. typhimurium* crecidas sobre placas con medio LB semisólido sin cloruro de sodio suplementado con calcofluor (Fluorescent brightener 28; Sigma-Aldrich ®) (200 μ g/ml).

2.7 Construcción de mutantes nulos en *At. caldus*

2.7.1 Construcción del plasmidio suicida

El plasmidio suicida fue construido como descrito en van Zyl y cols. (2008). Un fragmento de 2,2 kb que contiene el gen *aca_1413* y aproximadamente 800 pb río arriba y río debajo de éste, fue amplificado por PCR utilizando partidores específicos con sitios de restricción para la endonucleasa *XbaI*. Este fragmento fue clonado en el vector pGEM-T easy. Posteriormente, fue escindido mediante digestiones sucesivas con *SphI* y *XbaI*, y clonado en el vector pOT, obtenido desde el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Stellenbosch, resultando el constructo pOT-ACA1413 (figura 3). Este constructo fue digerido con las enzimas *StuI* y *BstXI*, escindiendo la secuencia nucleotídica codificante para casi todo el dominio GGDEF de ACA_1413, obteniéndose el vector pOT-ACA1413(GGDEF⁻). Por otro lado, un fragmento de 1,45 kb que lleva el cassette de resistencia a kanamicina del Tn5 fue obtenido mediante la digestión del plasmidio pSKM2 con las enzimas *HindIII* y *SmaI*. Los extremos cohesivos originados por las enzimas *HindIII* y *BstXI* fueron rellenados usando la DNA polimerasa T4 (Fermentas ®) y entonces, el cassette de kanamicina fue ligado al vector pOT-ACA1413(GGDEF⁻), obteniéndose el plasmidio suicida pOT-ACA1413(GGDEF⁻::Km).

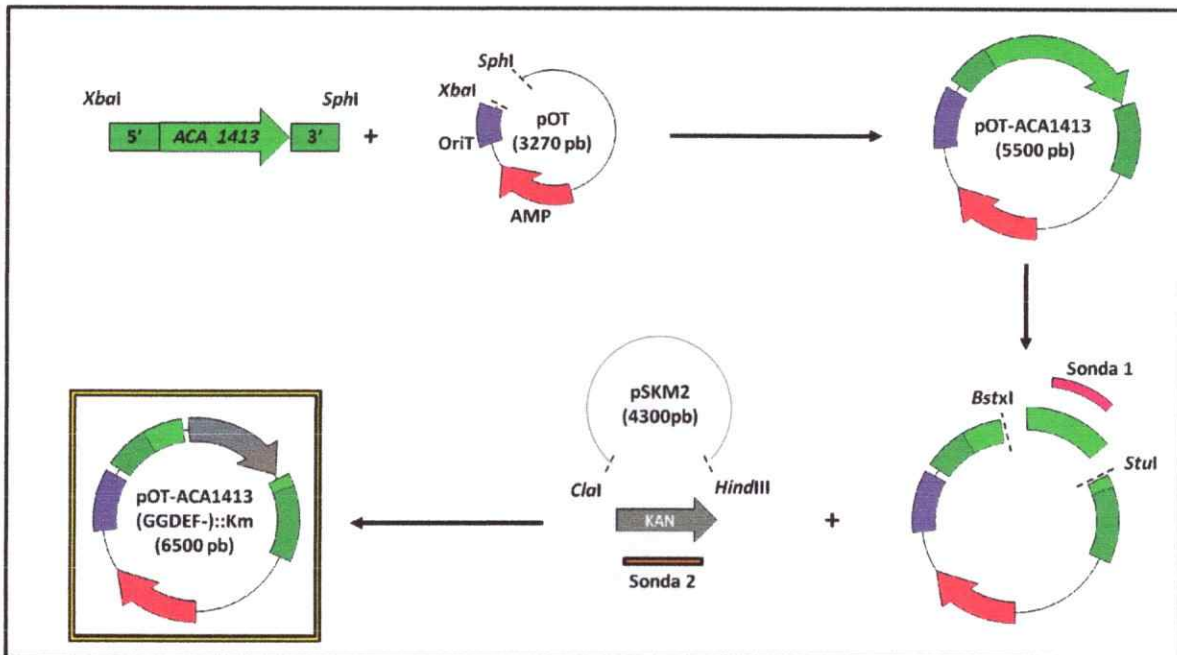


Figura 3. Construcción del plasmidio suicida pOT-ACA1413::Kan. El esquema representa los pasos esenciales de la construcción del plasmidio suicida. Un fragmento de aproximadamente 2500 pb que contiene al gen *aca_1413* fue clonado en el vector pOT utilizando las enzimas *XbaI* y *SphI*, obteniéndose como resultado el plasmidio pOTACA1413. Utilizando *BstXI* y *StuI* se escindió un fragmento interno del gen *aca_1413* (a partir del cual se sintetizó la sonda 1). Este último fragmento fue reemplazado por un casete de resistencia a kanamicina obtenido desde el plasmidio pSKM2 (desde el cual se sintetizó la sonda 2) obteniéndose el plasmidio suicida pOT-ACA1413::Kan.

2.7.2 Conjugación

Células de *E. coli* HB101 fueron transformadas con los plasmidios pR388 y pOT-ACA1413(GGDEF-)::Km. Los clones fueron seleccionados con kanamicina y trimetoprim, y luego confirmados mediante extracción de los plasmidios y su posterior digestión con enzimas de restricción. Los clones positivos fueron pre-adaptados en 50 ml de medio MSM suplementado con 0,05% (P/V) de extracto de levadura y los antibióticos correspondientes a 37°C por una noche. *At. caldus* ATCC 51756 fue cultivado en medio con tiosulfato a 37°C por 5 días. Entonces, 50 ml (5×10^{10} células) de la cepa de *E. coli* HB101 que lleva el plasmidio suicida y 500 ml (3×10^{10} células) de *At. caldus*, fueron colectados por centrifugación a 6000 x g por 10 min a temperatura ambiente y lavados dos veces con MSM estéril. Ambas cepas fueron resuspendidas separadamente en 250 µL de MSM y mezclados 1:1 v/v. Se sembraron 100 µl de la mezcla sobre filtros de nailon de 0,2 µm (PALL Gelman Laboratory), los cuales fueron depositados sobre medio sólido con tiosulfato (pH 4,5) y 0,05% de extracto de levadura. Después de 5 días de incubación a 37°C, las células fueron retiradas, lavadas e inoculadas en 500 ml de medio fresco sin extracto de levadura con kanamicina (200 µg/ml). Los cultivos fueron incubados a 37°C durante una semana. Los transconjugantes de *At. caldus* fueron seleccionados por su resistencia a kanamicina, mientras que *E. coli* fue eliminada por la ausencia de fuente de carbono. Posteriormente, los cultivos fueron diluidos de forma apropiada, sembrados en medio sólido con tiosulfato y kanamicina (150 µg/ml), e incubados a 37°C hasta la aparición de colonias.

2.7.3 Discriminación entre los mutantes de recombinación simple y doble

La discriminación entre los mutantes de recombinación simple y doble se realizó mediante "colony blot" y "Southern blot" (Sambrook., 1989). Las colonias de *At. caldus* resistentes a kanamicina fueron replicadas en forma de parche sobre medio sólido selectivo e incubados a 37°C por 6 días. Los parches de células fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, las que luego fueron sucesivamente lavadas con una solución denaturante (NaCl 87,7 g/l, NaOH 20,0 g/l) durante 10 min, dos veces con



una solución neutralizante (NaCl 87,7 g/l, Tris 60,5 g/l, EDTA 3,7 g/l, pH 7,2) por 5 y 10 min, respectivamente, y con SSPE (NaCl 43,8 g/l, NaH_2PO_4 6,9 g/l, EDTA 7,4 g/l, pH 7,4) por 5 min. Posteriormente, las membranas fueron secadas sobre papel absorbente a temperatura ambiente durante una h. El DNA se fijó a la membrana exponiéndolas 5 min bajo luz U.V. Los restos celulares fueron removidos manualmente y las membranas lavadas dos veces con SSC 0,1% SDS (NaCl 26,3 g/l, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ 13,2 g/l, SDS 0,1% p/v) por 10 min a 65°C. Las membranas fueron pre-hibridadas en una solución de "DIG Easy Hyb Granules" (ROCHE ®) toda la noche a 42°C. Se construyeron dos sondas mediante el kit de marcaje "Dig" de ROCHE ®. La sonda 1 corresponde al fragmento interno del gen *aca_1413* escindido en la construcción del plasmidio suicida (520 pb), mientras que la sonda 2 corresponde al cassette de resistencia a kanamicina (figura 2). Para determinar el intercambio de material genético, las membranas se hibridaron con 20-60 ng de la sonda 2 en 5 ml de una solución de "DIG Easy Hyb Granules" toda la noche a 42°C. A continuación, las membranas se lavaron dos veces con 100 ml de SSC 0,1% SDS por 10 min, y dos veces con 0,1X SSC 0,1% SDS por 10 min a 65°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con 50 ml de amortiguador de lavado (ácido maleico 11,6 g/l, NaCl 8,7 g/l, Tween 5% p/v, pH 7,5) por 10 min a temperatura ambiente, continuando con una incubación en 50 ml de amortiguador de equilibrio (ácido maleico 11,6 g/l, NaCl 8,7 g/l, leche en polvo 5% p/v, pH 7,5) por 30 min. Las membranas fueron sometidas a una detección inmunológica incubándolas en una dilución (1:20.000) del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (ROCHE) en amortiguador de equilibrio. Las membranas fueron lavadas dos veces con amortiguador de lavado por 15 min y una vez en amortiguador de detección (Tris-HCl 12,1 g/l, NaCl 5,8 g/l, pH 9,5) por 5 min. Finalmente, las membranas se incubaron con 1 ml de *CDP-Star* (ROCHE ®) dentro de una bolsa plástica hermética durante 10 min. Luego de eliminar el exceso de líquido, las membranas se inmovilizaron sobre películas de rayos-X en un cassette de exposición por 1 h. Después, las membranas fueron lavadas y reensayadas contra la sonda 1 siguiendo los pasos descritos anteriormente. Los parches que dieron una señal clara con ambas sondas se consideraron mutantes de recombinación simple, mientras que los parches que mostraron señal sólo con la sonda 2 se

consideraron como mutantes de recombinación doble. La comprobación de la mutación se realizó mediante "Southern blot" utilizando la sonda 2. Tres µg de DNA de las cepas silvestre y mutante de *A. caldus* fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción *EcoRI* o *NheI*. Los productos de estas digestiones se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa, el que luego fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado. Posteriormente, el gel fue enjuagado en HCl 0,25 M durante 30 min, seguido de dos lavados con solución de denaturación por 20 min, y dos veces en solución de neutralización por 20 min. El DNA fue transferido a una membrana de nitrocelulosa, cuyo tratamiento y revelado se realizó como se describió anteriormente.

2.8 Ensayos fenotípicos en *At. caldus*

2.8.1 Adherencia

Aproximadamente 1×10^7 /ml células de las cepas de *At. caldus* ATCC51756 y Δ 1413 fueron crecidas en 100 ml de MSM usando cupones de azufre elemental como fuente energética (González y cols., 2012). Los cupones se obtuvieron por fusión de azufre elemental (Sigma-Aldrich) y su posterior solidificación sobre un portaobjeto. Cupones de aproximadamente 1 cm² fueron seleccionados y esterilizados en MSM hirviendo. Los cultivos fueron crecidos durante 96 o 120 h a 45°C con una agitación de 100 rpm. La adherencia celular al sustrato fue evaluada indirectamente mediante el conteo de las células planctónicas y de forma cualitativa mediante la visualización de los cupones utilizando distintos tipos de microscopía. Los cupones fueron rescatados a distintos tiempos, lavados suavemente dos veces con agua ácida (pH 1,5) y fijados en formaldehído 4% durante toda la noche. Posteriormente, los cupones fueron lavados con agua destilada y teñidos durante 15 min con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (0,01 µg/ml) (Sigma-Aldrich ®) y con la lectina concanavalina A marcada con isotiocianato fluoresceína (FITC) (Sigma-Aldrich ®) (100 mg/ml) (Mangold y cols., 2008, Porter y Feig, 1980). Los cupones fueron enjuagados con agua destilada, secados a temperatura ambiente, y visualizados en un microscopio invertido de epifluorescencia (Departamento de Biología de la

Universidad de Chile) con un aumento total de 400X. Las muestras se excitaron con luz de longitud de onda de 365 nm para DAPI (emisión de luz azul a 390 nm) y de 490 nm para FITC-ConA (emisión de luz verde a 520 nm). Cada experimento se realizó 3 veces. Adicionalmente, para una de las replicas de cada experimento, se preparó otra serie de cupones para su visualización mediante microscopía electrónica de barrido (Facultad de física, Universidad Católica de Chile).

2.8.2 Motilidad

Para los ensayos de motilidad, cultivos de las cepas de *At. caldus* ATCC51756 y Δ 1413 fueron crecidas en MSM con tetrionato (2 mg/ml) como fuente de energía. La concentración celular de los cultivos fue determinada por conteo en una cámara de Neubauer. Diez ml de cada cultivo en fase exponencial fueron centrifugados 5 min a 5.000 x g. Las células fueron rescatadas y resuspendidas suavemente en MSM fresco a una concentración de 1×10^8 células/ml. Cinco μ l de cada resuspensión fueron depositados sobre medio semisólido con tetrionato. Se diseñaron tres medios diferentes: 1, medio MSM pH 2,5, Phytigel 0,2% (P/V); 2, MSM pH 4,7, Phytigel 0,2% (P/V); 3, MSM pH 4,7, Phytigel 0,08% (P/V). La motilidad fue evaluada de forma cualitativa midiendo el diámetro de desplazamiento después de incubar cuatro días a 45°C.

3. RESULTADOS

3.1 Identificación y caracterización *in silico* de los componentes genéticos candidatos para una vía de señalización mediante c-di-GMP en *At. caldus*

Para indagar acerca de una posible vía de transducción de señales mediante c-di-GMP en *At. caldus*, inicialmente se analizó la secuencia genómica de la cepa ATCC 51756 de este microorganismo, en búsqueda de marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifiquen proteínas con dominios GGDEF, EAL y/o HD-GYP. La estrategia para indagar la presencia de PDEs con dominio HD-GYP consistió en la búsqueda de ORFs que codifiquen proteínas con dominios con similitud a la superfamilia HD. Este análisis arrojó la presencia de dos ORFs que codificarían proteínas con dominio HD, ACA_1367 y ACA_2582, anotados en “National Center for Biotechnology Information” como una deoxyguanosina-trifosfato trifosfohidrolasa y ppGpp sintetasa, respectivamente. Sin embargo, un análisis manual posterior, determinó la ausencia del motivo HHExxDGxxGYP, característico del dominio HD-GYP (Galperin y cols., 1999, Seshasayee y cols., 2010), por lo que las proteínas codificadas por estos ORFs no fueron considerados como posibles participantes de una vía de c-di-GMP en *At. caldus*. Por otro lado, se identificaron dieciocho ORFs que codifican para proteínas con dominios GGDEF y/o EAL. Como primera etapa, para indagar acerca de la funcionalidad de las DGCs y PDEs candidatas, se realizaron comparaciones de estructuras primarias contra dominios GGDEF y EAL conocidos en la literatura por poseer actividad DGC y PDE, respectivamente.

3.1.1 Diguanylatociclasas candidatas

Hasta ahora, las DGCs mejor caracterizadas son PleD de *C. crescentus* y dos homólogos de WspR de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Análisis de funcionalidad basados en técnicas de mutación sitio-dirigida y estudios estructurales de estas enzimas determinaron aminoácidos importantes del sitio activo (sitio A) y de dos sitios de inhibición alostérica: el primario (Ip) y el secundario (Is) (Chan y

cols., 2004, De y cols., 2008, Malone y cols., 2007, Wassmann y cols., 2007) (Anexo 4 y figura 4A). En PleD, los grupos fosfatos del sustrato análogo GTP α S muestran una interacción directa con los aminoácidos K442 y R446 y con uno de los iones Mg²⁺, el cual es coordinado por los aminoácidos E370 (del motivo GGDEF) y D327. La base nitrogenada es coordinada por los aminoácidos Asn 335 y Asp 344, mientras que Lys 332 estaría involucrada en la salida de pirofosfato. El sitio de inhibición primario (Ip) está formado por los aminoácidos Arg 359, Asp 362 y Arg 390, los que interactúan directamente con las bases del c-di-GMP. El sitio de inhibición secundario (Is), formado por los aminoácidos Arg 313 y Arg 316, interactúa con Ip a través de dímeros de c-di-GMP cambiando la conformación del sitio activo e inhibiendo la actividad DGC (figura 2, página 13).

En el genoma de *At. caldus*, se identificaron 15 dominios GGDEF (figura 4), cada uno de los cuales se encuentra en 15 proteínas distintas: ACA_0994, ACA_0272, ACA_1412, ACA_0279, ACA_1270, ACA_1872, ACA_1419, ACA_2590, ACA_1413, ACA_2866, ACA_1660, ACA_0096, ACA_2498, ACA_1622 y ACA_0801. Exceptuando el dominio GGDEF de ACA_2498, cuyo e-value es cercano a 10⁻⁸, todos los dominios GGDEF poseen e-values menores que 10⁻²⁵. La comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas que contienen estos dominios con la base de datos de dominios conservados CDD reveló que todas ellas además comprenden otros dominios, o bien poseen un número de aminoácidos suficiente para presentar otro(s) dominio(s) (>100 aa). Seis de las proteínas que contienen el dominio GGDEF son híbridas (ACA_2866, ACA_1660, ACA_0096, ACA_2498, ACA_1622, ACA_0801), es decir, que además poseen un dominio EAL. El resultado del análisis comparativo sugiere que, de las otras nueve, siete serían funcionales como DGCs (ACA_0994, ACA_0272, ACA_0279, ACA_1270, ACA_1872, ACA_2590, ACA_1413) mientras que dos no lo serían (ACA_1412 y ACA_1419) (figura 4 A, tabla 9). La proteína ACA_1412 posee 10 de los 11 aminoácidos clave para la síntesis de c-di-GMP, donde el residuo Phe372 del motivo GGDEF está sustituido por una leucina (GGDEL). Una sustitución similar en la proteína WspR inhibe totalmente su actividad DGC, lo que sugiere que ACA_1412 debiese ser inactiva como DGC (Malone y cols., 2007).

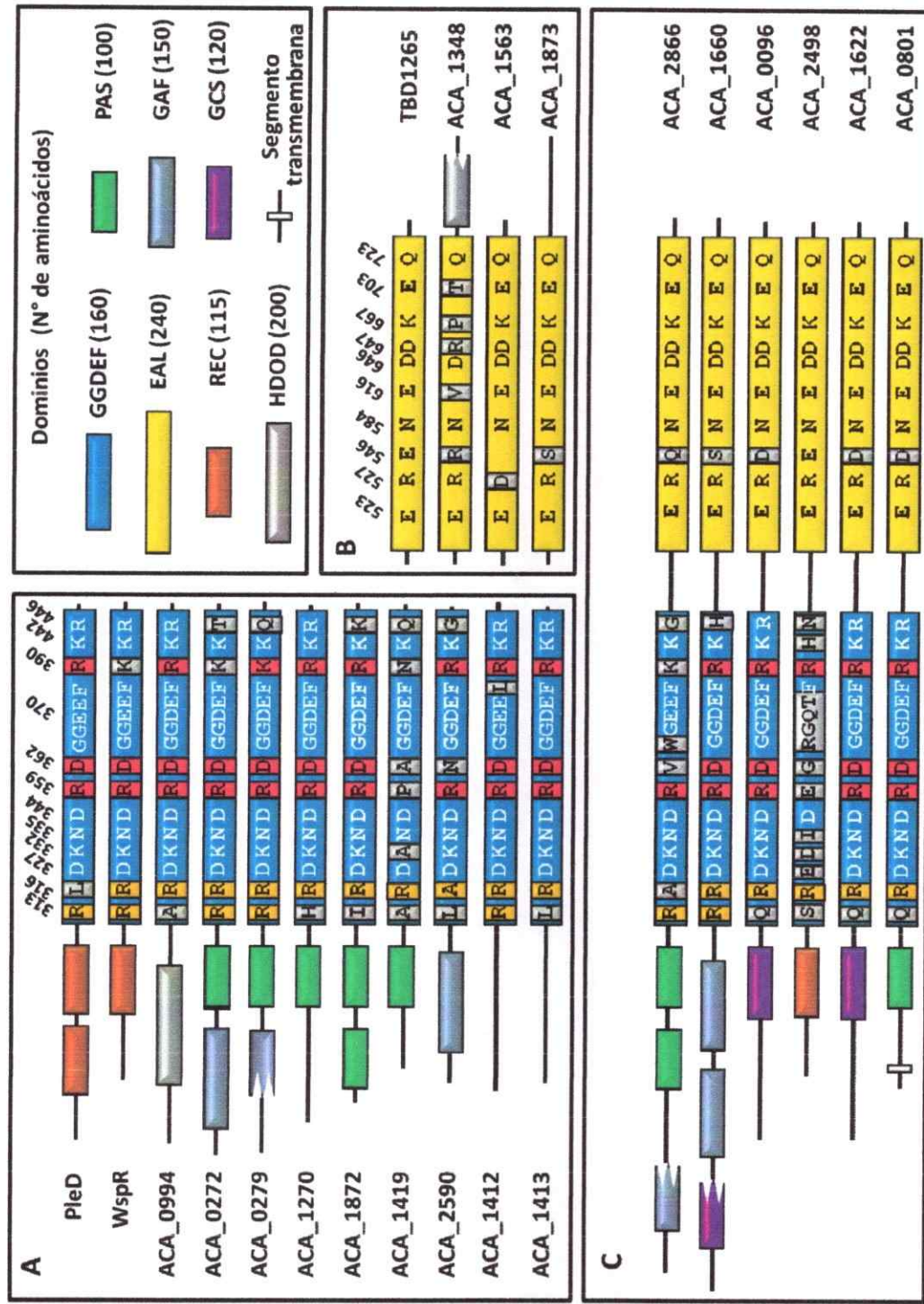


Figura 4. Representación esquemática de la arquitectura de los dominios y de los aminoácidos clave de las DGCS y PDEs candidatas de *At. caldus*. Se presentan todas las proteínas con dominios GGDEF (A), EAL (B) y GGDEF-EAL (C). Hacia el extremo N-terminal se muestran dominios sensores especificados en el cuadro superior derecho de la figura. Los dominios GGDEF y EAL se han ampliado para mostrar los aminoácidos clave en su funcionalidad. Los dominios GGDEF son comparados con el dominio GGDEF de PleD (*C. crescentus*) y Wspr (*P. aeruginosa*). Los aminoácidos que forman el sitio Ip del dominio GGDEF se muestra en rojo, mientras los que forman el sitio Is se muestra en naranja. Aminoácidos no conservados se muestran en gris. Los dominios EAL se comparan con el dominio EAL de TBP1265 (*T. denitrificans*).

Por otro lado, la proteína ACA_1419 si bien posee el motivo GGDEF intacto, carece de residuos involucrados en la unión de sustrato (Arg 446) y catálisis (Lys 332), lo que sugiere la incapacidad de esta proteína para sintetizar c-di-GMP. En relación con los siete dominios predichos como DGCs activas, tres de estos (ACA_0994, ACA_1270 y ACA_1413) poseen la totalidad de los aminoácidos clave para la actividad DGC, mientras que las cuatro restantes (ACA_0272, ACA_0279, ACA_1872 y ACA_2590) carecen de R446. ACA_1872 posee una sustitución funcional por lisina en esta posición. Por otra parte, ACA_0272, ACA_0279, y ACA_2590 poseen lisinas o argininas en la posición contigua 447 que podrían suplir la ausencia de Arg 446 (anexo 5).

En relación a las proteínas híbridas (figura 4 C; tabla 9), cuatro de los seis dominios GGDEF (ACA_1660, ACA_0096, ACA_1622, ACA_0801) poseen la totalidad de los aminoácidos clave y por ende podrían ser funcionales como DGCs. El dominio GGDEF de ACA_2498 carece de la mayoría de los aminoácidos del sitio activo, por lo que probablemente no es activo como DGC. En la proteína ACA_2866, la primera glicina (G368) del motivo GGDEF es reemplazada por triptófano (WGDEF). En la DGC WspR de *P. fluorescens* la sustitución de esta glicina por aminoácidos aromáticos ha sido suficiente para la inactivación de la enzima, lo que sugiere que el dominio GGDEF de ACA_2866 es inactivo como DGC.

En conclusión, este análisis bioinformático permite definir que once de los quince dominios GGDEF podrían ser funcionales como DGC (tabla 9).

Tabla 9. Número de aminoácidos involucrados en la funcionalidad de las DGCs presentes en los dominios GGDEF de *At. caldus*.

Proteína	Sitio A (11 aa)	Ip (3 aa)	Is (1 o 2 aa)	Predicción
ACA_0094	11	3	1	A
ACA_0272	10	3	2	A
ACA_1412	10	3	2	NA ^b
ACA_0279 ^a	10	3	2	A
ACA_1270 ^a	11	3	1	A
ACA_1872 ^a	10	3	1	A
ACA_1419 ^a	9	0	1	NA ^c
ACA_2590 ^a	10	2	1	A
ACA_1413 ^a	11	3	1	A
ACA_2866	10	1	1	NA ^c
ACA_1660	10	3	2	A
ACA_0096	10	3	1	A
ACA_2498	2	1	1	NA ^c
ACA_1622	11	3	1	A
ACA_0801	11	3	1	A

^a Proteínas cuya actividad DGC fue ensayada en enterobacterias (sección 4).

^b No se descarta que pueda ser un dominio efector. ^c Se descarta que pueda ser un dominio efector. Las proteínas resaltadas con fondo gris representan proteínas con dominios GGDEF y EAL. NA, No activo. A, activo.

3.1.2 Fosfodiesterasas candidatas

Análisis bioquímicos y genéticos han identificado 10 aminoácidos esenciales (E523, R527, E546, N584, E616, D646, D647, K667, E703 y Q723) para la hidrólisis del c-di-GMP en el dominio EAL de la PDE TBD1265 de *T. denitrificans* (Tchigvintsev y cols., 2010) (anexo 6, figura 4B). La mayoría de los aminoácidos esenciales (E523, N584, E616, D646, D647, K667 y E703) para la actividad PDE del dominio EAL forman una red electrostática con dos iones Mg^{2+} y una molécula de agua, la cual se ha postulado como base catalítica del mecanismo. Los iones metálicos interactúan directamente con uno de los fosfatos del c-di-GMP, mientras que el otro fosfato lo hace con R527. El residuo Q723 interactúa con E523, E616 y K667 estabilizando la conformación del dominio. La función del residuo E546 no es muy clara, sin embargo su cadena lateral ha sido propuesta para la interacción con una de las guaninas del c-di-GMP.

Además de los seis ORFs que codifican proteínas híbridas, en el genoma de *At. caldus* se detectaron tres ORFs que codificarían proteínas con dominio EAL (ACA_1873, ACA_1563 y ACA_1348). Al contrario de ACA_1348, la cual posee un dominio HD trunco, ACA_1563 y ACA_1873 no poseen aminoácidos suficientes para contener otro dominio acompañante. De estas tres proteínas, sólo una puede ser propuesta como PDE funcional, ACA_1873 (figura 4 B, tabla 10). Esta proteína carece de uno de los aminoácidos importantes para la actividad (E546), sin embargo, un residuo polarmente negativo como serina podría suplir su interacción con una de las bases nitrogenadas del c-di-GMP (anexo 7). ACA_1563 carece de 2 de los diez residuos importantes: E546 y R527. El dominio EAL de esta proteína carece de 18 aminoácidos entre las posiciones 538 y 556 de la proteína TBD1265, por lo que no existe ningún aminoácido que pueda cumplir la función de E546. Se ha demostrado que el reemplazo de R527 por alanina disminuye considerablemente la actividad PDE, sin inhibirla por completo (Tchigvintsev y cols., 2010). En el caso de ACA_1563, el reemplazo de R527 por aspartato, cuya cadena lateral tiene carga negativa, no parece ser el más idóneo para una actividad PDE funcional. Por otra parte, ACA_1348 carece de 5 aminoácidos importantes para la actividad PDE.

Tabla 10. Número de aminoácidos involucrados en la funcionalidad de las PDEs, presentes en los dominios EAL de *At. caldus*

Proteína	Sitio activo (10 aa)	Predicción
ACA_1348	5	NA
ACA_1563	8	IND
ACA_1873	9	A
ACA_2866	9	A
ACA_1660	9	A
ACA_0096	9	A
ACA_2498	10	A
ACA_1622	9	A
ACA_0801	9	A

Las proteínas resaltadas con fondo gris representan proteínas híbridas. NA, No activo. A, activo. IND, indeterminado.

La sustitución individual de cada uno de estos aminoácidos por alanina ha mostrado la inhibición completa de la actividad PDE (Tchigvintsev y cols., 2010), por lo que la ausencia simultánea de estos cinco aminoácidos probablemente resulte en una proteína sin esta actividad. En el caso de las seis proteínas con ambos dominios (EAL y GGDEF), el análisis comparativo reveló que todas debieran ser funcionales (figura 4, tabla 10). El dominio EAL de ACA_2498 conserva los 10 aminoácidos importantes para la actividad PDE y, además, está asociado a un dominio GGDEF predicho inactivo. Tres (ACA_0096, ACA_1622 y ACA_0801) poseen una sustitución en E546/D546 que no debería afectar su funcionalidad. El dominio EAL de ACA_1660 posee la sustitución un residuo de serina en la posición 546, cuyo grupo hidroxilo pudiese suplir el rol del residuo conservado de ácido glutámico. Finalmente, ACA_2866 muestra la ausencia de E546 sin embargo, el alineamiento de estos dominios (anexo 7) muestra un residuo de aspartato contiguo a la posición 546 que podría posicionarse de manera de cumplir con la función.

En conclusión, los análisis comparativos permitieron definir que siete de los nueve dominios EAL serían funcionales como PDEs (tabla 10).

3.2.3 Posibles efectores en la vía del c-di-GMP en *At. caldus*

Los análisis anteriormente descritos permitieron identificar posibles DGCs y PDEs funcionales en *At. caldus*, indicando que este microorganismo cuenta con los elementos necesarios para la síntesis y la degradación del c-di-GMP. Como paso siguiente, se analizó la secuencia genómica de *At. caldus* ATCC51756 en búsqueda de ORFs que codifiquen posibles efectores de esta vía. Recientemente, proteínas con dominio GGDEF han sido descritas como efectoras de la vía del c-di-GMP. Estos dominios son inactivos como DGCs ya que no poseen los aminoácidos importantes del sitio activo, pero si presentan un sitio primario de inhibición alostérica intacto (RxxD) que puede unir c-di-GMP. Ejemplos de proteínas efectoras con un dominio GGDEF degenerado incluyen a PopA de *C. crescentus* (Duerig y cols., 2009), CdgG de *V. cholerae* (Beyhan y cols., 2008) y PelD de

P. aeruginosa (Lee y cols., 2007). Del análisis *in silico* de funcionalidad de DGCs codificadas en el genoma de *At. caldus* se desprende que de las proteínas con dominio GGDEF inactivo como DGC, sólo ACA_1412 conserva los aminoácidos de los sitios Ip e Is, sugiriendo que esta proteína podría actuar como efector de la vía del c-di-GMP.

A pesar de que el dominio GGDEF degenerado del efector PelD de *P. aeruginosa* posee cierta similitud estructural con el dominio GGDEF (Franklin y cols., 2011), éste se encuentra poco conservado a nivel de estructura primaria (Lee y cols., 2007). El análisis de búsqueda para los dominios GGDEF de *At. caldus* se basó en la conservación de estructura primaria, por lo que un eventual parálogo de PelD no tendría por qué ser detectado. Usando la secuencia aminoácídica de PelD como entrada para un análisis de BlastP sobre el proteoma de *At. caldus* se identificó un homólogo de esta proteína, ACA_0987, la que comparte un 46% de similitud y 29% de identidad con PelD de *P. aeruginosa*. ACA_0987 conserva los aminoácidos importantes para la unión de c-di-GMP (R567, G568, L569, D570, V751 y R403) y un contexto génico similar al operón *pel* de *P. aeruginosa*, cuyos siete genes codifican para proteínas esenciales para la síntesis del polisacárido PEL (figura 5). Este hallazgo, abre la posibilidad de que en *At. caldus* exista un complejo proteico productor de exopolisacáridos regulado por la unión de c-di-GMP a uno de sus componentes (ACA_0987).

Hasta el momento hay reportados dos efectores que unen c-di-GMP en su dominio EAL: FimX y LapD. Ambas proteínas, además de los dominios GGDEF y EAL, poseen otros dominios hacia su extremo amino-terminal, los que están involucrados en la transducción de la señalización mediante c-di-GMP. Los ORFs que poseen dominios EAL predichos como PDE inactivas (ACA_1348 y ACA_1563) no poseen otros dominios (figura 4 B) ni tampoco la mayoría de los aminoácidos descritos como importantes para la unión de c-di-GMP en FimX y en LapD, por lo que no deberían actuar como estos efectores.

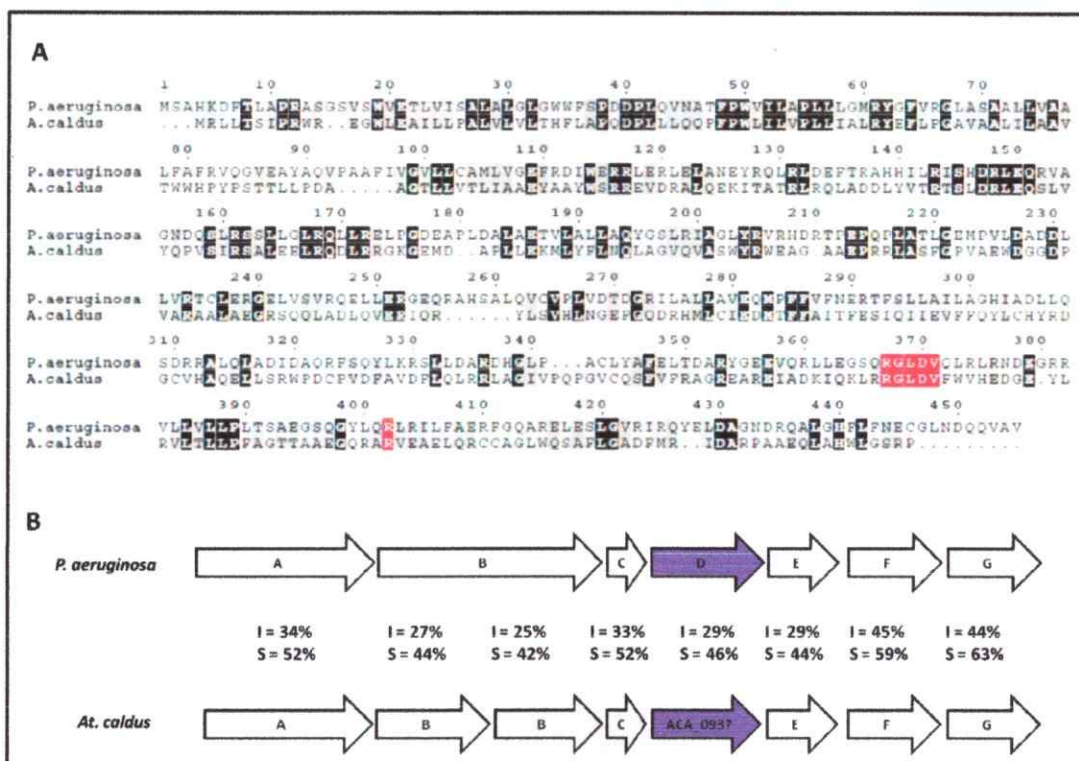


Figura 5. Identificación de la presencia del homólogo de PelD de *At. caldus* ACA_0987. A, Alineamiento entre PelD de *P. aeruginosa* y ACA_0987 revela posibles sitios de unión de c-di-GMP. B, comparación de la organización génica del operon *pel* de *P. aeruginosa* y el putativo operón *pel* de *At. caldus*. Se indica el nivel de identidad y similitud que poseen las proteínas codificadas por cada gen.

Por otro lado, se identificaron ocho genes que codifican proteínas efectoras con dominio PilZ en el genoma de *At. caldus* (tabla 11). El principio de reconocimiento del c-di-GMP por este dominio está basado en “dedos de arginina”, ubicados en el *c-di-GMP switch*, el que a su vez está compuesto por los motivos RxxxR y D/NzSxxG, separados por aproximadamente 20 residuos de aminoácidos (Benach y cols., 2007, Habazettl y cols., 2011, Ko y cols., 2010). En *At. caldus*, 6 de los 8 dominios PilZ poseen los motivos del *c-di-GMP switch* completos. Uno de éstos está presente en la proteína ACA_1319, la que presenta una alta homología a la subunidad A de celulosa sintasa (BcsA) de *G. xylinus* (I=34%, S=52%), *E. coli* (I=34%, S=55%) y *S. Typhimurium* (I=26%, S=57%). (CESA_CelA_like, e⁻⁸²). En comparación con el contexto genómico de los genes *bcsA* de *G. xylinus*, *E. coli* y *S. typhimurium*, *aca_1319* conserva los genes que codifican una endoglucanasa (BcsZ) y la subunidad B de la celulosa sintasa (BcsB), sin embargo, el gene para la subunidad C (BcsC) no está presente en el operón ni tampoco fue encontrada en otra parte del genoma (figura 6). El contexto de ACA_1319 revela además la presencia de una UDP-glucosa pirofosforilasa, encargada de sintetizar UDP-glucosa a partir de Glucosa-1-P y UTP, el que es usado como sustrato para elongar el polímero de celulosa a través de la celulosa sintasa (Ross y cols., 1991). Estos resultados sugieren fuertemente que el c-di-GMP y ACA_1319 podrían regular la síntesis de celulosa en *At. caldus*. En el genoma de *At. caldus* se encontró otra región con homólogos a BcsABZ, sin embargo, la copia de BcsA no posee dominio PilZ. Río abajo de éstos, y en dirección contraria, se ubica el gen *aca_2353* (figura 6), el cual codifica probablemente para una proteína de ensamble del pili tipo 4 (PT4). Otras tres proteínas con dominio PilZ con *c-di-GMP switch* completo, ACA_1621, ACA_0095 y ACA_0280, presentan homología con proteínas de ensamble del PT4, sin embargo, sólo *aca_0280* presenta un contexto relacionado con éste (figura 6). Es interesante notar la presencia de transposasas flanqueando este contexto, lo que podría sugerir que toda esta agrupación de genes fue incorporado al genoma de *At. caldus* en un solo evento. Esto también explicaría la ausencia de *pilE*, el que generalmente se ubica río abajo de PilY en otras bacterias Gram-negativas.

Tabla 11. Efectores candidatos con dominio PilZ codificados en el genoma de *At. caldus*.

Proteína	e-value	<i>c-di-GMP switch</i> RxxxR D/NzSxxG	Mejor(es) hit de Blast (e-value)
ACA_1266	7,64 e ⁻¹⁴	AMDGG/RIRGGG	type IV pilus assembly PilZ, <i>At. ferrivorans</i> (3e ⁻⁵⁴)
ACA_1621	2,77 e ⁻⁰⁶	RKDRR/DFSPSG	type IV pilus assembly PilZ, <i>At. thiooxidans</i> (9e ⁻⁵⁷)
ACA_0095	3,85 e ⁻⁰⁶	RKDKR/DFSPSG	type IV pilus assembly PilZ, <i>At. thiooxidans</i> (3e ⁻⁵⁴)
ACA_0280	6,69 e ⁻⁰⁷	RLSAR/DFSLNG	type IV pilus assembly PilZ, <i>At. thiooxidans</i> (2e ⁻⁵⁶)
ACA_2353	7,52 e ⁻⁰⁶	RFRAR/NFSTGG	type IV pilus assembly PilZ, <i>At. thiooxidans</i> (4e ⁻⁷⁷)
ACA_0268	8,23 e ⁻⁰⁴	RQLYR/DISAGG	Hypotetical protein, <i>At. thiooxidans</i> (2e ⁻⁸⁰) Glicosil transferasa, <i>Thiomonas sp.</i> (2e ⁻²⁹) Type IV pilus assembly PilZ, <i>T. Intermedia K12</i> (5e ⁻²⁸) YcgR, <i>Pseudogulbenkiania sp.</i> (2e ⁻⁰⁶)
ACA_0320*	2,04 e ⁻⁰⁶	RQSLR/DVSAGG	Hypotetical protein, <i>At. thiooxidans</i> (6e ⁻³⁶) Glicosil transferasa, <i>Thiomonas sp.</i> (6e ⁻²²) Type IV pilus assembly PilZ, <i>T. Intermedia K12</i> (1e ⁻²¹) YcgR, <i>Pseudogulbenkiania sp.</i> (5e ⁻⁰⁵)
ACA_1319	6,51 e ⁻⁰⁴	RTAAR/DISWRG	Celulosa sintasa A, <i>At. thiooxidans</i> (0.0)

En rojo se indican los aminoácidos clave en la unión del c-di-GMP al dominio PilZ. * El ORF ACA_0320 fue el único cuya expresión no fue detectada en experimentos de RT-PCR (figura 7, página 63).

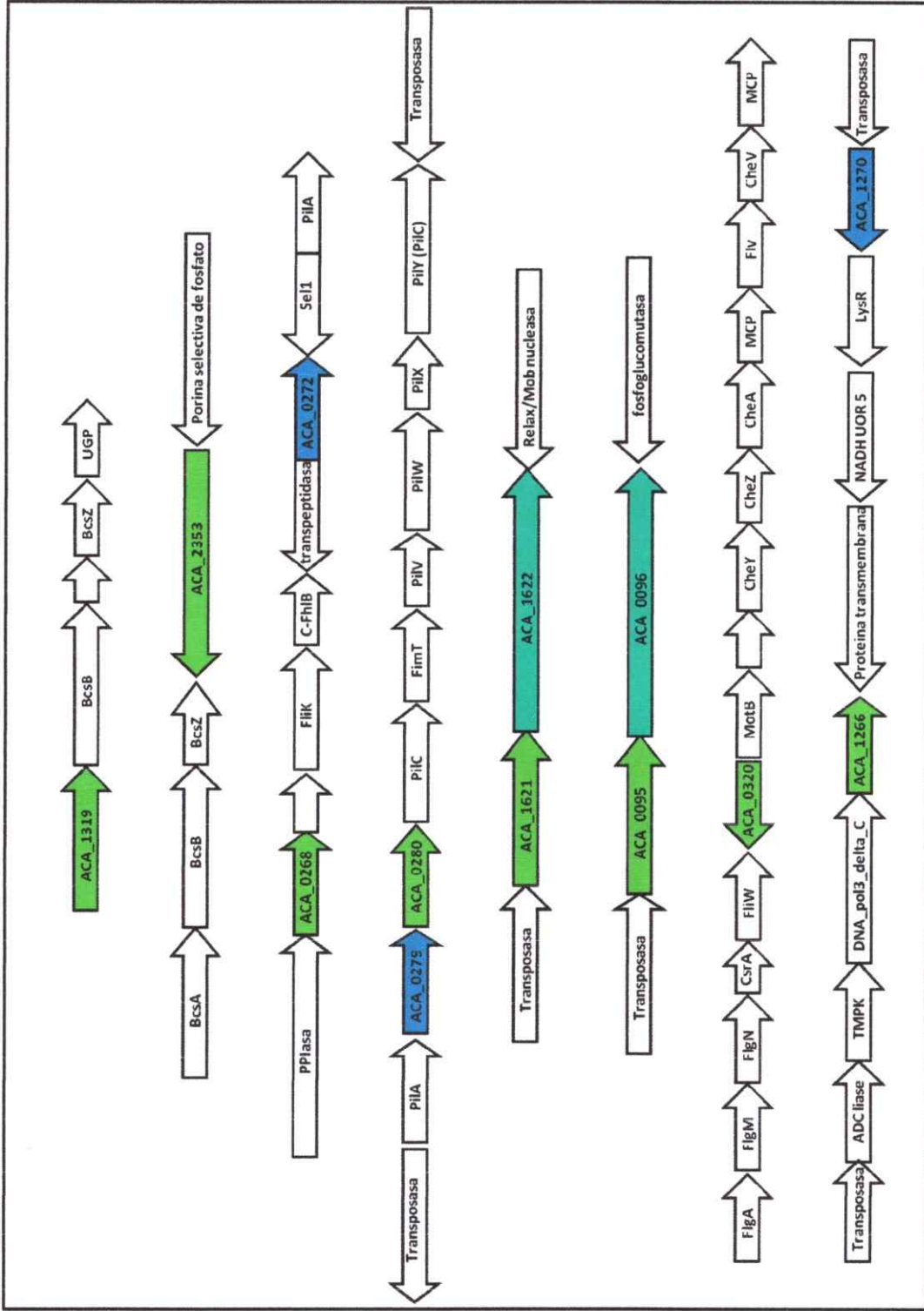


Figura 6. Comparación esquemática del contexto genómico de genes codificantes para proteínas con dominio PilZ (en verde) de *At. caldus*. En algunos de estos contextos se encuentran genes que codifican para proteínas con dominio GGDEF (azul) o GGDEF y EAL (celeste), y proteínas relacionadas con la motilidad y la formación de biopelículas.

Además, esta agrupación de genes incluye a *aca_0279*, el que codifica para una proteína con dominio GGDEF el que ha sido calificado como una DGC funcional según el análisis bioinformático. Los genes *aca_1621* y *aca_0095* se encuentran río arriba de genes (*aca_1622* y *aca_0096*) que codifican para proteínas híbridas calificadas como DGC/PDE funcionales mediante los análisis de comparación aminoacídica.

La sexta proteína con dominio PilZ con motivo *c-di-GMP* switch completo es ACA_0320. Esta proteína hipotética posee cierta similitud con YcgR (22% identidad, 41% similitud) de *E. coli*, la cual une c-di-GMP y frena la rotación del flagelo mediante la interacción con componentes del motor. Al igual que YcgR, ACA_0320 mide aproximadamente 240 aminoácidos, por lo que además del dominio PilZ (100 aa), podría acomodar perfectamente el dominio "YcgR". Sin embargo este dominio no fue detectado en la comparación de ACA_0320 con la base de datos de dominios conservados CDD. En *E. coli*, *ycgR* se encuentra entre los genes *emtA* y *ymgE*, los que codifican para una endotransglicosilasa y una proteína de membrana, respectivamente. Al contrario, ACA_0320 se ubica en dirección contraria a un grupo de genes esenciales para la formación del flagelo (figura 6).

Dos proteínas con dominio PilZ (ACA_0268 y ACA_1622) poseen un *c-di-GMP* switch incompleto. Al igual que ACA_0320, ACA_0268 posee cierta similitud con YcgR (I=22%, S=41%), pero el dominio "YcgR" no fue detectado. *aca_0268* está ubicado río arriba de los genes *fliK* y *flhB*, los que codifican proteínas involucradas en la regulación de la longitud del gancho del aparato flagelar. Por último, *aca_1622* codifica una proteína de ensamble de TP4 cuyo dominio PilZ no posee *c-di-GMP* switch. Dominios PilZ sin *c-di-GMP* switch se han reportado como reguladores de la motilidad tipo twitching, incluyendo PilZ (PA2960) de *P. aeruginosa* y XAC1133 de *X. axonopodis*. Esta última se interactúa con FimX y con PilB regulando la función del PT4.

3.2 Análisis de la expresión de los ORFs involucrados en la vía del c-di-GMP en *At. caldus*.

Para determinar si los ORFs identificados *in silico* son expresados en *At. caldus*, se realizó un estudio transcripcional mediante PCR de transcripción reversa. El RNA fue extraído desde cultivos crecidos en azufre en fase exponencial. Este análisis reveló que a excepción de *aca_0320*, todos los ORFs se expresan en *At. caldus* (figura 7).

3.3 Detección de c-di-GMP en *Acidithiobacillus caldus*

Para determinar la existencia de una actividad DGC funcional en *At. caldus*, se procedió a detectar la presencia intracelular de esta molécula mediante espectrometría de masas. Extractos ricos en nucleótidos obtenidos desde células de *At. caldus* crecidas en azufre fueron inyectados directamente a un espectrómetro de masas tipo electrospray trampa iónica (ESI-IT). El análisis se realizó en modo de polaridad negativa (figura 8), en el cual el ión molecular $[M-H]^-$ de c-di-GMP corresponde a la señal m/z 689 (figura 8 A) (Christen y cols., 2005, Ruiz y cols., 2012, Simm y cols., 2004), mientras que su fragmentación MS/MS produce, entre otras, las señales específicas m/z 344 y m/z 538 (figura 8 B) (Ruiz y cols., 2012). Los espectrogramas de los extractos ricos en nucleótidos mostraron una amplia variedad de señales, incluyendo la del ión m/z 698 (figura 9). La selección y la posterior fragmentación de este ion produjo las señales características m/z 344 y m/z 538, indicando que los extractos obtenidos desde *At. caldus* contienen c-di-GMP, por lo que se concluyó que este microorganismo tiene la capacidad de sintetizar este segundo mensajero.

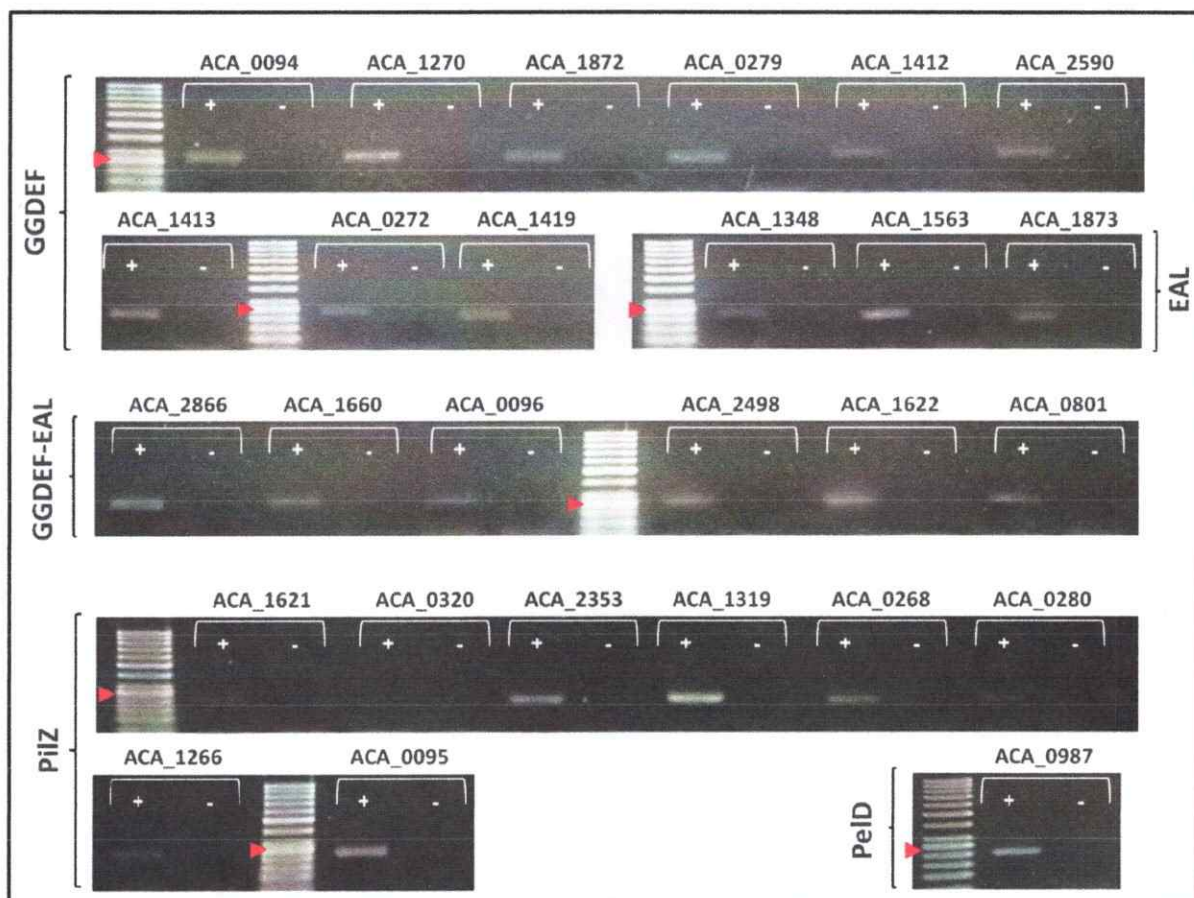


Figura 7. Análisis de la expresión transcripcional de los genes que codifican proteínas involucradas con el c-di-GMP en *At. caldus*. (+) Con transcriptasa reversa; (-) sin transcriptasa reversa. El tamaño esperado para los fragmentos es entre 200 y 250 pb. La banda del estándar de 200 pb se indica con una cabeza de flecha roja.

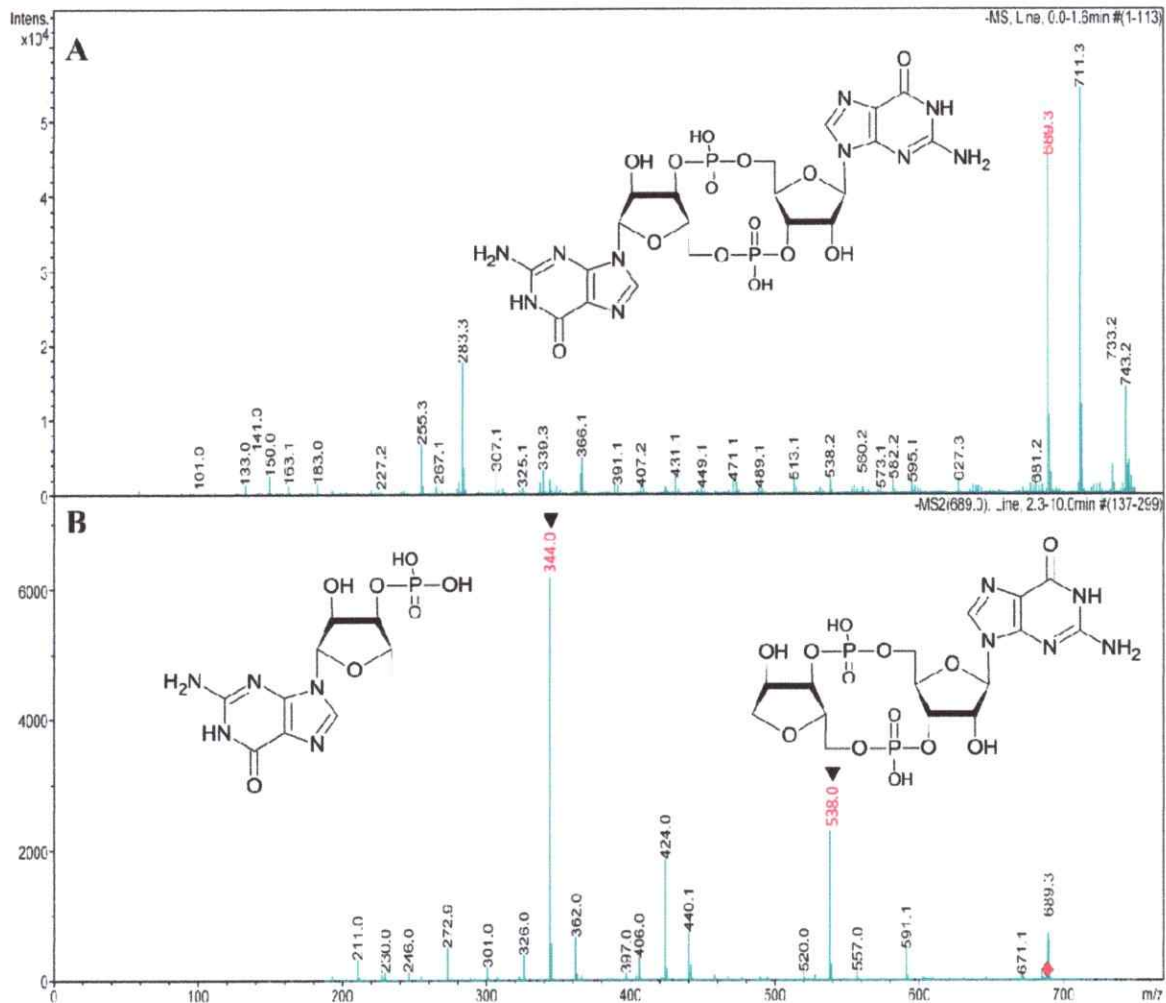


Figura 8. Análisis mediante espectrometría de masas del estándar de c-di-GMP sintetizado químicamente. A. Espectrograma MS. La señal m/z 689 corresponde a la ionización de la molécula de c-di-GMP (690 g/mol) (M-H). B. Espectrograma MS/MS. La fragmentación de la señal m/z 689 produce las señales m/z 344 y m/z 538 indicadas con una flecha negra.

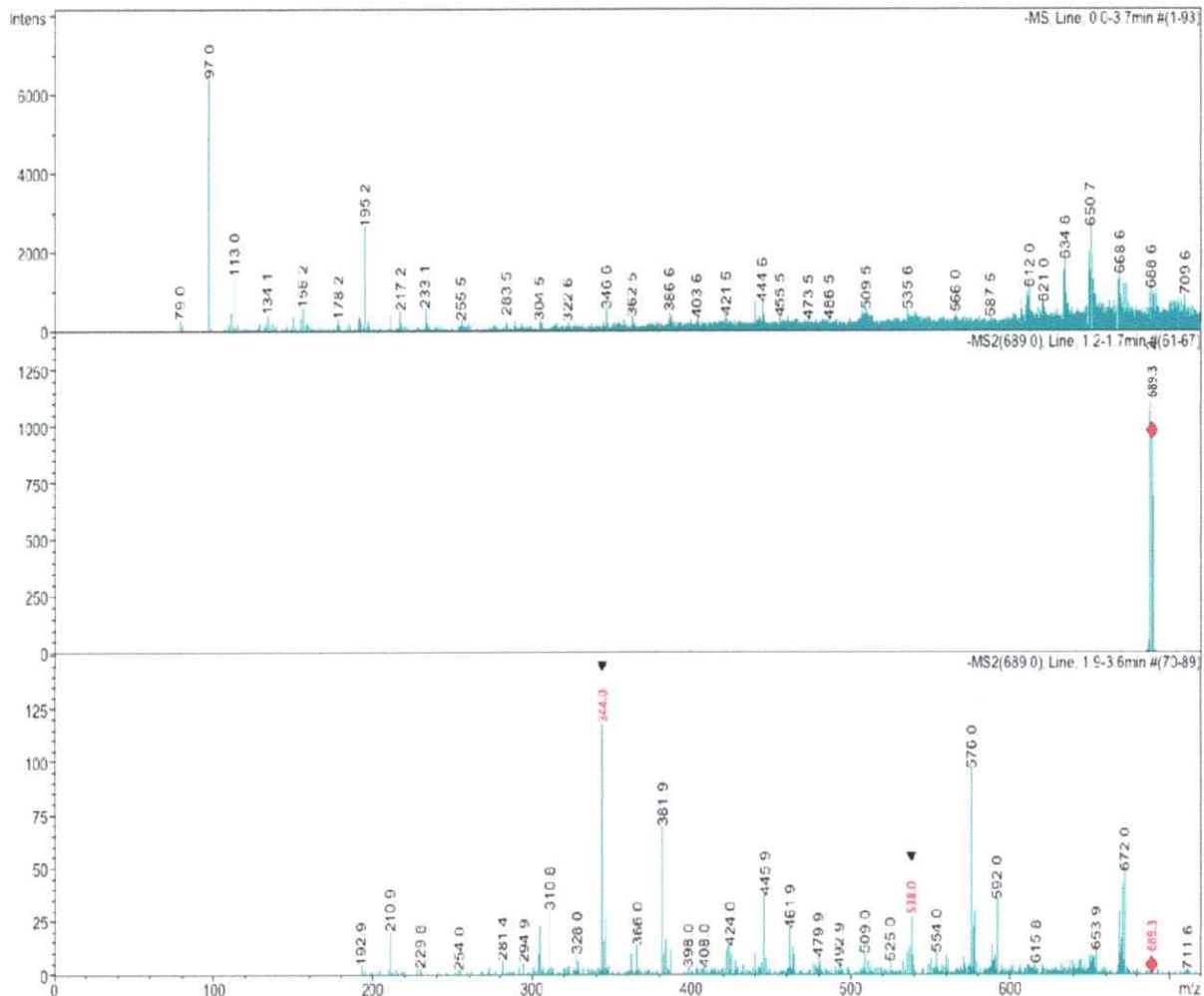


Figura 9. Análisis de la presencia de c-di-GMP en extractos ricos en nucleótidos de *Az. caldus* ATCC 51756. A. Espectrograma MS. B. Espectrograma de aislamiento del ión pseudomolecular. C. Espectrograma MS/MS. Las señales m/z 689 (rombo rojo) produce las señales específicas del c-di-GMP m/z 344 y m/z 538 (flechas negras).

3.4 Funcionalidad de proteínas de *At. caldus* con dominio GGDEF como DGCs.

En la literatura se han reportado que proteínas híbridas con los dos dominios GGDEF y EAL, poseen la capacidad de actuar como DGC o como PDE (Kumar y Chatterji, 2008, Tarutina y cols., 2006). Ambas actividades están reguladas por factores intra y/o extracelulares que pueden favorecer la actividad de un dominio en desmedro del otro. En este contexto y para caracterizar una actividad DGC funcional en *At. caldus*, seis de las nueve proteínas que poseen un dominio GGDEF (sin un dominio EAL) fueron evaluadas a través de ensayos fenotípicos en placas de agar con Rojo Congo (RC) mediante complementación heteróloga. En Enterobacterias, la producción de fimbrias y celulosa depende de la síntesis de c-di-GMP mediada por DGCs específicas. Es así como la DGC YdaM es requerida para la producción de fimbria en *E. coli*, mientras que la DGC AdrA es necesaria para la producción de celulosa en *Salmonella*. Debido a los bajos niveles de producción de celulosa, el fenotipo rojo de las colonias de *E. coli* MG1655 depende mayoritariamente de la producción de fimbria (Antoniani y cols., 2010, Gualdi y cols., 2008). Al contrario, en el mutante AM70 (MG1655 Δ csgA::cat), incapaz de producir fimbria, el color depende de la producción de celulosa. Así, una sobreexpresión de una DGC funcional aumenta los niveles de c-di-GMP, lo que a su vez provoca el aumento de la síntesis de celulosa y permite que las colonias sean rojas (Zogaj y cols., 2001).

El fenotipo rojo mostrado por la cepa AM70 complementada con los genes de *At. caldus* *aca_1413*, *aca_1872*, *aca_0279* y *aca_2590* sugieren que todos ellos codifican para DGCs funcionales (figura 10). De éstas, la cepa que sobreexpresa el gen *aca_1413* muestra la respuesta más intensa, mientras que las sobreexpresiones de *aca_1872*, *aca_0279* o *aca_2590* resultan en un fenotipo menos intenso (figura 10). Comparando con la cepa silvestre (MG1655) y mutante (AM70), las células complementadas con los genes *aca_1270* o *aca_1419* no unen RC, indicando la ausencia de una actividad DGC en estas condiciones experimentales.

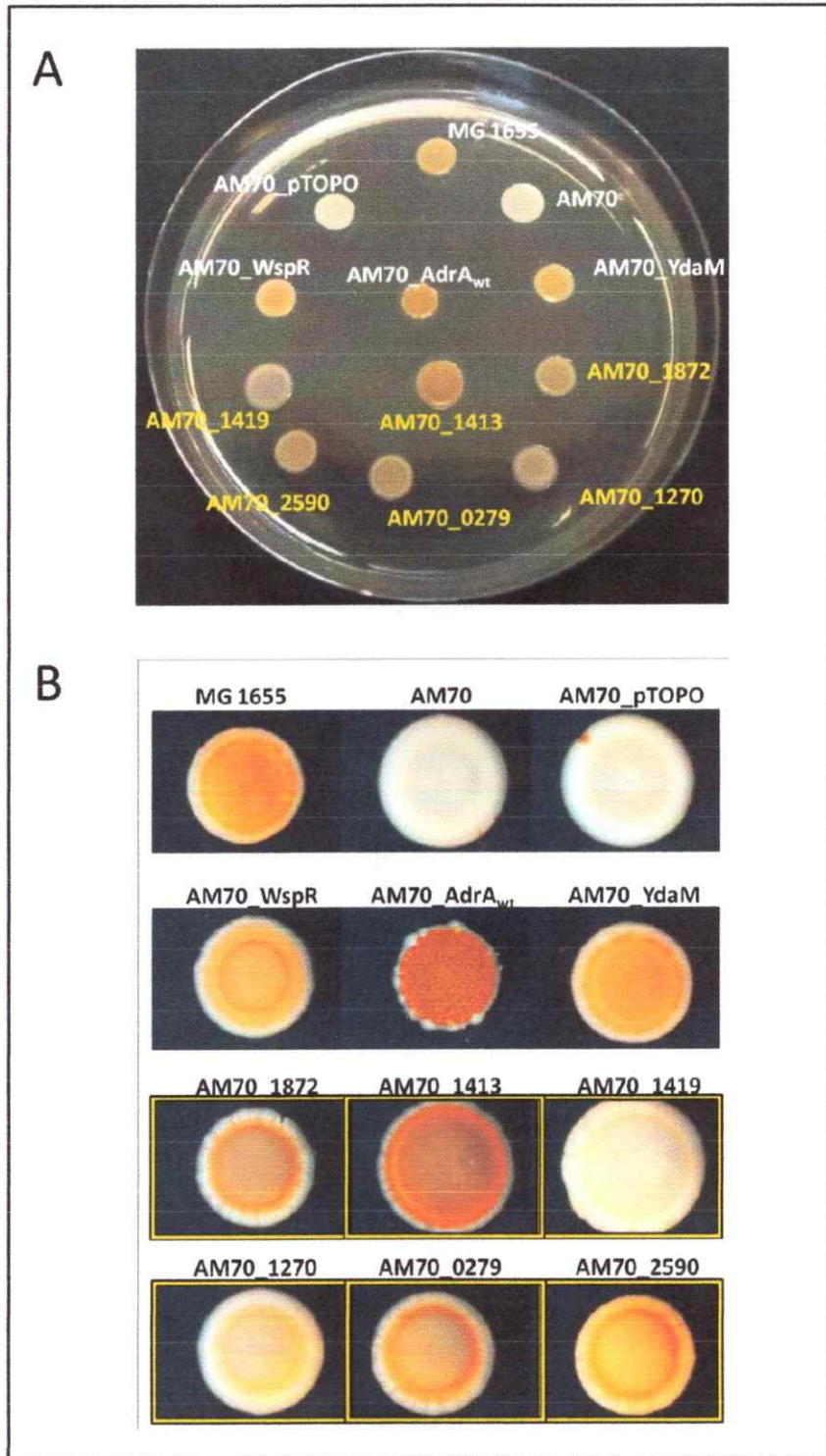


Figura 10. Ensayos de complementación fenotípica en *E. coli* con genes codificando dominios GGDEF de *At. caldus*. El morfotipo de las cepas de *E. coli* silvestre MG1655 y complementadas con DGC es indicativo de la síntesis de EPS activada por c-di-GMP (A). En (B) se muestra una ampliación (10X) de cada resultado lograda con una lupa óptica. MG1655: *E. coli* Silvestre; AM70: MG1655 Δ *csgA::cat*; AM70_pTOPO: Control negativo; YdaM, AdrA, WspR: DGCs, controles positivos; Las cepas transformadas con genes de *At. caldus* se indican dentro de un recuadro amarillo.

Luego, para comprobar que los resultados obtenidos no tenían relación con el uso particular del modelo experimental de complementación en *E. coli*, se optó por comprobar tres de ellos en otro sistema heterólogo. Los genes *aca_1413*, *aca_1872* y *aca_1419* fueron sobreexpresados en la cepa AdrAfl de *S. typhimurium*, la cual es deficiente en la DGC AdrA. En esta bacteria, niveles altos de c-di-GMP provocan el morfotipo rdar (red, dry and rough) (Kader y cols., 2006). Este fenotipo se acentúa en la cepa MAE282 (deficiente en la PDE YciR) (Simm y cols., 2007) y se inhibe en la cepa AdrAfl (Simm y cols., 2004). Las colonias de la cepa AdrA1f de *S. typhimurium* complementada con los genes *ACA_1872* y *ACA_1413* muestran un morfotipo rdar, revelando que ambos codifican para DGCs funcionales (figura 11). Nuevamente, el morfotipo mostrado por las células complementadas con el gen *aca_1419* sugiere que este codifica para una proteína sin actividad DGC. Estos resultados fueron confirmados por ensayos fenotípicos en placas de agar con calcofluor (figura 12), compuesto que posee afinidad por polisacáridos formados por unidades de β -glucopiranososa como la celulosa. Así, la fluorescencia emitida por el calcofluor da cuenta de la síntesis de celulosa, la que a su vez depende de la producción de de c-di-GMP (Zogaj y cols., 2001).

Breve descripción bioinformática de ACA_1413

En busca de elementos que nos permitieran una mejor comprensión de la función de ACA_1413, la secuencia aminoacídica de esta proteína se analizó con diversas herramientas bioinformáticas. ACA_1413 posee 280 aminoácidos organizados en dos regiones. La región C-terminal (aminoácidos 120-280) contiene un dominio GGDEF (figura 4, página 50) con un e-value $4.86e^{-57}$, el que posee todos los aminoácidos involucrados en la síntesis de c-di-GMP (tabla 9, página 52). Los primeros 120 aminoácidos de ACA_1413 no poseen similitud significativa con ningún dominio de la base de datos de dominios conservados "CDD". Dentro de esta región, entre los aminoácidos 60 y 80, se detectó la presencia de un motivo "coiled coil". La participación de estos motivos en la dimerización de DGCs ha sido reportada con anterioridad (Schirmer y Jenal, 2009), por lo que su presencia en ACA_1413 sugiere que ésta podría ser activada mediante este mecanismo.

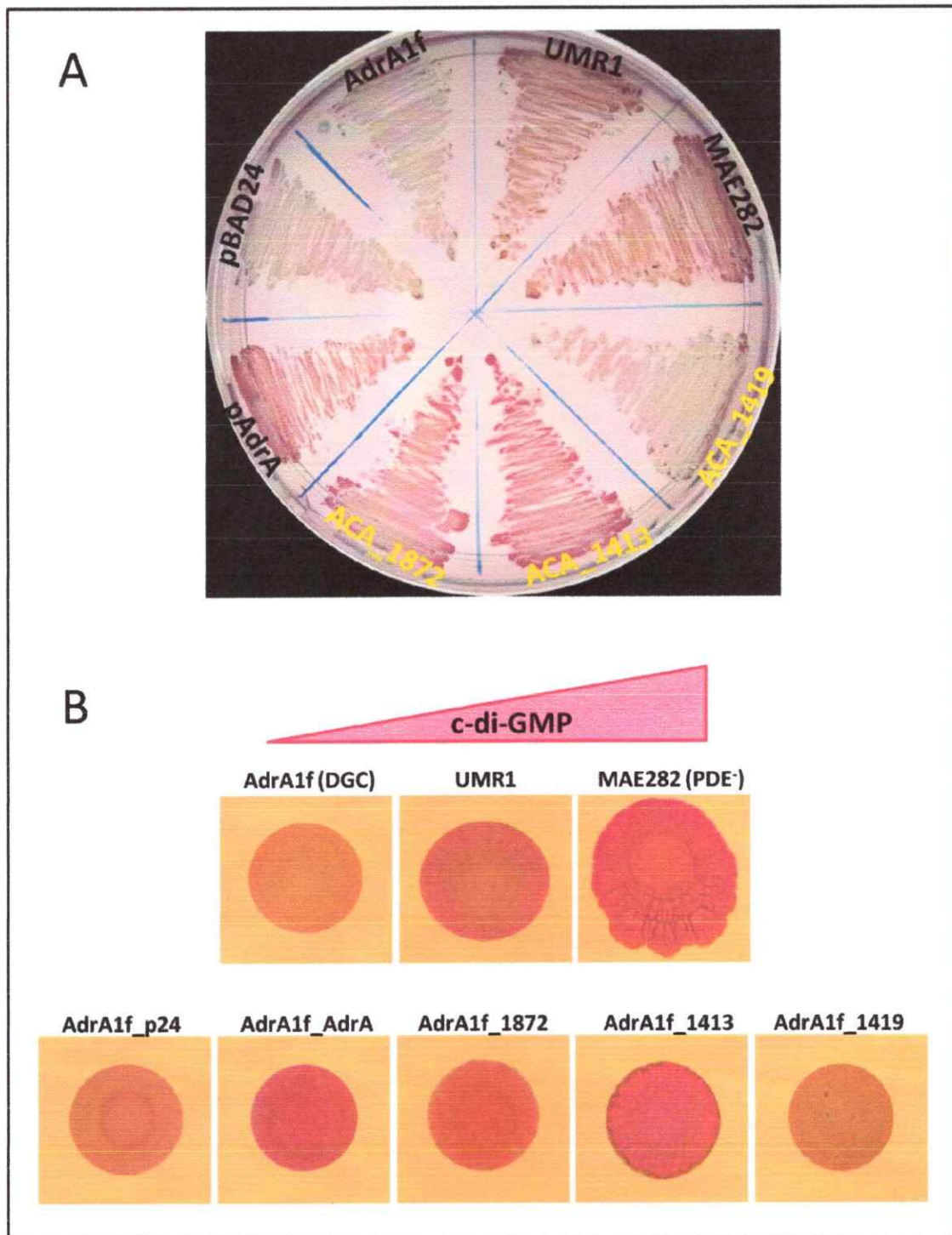


Figura 11. Ensayo de complementación heteróloga en *S. typhimurium* con genes codificando dominios GGDEF de *At. caldus*. El morfotipo rdar de las cepas silvestre (UMR1) y mutante PDE⁻ (MAE 282) es indicativo de la síntesis de EPS activada por c-di-GMP. Las distintas cepas de AdrA1f complementadas con una DGC funcional (AdrA1f_Adra) o genes de *At. caldus* (recuadros amarillos) se muestran crecidas en un rayado (A) y a partir de una gota de cultivo (B). AdrA1f_p24: control negativo.

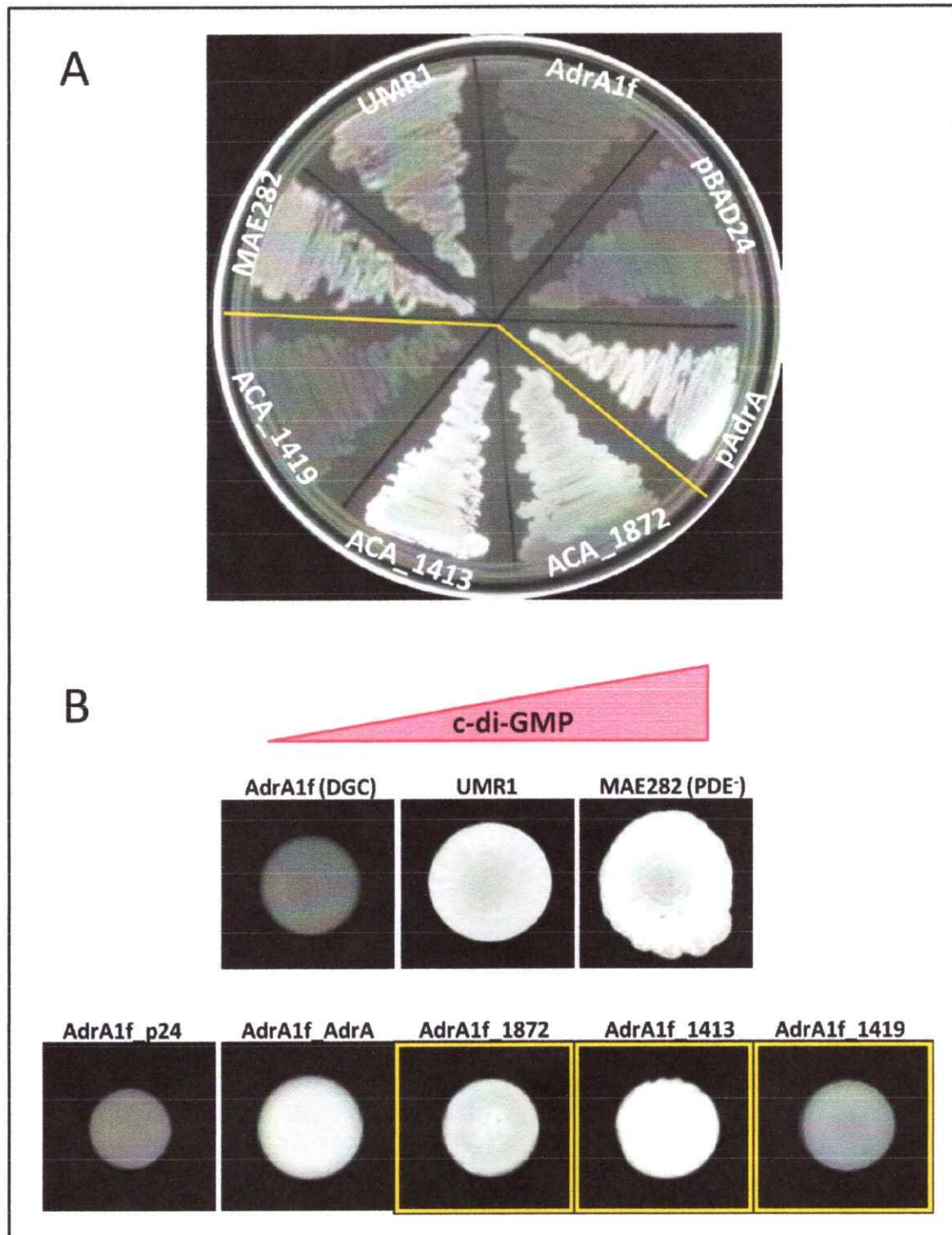


Figura 12. Ensayo de complementación heteróloga en *S. typhimurium* con genes codificando dominios GGDEF de *At. caldus*. La fluorescencia emitida por el calcofluor es indicativo de la síntesis de EPS activada por c-di-GMP. Las distintas cepas de AdrA1f complementadas con una DGC funcional (AdrA1f_AdrA) o genes de *At. caldus* (recuadros amarillos) se muestran crecidas en un rayado (A) y a partir de una gota de cultivo (B). UMR1: cepas silvestre; MAE 282: cepa mutante PDE⁻; AdrA1f_p24: control negativo.

Los análisis de predicción subcelular descartaron la presencia de algún tipo de péptido señal y de segmentos transmembrana, señalando que la ubicación de ACA_1413 debería ser citoplasmática.

El análisis del contexto genómico de *aca_1413* (figura 13) reveló que río bajo y en la misma dirección se encuentra dos genes predichos para codificar una proteína con dominio GGDEF aparentemente inactivo como DGC, ACA_1412 (tabla 9, página 52), y una fosfolipasa D. Río arriba y en dirección contraria de *aca_1413*, se encuentran cuatro genes, los que codifican una proteína hipotética, FliL, MotA, MotB y otra proteína con un dominio GGDEF inactivo, ACA_1419. Flanqueando este locus se encuentran regiones con homología a secuencias de inserción encontradas en *A. ferrooxidans* (Valdes y cols., 2008) y genes que codificarían transposasas, sugiriendo que éste pudo haber sido (o está siendo) transmitido mediante un mecanismo de transposición.

3.5 Síntesis de c-di-GMP en la cepa recombinante *S. typhimurium aca_1413*

La categórica respuesta fenotípica mostrada por las células de *E. coli* y *S. typhimurium* complementadas con el gen *aca_1413* indica su funcionalidad como DGC. Para comprobar que los efectos causados por la expresión de *aca_1413* son provocados por un aumento en los niveles intracelulares de c-di-GMP, se cuantificó la producción de esta molécula mediante HPLC en extractos ricos en nucleótidos obtenidos desde células de *S. typhimurium* AdrA1f complementadas con este gen, y se compararon con los niveles producidos por la expresión de DGC AdrA en el mismo hospedero. El pico correspondiente al c-di-GMP fue identificado por el tiempo de retención de distintas concentraciones de la molécula comercial (Biolog®) (figura 14 A) y por la coelución de ésta con cada extracto nucleotídico (figura 14 B, parte inferior).

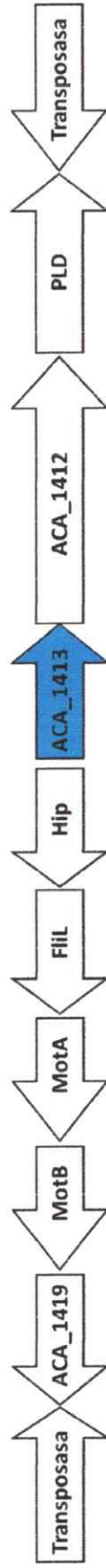


Figura 13. Contexto genómico de *aca_1413*. *aca_1412* y *aca_1419* codifican proteínas con dominios GGDEF inactivos como DGCs. PLD, fosfolipasa D. Hip, Proteína hipotética.

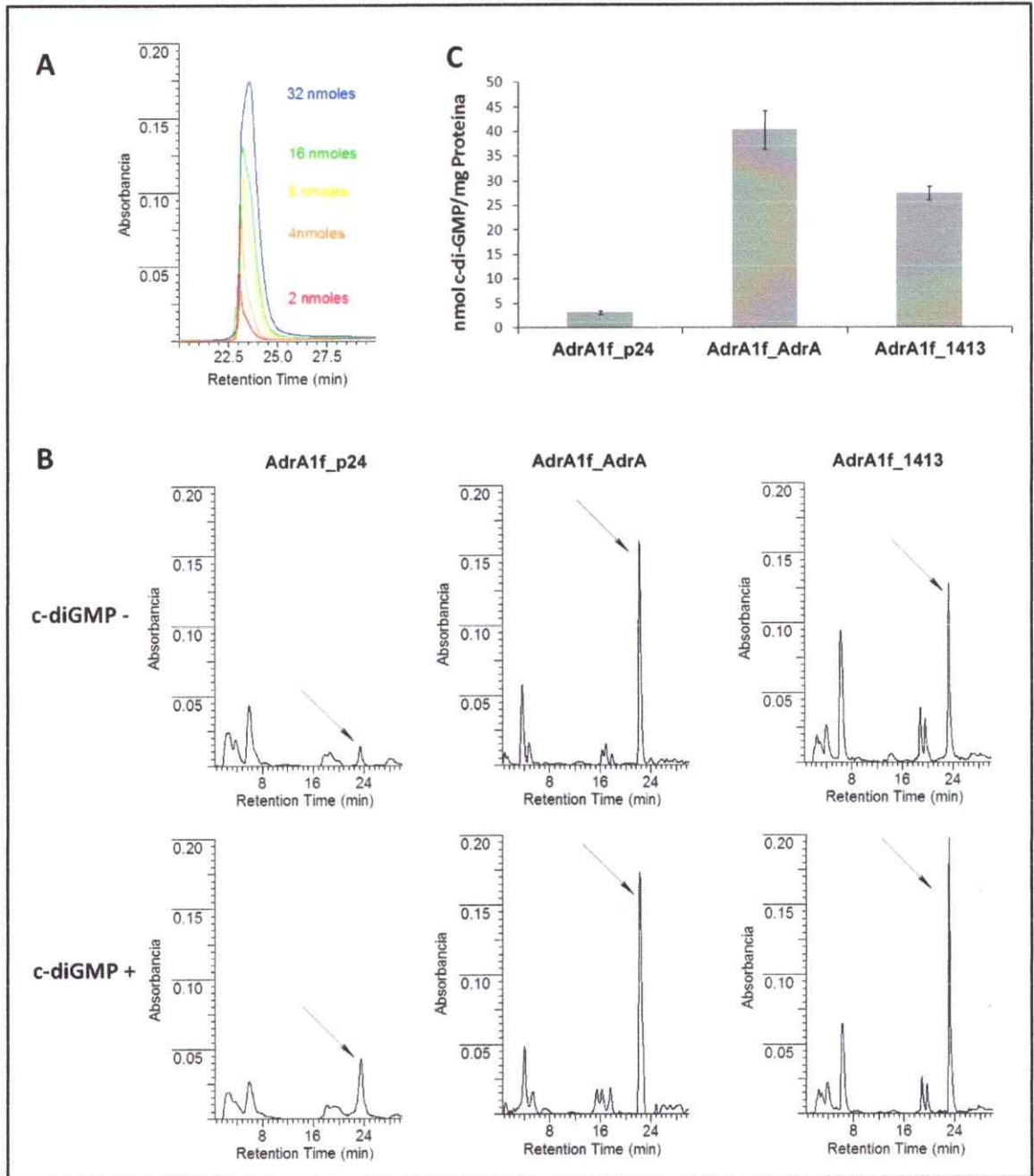


Figura 14. Medición de los niveles de c-di-GMP en cepas recombinante de *S. typhimurium* AdrA1f (DGC) mediante HPLC. Los cromatogramas fueron registrados a una absorbancia de 254 nm. El tiempo de retención del estándar de c-di-GMP bajo las condiciones experimentales ensayadas fue de 24 min aproximadamente (A). Los extractos ricos en nucleótidos de las cepas de *S. typhimurium* AdrA1f transformadas con el plasmidio pBAD24, pBAD24_AdrA o pBAD24_1413 fueron mezclados con 2 nmoles de c-di-GMP (B, panel inferior) o con el equivalente volumen de amortiguador A (ver metodología) (B, panel superior) y separados mediante HPLC de fase reversa. La flecha negra corresponde al pico de c-di-GMP cuantificado. Para cada cepa el ensayo fue repetido tres veces, cuyos resultados (detallados en la tabla 12) se grafican en (C).

La cantidad de c-di-GMP fue calculada interpolando el valor del área bajo cada pico identificado en una curva de calibración (anexo 2), lo que posteriormente fue corregido por la concentración de proteínas de cada extracto. Los resultados obtenidos revelan que la cantidad de c-di-GMP producida por las células que expresan *aca_1413* es cerca de nueve veces mayor que la observada en los extractos de las células transformadas con el plasmidio pBAD24 (figura 14 B; tabla 12), lo que comprueba que ACA_1413 es una DGC funcional y que el fenotipo observado en *S. typhimurium* se debe a la alta concentración de c-di-GMP intracelular.

3.6 Construcción de *At. caldus* Δ 1413

Con el fin de indagar si existe relación entre la señalización mediante c-di-GMP en *At. caldus* con los fenotipos de adherencia y/o motilidad, nos propusimos construir una cepa mutante que carezca de algún gen involucrado en esta vía. Debido al categórico resultado en ensayos de complementación en enterobacterias se seleccionó el gen *aca_1413*, el que codifica para una DGC. La delección fue generada mediante mutación por intercambio de marcador (MEM, del inglés marker exchange mutagenesis), la cual consiste en la recombinación de un plasmidio suicida y el DNA genómico de *At. caldus*, reemplazando un trozo del gen blanco por un cassette de resistencia al antibiótico kanamicina (van Zyl y cols., 2008). El plasmidio suicida fue construido a partir del plasmidio pOT, el que contiene un origen de transferencia (*oriT*), y un fragmento de DNA que contiene el gen *aca_1413* y (figura 3, página 43). Posteriormente, la región que codifica para casi la totalidad del dominio GGDEF de *aca_1413* fue reemplazada con un cassette de resistencia para el antibiótico kanamicina. El plasmidio suicida pOT-ACA1413::Kan fue traspasado a *At. caldus* mediante conjugación con *E. coli* HB101. Los transconjugantes de *At. caldus* Kan^r fueron analizados por “colony blot” (figura 15) y southern blot (figura 16). Aquellos seleccionados por su resistencia a kanamicina fueron replicados en forma de “parche” para poder confirmar la recombinación entre el plasmidio suicida y el genoma de *At. caldus* (figura 15). Para este propósito, se construyeron dos sondas (figura 3, página 43; figura 16 A).

Tabla 12. Cuantificación de c-di-GMP en extractos ricos en nucleótidos obtenidos desde cepas de *S. typhimurium*.

Cepa	nmoles de c-di-GMP/mg de proteína
AdrA1f_p24 (control)	3,09 ± 0,45
AdrA1f_AdrA	40,29 ± 3,95
AdrA1f_1413	27,34 ± 1,41

Los valores de concentración de c-di-GMP corresponden a un promedio de tres ensayos independientes.



Figura 15. Análisis mediante colony blot de la recombinación entre el plasmidio suicida y el genoma de *At. caldus* ATCC 51756. Todos los clones muestran una señal positiva con la sonda 2, indicando que el cassette de resistencia a kanamicina fue incorporado en el genoma. Para discriminar entre una recombinación doble y simple, las mismas membranas se utilizaron en una hibridación contra la sonda 1, en la cual no se detectó señal, sugiriendo que todos son dobles recombinantes y mutantes para el gen *aca_1413*. C1: control positivo con sonda 1; C2: Control positivo con sonda 2.

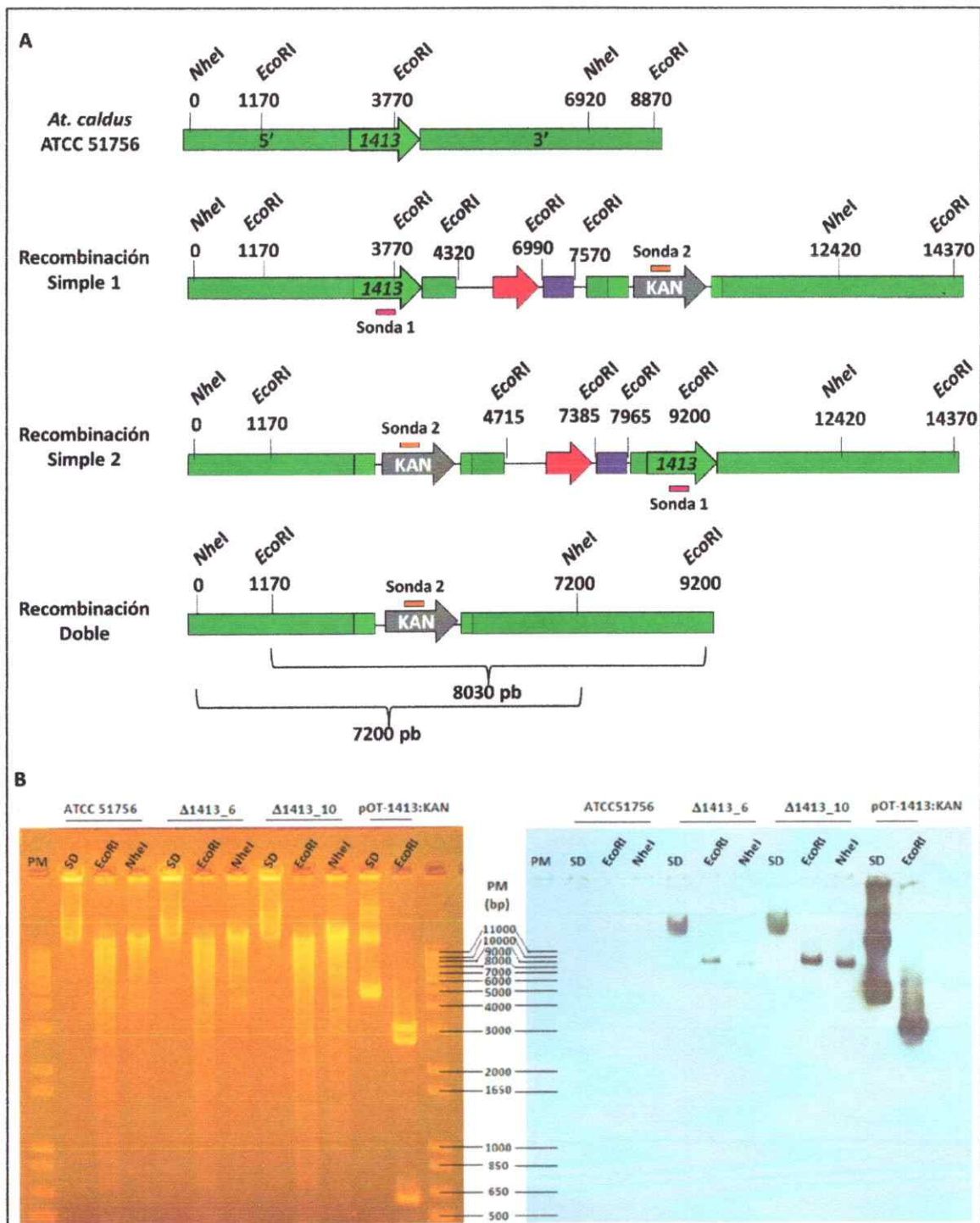


Figura 16. Comprobación de la recombinación doble de DNA genómico de dos transconjugantes de *At. caldus* digeridos con *EcoRI* y *NheI*. A, esquema de las distintas posibilidades de recombinación entre el plasmidio suicida y el DNA genómico. B, Southern blot. Las membranas fueron hibridadas con la sonda específica para el cassette de resistencia a kanamicina (sonda 2). SD, sin digerir. PM, estándar de peso molecular.

La sonda 1 hibrida con el sitio del gen *aca_1413* que fue escindido, mientras que la sonda 2 hibrida dentro del marcador de resistencia a kanamicina. Los clones provenientes de un ensayo de conjugación mostraron una señal positiva con la sonda 2, indicando que la recombinación ocurrió al menos una vez y que por lo tanto, el cassette de resistencia a kanamicina fue incorporado en el genoma. Para discriminar entre una recombinación doble y una simple, la misma membrana se utilizó en una hibridación contra la sonda 1, en la cual al no observar señal se puede concluir que los transconjugantes provienen de una doble recombinación. Por lo tanto, los clones (1-18) aislados revelan ser dobles recombinantes (figura 15). Para comprobar que la recombinación ocurrió en la región del genoma donde se encuentra el gen *ACA_1413*, se procedió a realizar un "southern blot" con la sonda 2 (figura 16 B). El DNA genómico de los clones de *At. caldus* provenientes de los parches 6 y 10 fue digerido con las enzimas de restricción *NheI* y *EcoRI*. Como se puede predecir de la recombinación doble (figura 15 A), la digestión con *EcoRI* produce una señal de 8.030 pb, mientras que con *NheI* se produce una señal de 7.200 pb. Por otra parte, las dos posibilidades de recombinación simple producirían señales de 12.420 pb con *NheI*, mientras que con *EcoRI*, en un caso debería observarse una señal de 6.800 pb y en el otro una señal de 3.545 pb. Este resultado indica que el intercambio corresponde a dos eventos de recombinación y que estos clones son mutantes para el gen *aca_1413*.

3.7 Comparación y caracterización de las cepas ATCC 51756 y Δ ACA_1413 de *At. caldus*

3.7.1 Comparación de los niveles de c-di-GMP mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo

Debido a problemas técnicos del equipo, no fue posible concretar el estudio comparativo de los niveles de c-di-GMP de la cepa silvestre y los clones 6 y 10 de la cepa Δ ACA_1413 de *At. caldus* mediante el mismo método de cuantificación por HPLC utilizado para cuantificar los niveles de c-di-GMP en *Salmonella*. Para este efecto, se realizaron ensayos de HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de

triple cuadrupolo (Agilent_Technologies, 2008), cuya sensibilidad está en el rango femtomolar. Los análisis fueron realizados en el Centro de Metabolómica y Espectrometría de Masas del “Scripps Research Institute”, California, EEUU. La separación de la muestra fue realizada mediante una columna de fase reversa y el tiempo de elución del estándar comercial de c-di-GMP fue de 4 min (figura 17). El análisis MS/MS fue realizado en modo MRM (multiple reaction monitoring) en polaridad positiva, permitiendo medir simultáneamente las transiciones +691,1→151,9 (ion cuantificador) y +691,1→135,0 (ion calificador), las que se han reportado con anterioridad como transiciones correspondientes a la fragmentación del ion parental de c-di-GMP (m/z 691,1) (Hickman y Harwood, 2008, Spangler y cols., 2010). El ion parental es seleccionado en el primer cuadrupolo y fragmentado en el segundo cuadrupolo o celda de colisión. El tercer cuadrupolo selecciona iones únicos provenientes de la fragmentación del c-di-GMP los que serán posteriormente cuantificados. En este análisis, el ion más abundante fue la especie m/z 151,9 (ion cuantificador), el que se utilizó para cuantificar el c-di-GMP presente en las muestras. La cuantificación de la segunda señal más abundante (ion calificador), correspondiente a la especie m/z 135,0 permitió obtener una proporción entre los iones cuantificador/calificador cercano a 46,9 para el estándar comercial c-di-GMP (figura 17 A, panel derecho). Posteriormente, esta proporción se utilizó para la confirmación de la identidad del c-di-GMP en los extractos ricos en nucleótidos de *At. caldus* (figura 17). Es aceptado que una variación menor que el 20% del valor cuantificador/calificador da cuenta de la misma molécula (Mohsin y cols., 2007). La cuantificación de los iones cuantificador y calificador provenientes de los picos eluidos a los 4 min reveló que las proporciones entre éstos variaron entre 45,5 (3%) y 50,1 (7%) (anexo 8), por lo que se consideró que las cuantificaciones realizadas corresponden a c-di-GMP. Los niveles de c-di-GMP encontrados en la cepa silvestre son significativamente más altos que los encontrados en los clones 6 y 10 de la cepa Δ ACA_1413. Los extractos ricos en nucleótidos de *At. caldus* muestran un gran pico que eluye inmediatamente antes que el pico caracterizado para la elución del c-di-GMP. Anteriormente, este pico ha sido reportado como un compuesto interferente desconocido que no corresponde a c-di-GMP (Waters y cols., 2008).

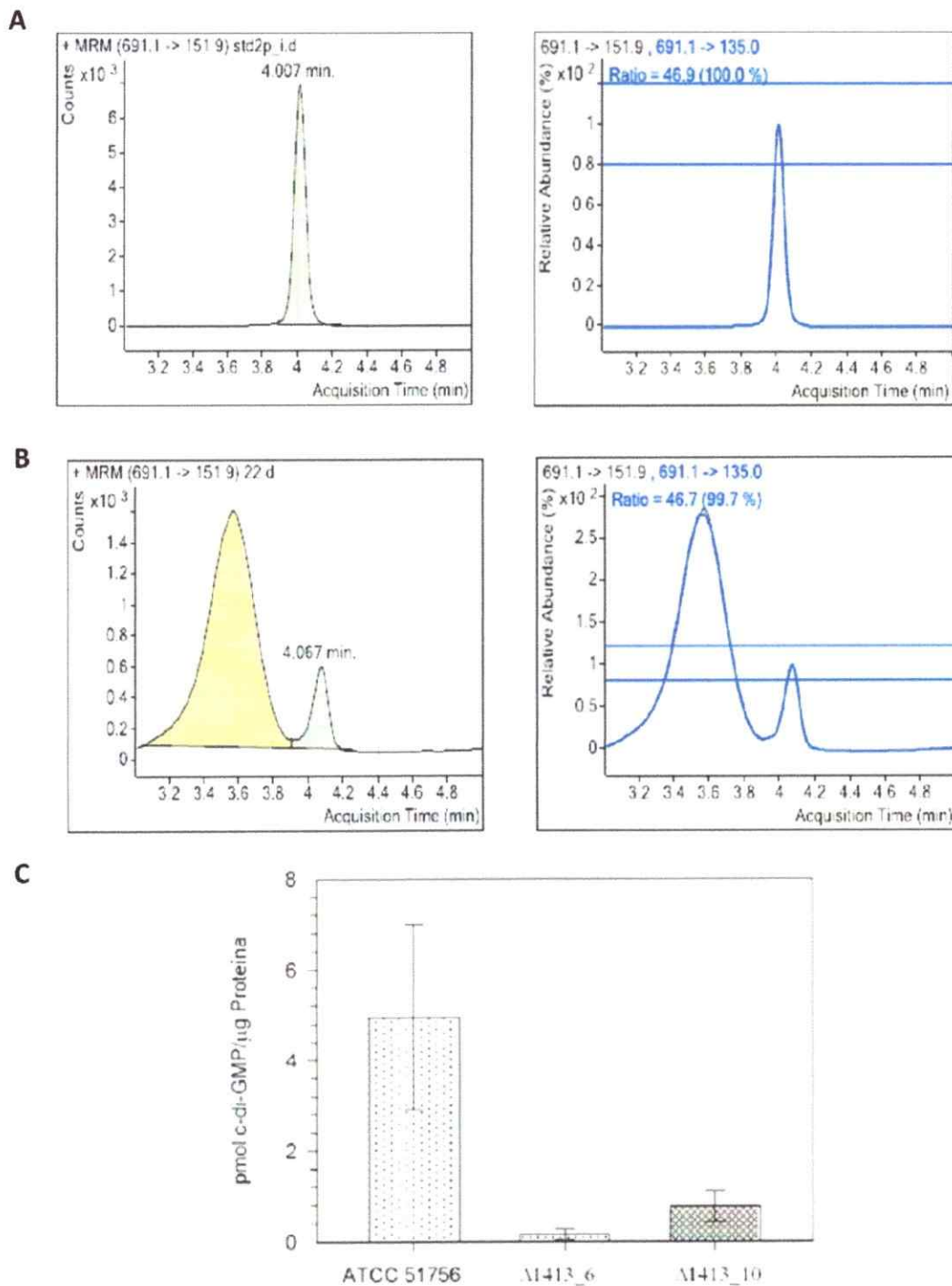


Figura 17. Análisis comparativo de los niveles de c-di-GMP de las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de *At. caldus* mediante espectrometría de masas. A, ejemplo de elución de estándar de c-di-GMP. A la izquierda se muestra la cuantificación del ion cuantificador, mientras que a la derecha se muestra la abundancia relativa del ion cuantificador/ ion calificador. B, ejemplo de elución de las muestras nucleotídicas obtenidas desde las cepas ATCC 51756 y Δ ACA_1413. C, cuantificación de las muestras obtenidas desde las cepas ATCC 51756 y Δ ACA_1413. Los gráficos corresponden al promedio y desviación estándar de tres réplicas biológicas de cada cepa.

3.7.2 Adherencia a sustrato de *At. caldus* ATCC 51756

Con el objetivo de caracterizar la adherencia al sustrato e indagar acerca de la formación de biopelículas en *At. caldus*, la cepa ATCC 51756 fue crecida utilizando cupones de azufre elemental como fuente de energía durante 5 días a 45°C. Los cupones fueron analizados mediante técnicas de microscopía de barrido (figura 18 y 20) y de fluorescencia (figura 19). En la figura 18, se puede observar que una misma célula (flechas verdes) puede contactar directamente cuatro, cinco y quizás más células mediante estos filamentos, así como también que una célula puede contactar a otra mediante más de un filamento (flechas celestes). Estas proyecciones pueden conectar células vecinas o bien células que se encuentran distantes (2 o 3 μm), lo que permite la formación de una red de contacto tridimensional que parece involucrar a la mayoría de las células dentro de la biopelícula. Los cupones fueron rescatados a diferentes tiempos y observados mediante microscopía de fluorescencia utilizando una sonda específica para DNA (DAPI) y otra sonda con afinidad por hidratos de carbono (FITC-ConA). En la figura 19 se observa que células de la cepa ATCC 51756 son capaces de adherirse a los cupones de azufre a tiempos de incubación tan breves como 5 min. La cantidad de células adheridas va incrementando sostenidamente en el tiempo hasta formar una biopelícula que cubre prácticamente por completo el cupón entre las 24 y 48 h de incubación. Sin embargo, desde de las 72 h, es posible observar la disminución de células sobre el cupón, sugiriendo el desprendimiento de células desde la biopelícula. Las microfotografías adquiridas con FITC-ConA indican que las células poseen hidratos de carbono en su superficie, sugiriendo que *At. caldus* sintetiza algún tipo de exopolisacárido. En ningún caso se observaron células teñidas con DAPI que no se hayan teñido con FITC, lo que podría apuntar hacia la importancia de polisacáridos extracelulares en la adherencia de *At. caldus* a azufre elemental.

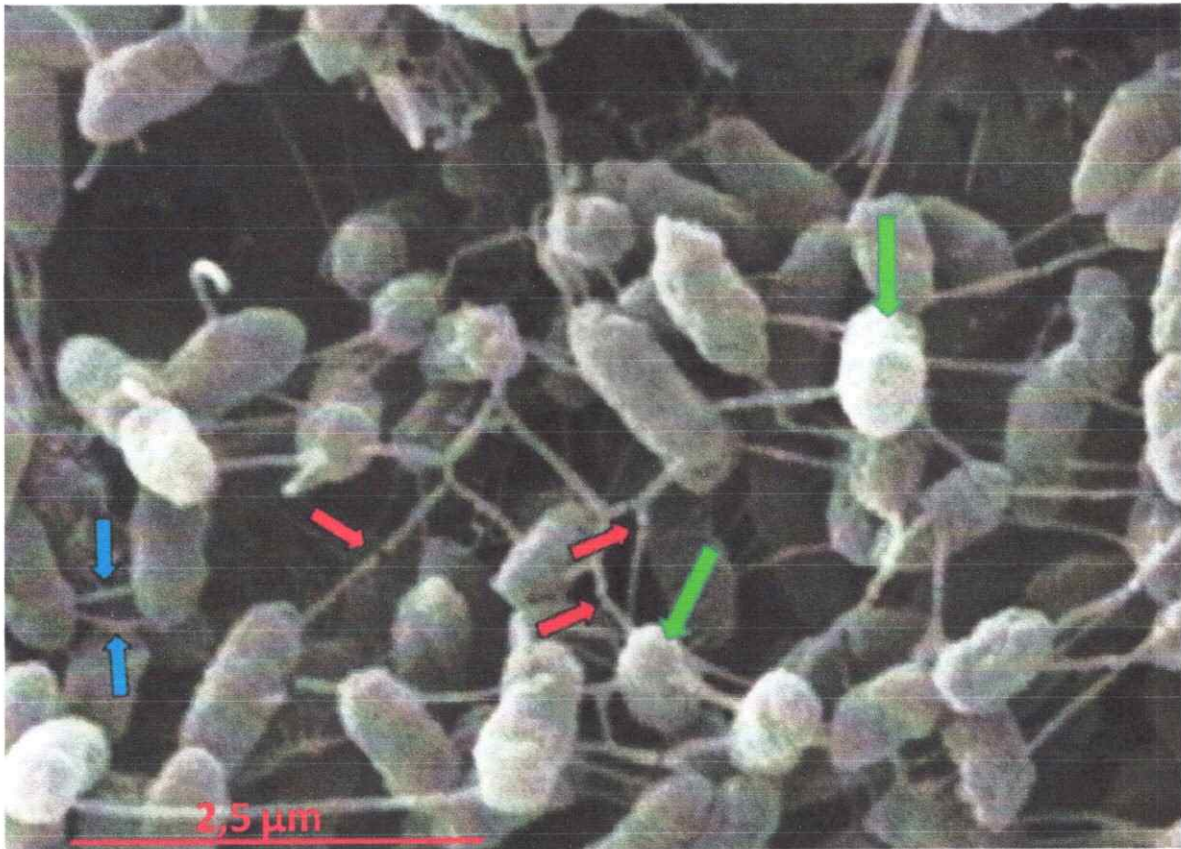


Figura 18. Red de contacto tridimensional mediada por proyecciones filamentosas de la biopelícula de *At. caldus* ATCC 51756 formada sobre un cupón de azufre elemental. Células (flechas verdes) pueden contactar directamente varias otras mediante este tipo de proyecciones. La conexión puede realizarse a través de más de un filamento (flechas celestes). Las flechas rojas indican un espacio entre los filamentos. Aunque no puede descartarse que este efecto sea deba al fraccionamiento de los filamentos por la manipulación de la muestra, esta observación podría sugerir que filamentos provenientes de distintas células se unen.

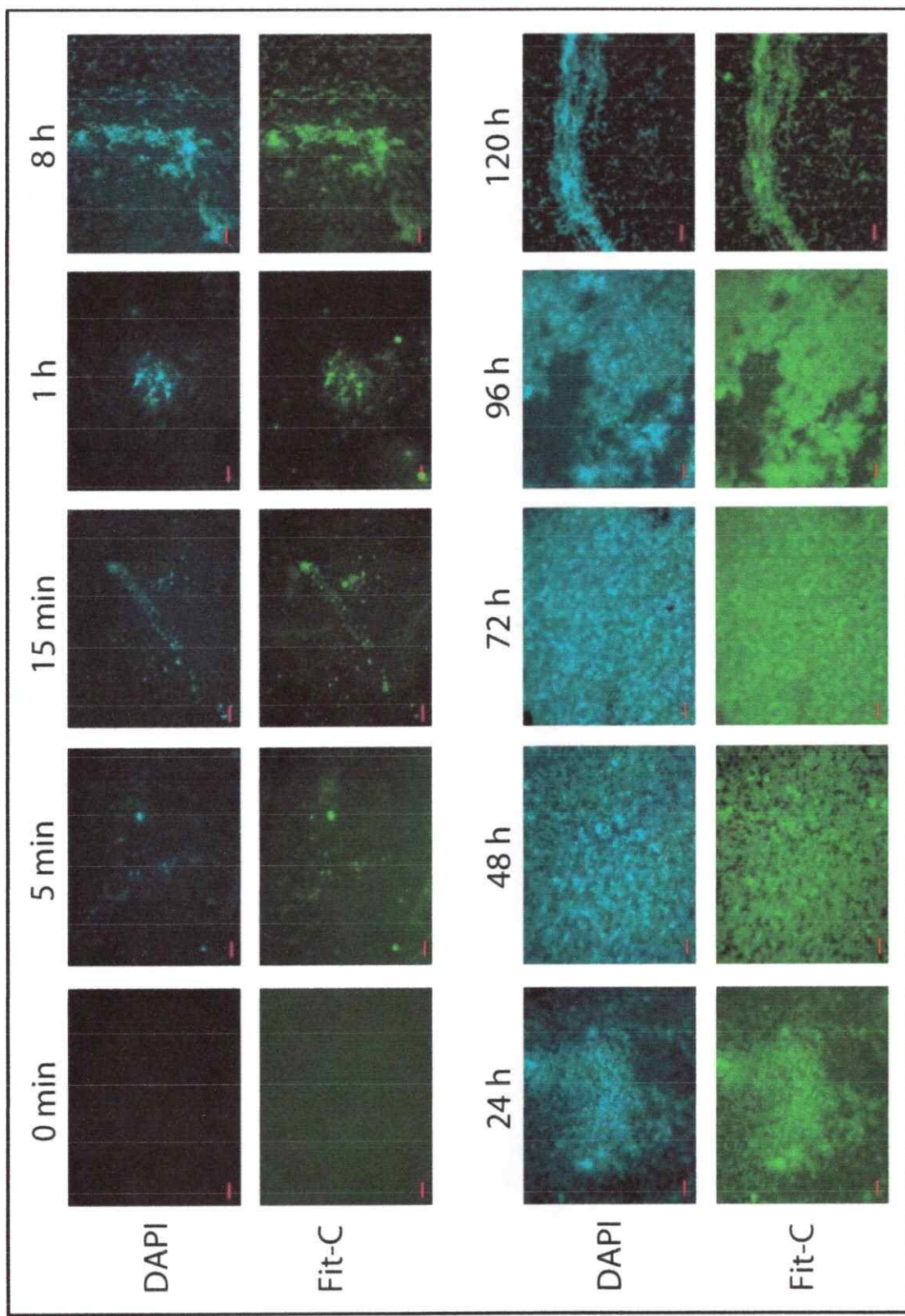


Figura 19. Cinética de adhesión de células de *Azotobacter caldus* ATCC 51756 a cupones de azufre elemental mediante microscopía de fluorescencia. Las células fueron visualizadas mediante la emisión de los fluoróforos DAPI y Fit-C-ConA entre los tiempos 0 y 120 h. La barra roja representa 10 μm .



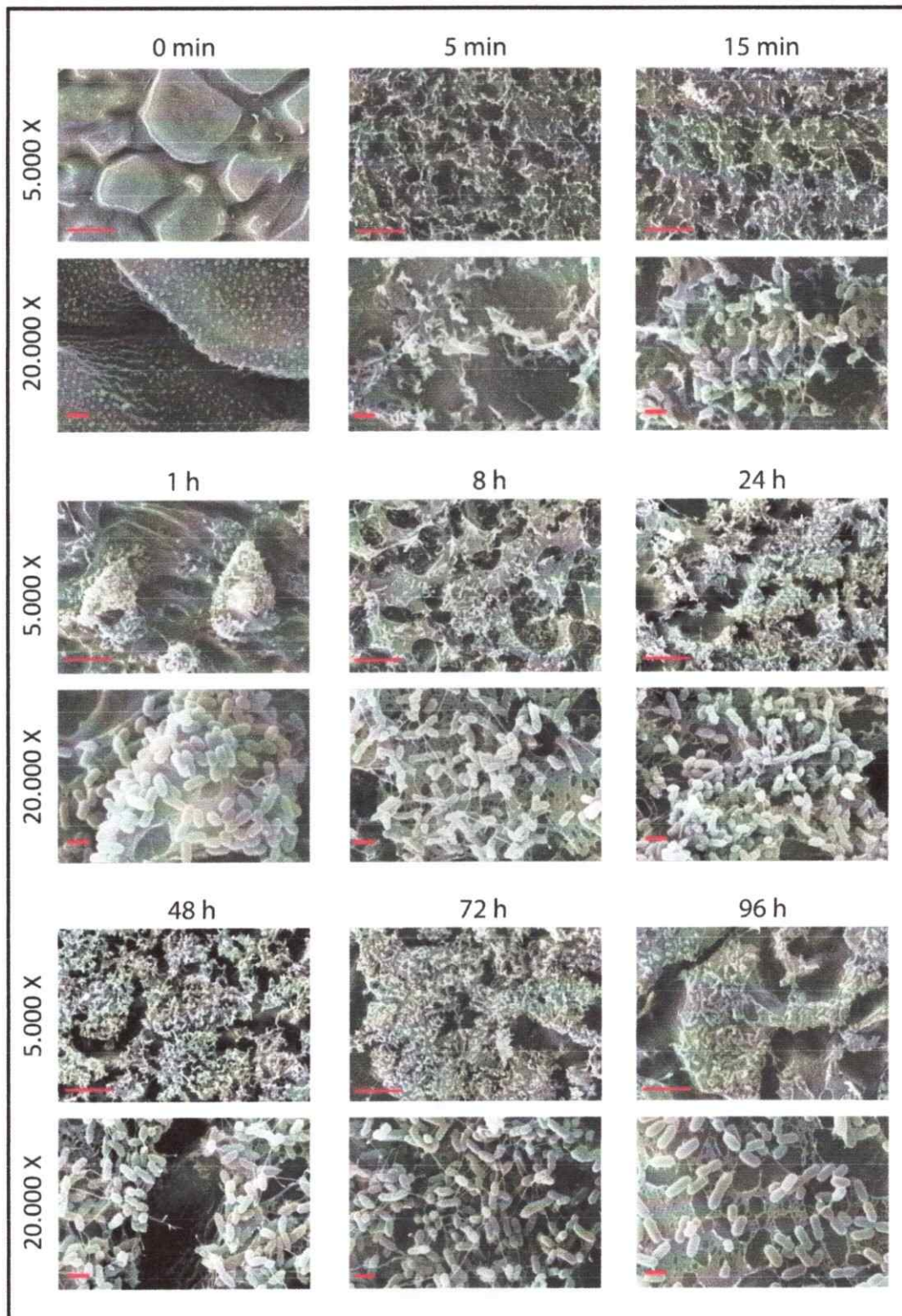


Figura 20. Cinética de adhesión de células de *At. caldus* ATCC 51756 a cupones de azufre elemental mediante microscopía de barrido. Las células fueron visualizadas entre los tiempos 0 y 96 h con un aumento de 5.000X (barra roja representa 20 μm) y 20.000X (barra roja representa 1 μm).

Para explorar con mayor detalle la formación de la biopelícula de *At. caldus*, se procedió a examinar cupones de azufre incubados hasta 96 h mediante microscopía de barrido. La figura 20 muestra que la superficie de los cupones de azufre no son lisas, sino que presentan cavidades que permiten la formación de valles y cimas. A los 5 min de incubación aparecen células de *At. caldus* adheridas a la superficie de los cupones, las que se presentan como pequeñas agrupaciones a los 15 min. A los 60 min, las agrupaciones se ven más pobladas, apareciendo tanto en las cimas como en los valles de la superficie del cupón.

Entre las 24 y 72 h, la superficie del cupón se observa más poblada y las proyecciones celulares aparecen, incluso, conectando células separadas por valles. Finalmente, a las 96 h, la superficie del cupón se encuentra menos poblada mostrando lo que pudiese ser desprendimiento de células. La etapa final de la biopelícula formada por *At. caldus* es la desarticulación de la misma, la que comienza alrededor de las 72 h. Alícuotas de cultivos de 96 h crecidos en azufre elemental observados a través microscopía de transmisión, muestran que las células de *At. caldus* se encuentran formando grandes agrupaciones (anexo 9), sugiriendo que las biopelículas podrían desarticularse mediante el desprendimiento de "parches" que contienen centenares de células.

3.7.3 Comparación de la adherencia a sustrato de las cepas ATCC 51756 y Δ ACA1413 de *At. caldus*

La cuantificación de las células planctónicas de cultivos de las cepas ATCC51765 y Δ ACA1413 de *At. caldus* crecidas usando cupones de azufre elemental como fuente energética fue utilizado como medida indirecta de la adherencia a sustrato. Mediante este ensayo, se detectó una clara diferencia en la adherencia de estas cepas a tiempos cortos (figura 21), lo que no se detecta desde las 2,5 h en adelante. Inicialmente, los matraces fueron inoculados a una concentración de 1×10^7 células/ml (tiempo 0), seguido de la adición de los cupones de azufre elemental. A los 15 minutos de incubación, la

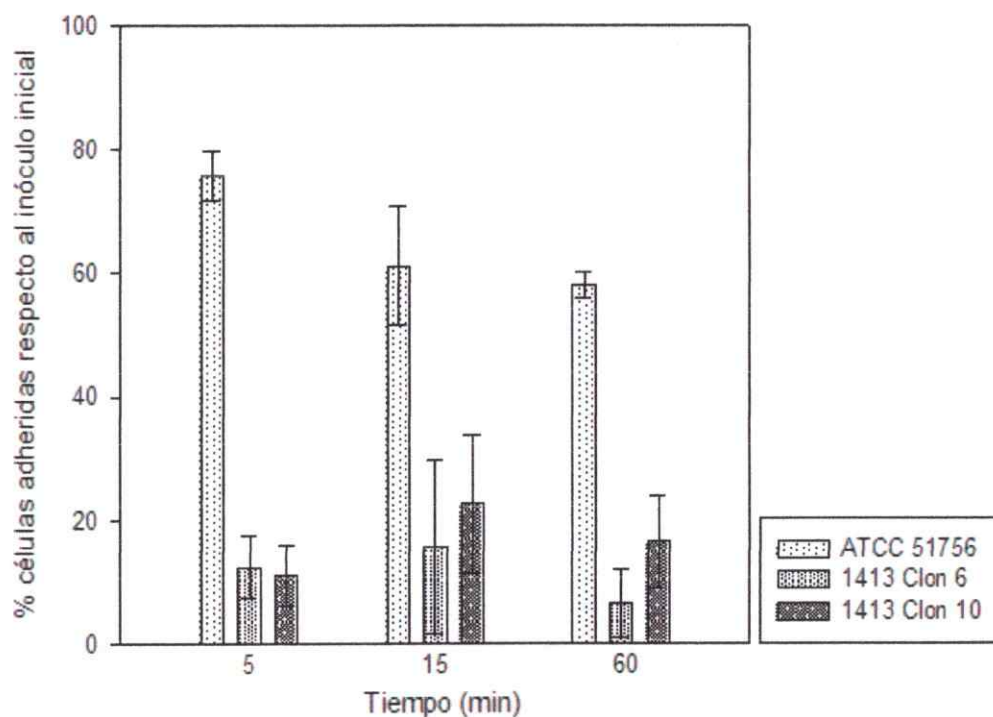


Figura 21. Cuantificación de la adherencia de las cepas ATCC 51756 y Δ ACA_1413 de *At. caldus* a sustrato sólido. Cultivos de las cepas silvestre y mutante fueron incubados con cupones de azufre elemental durante diferentes tiempos. La adherencia a los cupones fue determinada como la diferencia entre la cantidad de células planctónicas inoculadas inicialmente y la cantidad de células que permanecen en este estado después de agregar el sustrato sólido al cultivo. Se grafican los resultados de tres replicas.

concentración de células plantónicas del cultivo de la cepa silvestre cae abruptamente, mostrando cerca de 4 veces menos que los cultivos de las cepas deficientes en ACA_1413, los que se mantienen cerca de su concentración celular inicial. Si bien esta diferencia se va a acortando en el tiempo, su significancia estadística se mantiene hasta los sesenta min. Esto sugiere que en comparación con la cepa silvestre, los mutantes poseen una menor capacidad para adherirse a los cupones de azufre a tiempos tempranos. Esto se correlaciona con lo observado directamente en los cupones mediante microscopía de fluorescencia (figura 22) y microscopía electrónica de barrido (figura 23). En ambos casos se observó que al tiempo de una h de incubación habían menos células adheridas de la cepa mutante Δ ACA1413 en comparación con la cepa silvestre.

3.7.4 Caracterización de la motilidad en *At. caldus* ATCC51756

La tenue diferencia en la adherencia entre las cepas ATCC51765 y Δ ACA1413, podría indicar que la acción del c-di-GMP sintetizado por ACA_1413 podría influir en un proceso distinto a la adherencia a sustrato. En la mayoría de las bacterias donde se ha descrito una vía de señalización mediante c-di-GMP, ésta se ha relacionado inversamente con los fenotipos adherencia y de motilidad (Pesavento y cols., 2008, Simm y cols., 2004).

En la literatura se han descrito diversos medios sólidos para el crecimiento de acidófilos, los que generalmente consisten en las soluciones salinas tradicionales con una fuente energética soluble como el tetrationato o tiosulfato para oxidadores de azufre, o FeSO_4 para oxidadores hierro, utilizando como agentes gelificantes el agar (Bryant y cols., 1983, Dopson y Lindstrom, 1999, Peng y cols., 1994, Temple y Colmer, 1951, Tian y cols., 2003, Waksman, 1922) o phytigel (Hallberg y Lindstrom, 1994, van Zyl y cols., 2008). No obstante, pocos trabajos han descrito medios sólidos (o semi-sólidos) para la caracterización de la motilidad de este tipo de microorganismos, los que incluyen gelificantes de tipo agar (Black y cols., 1979), agarosa, silicona (Li y cols., 2009) o gelrite (Szabo y cols., 2007).

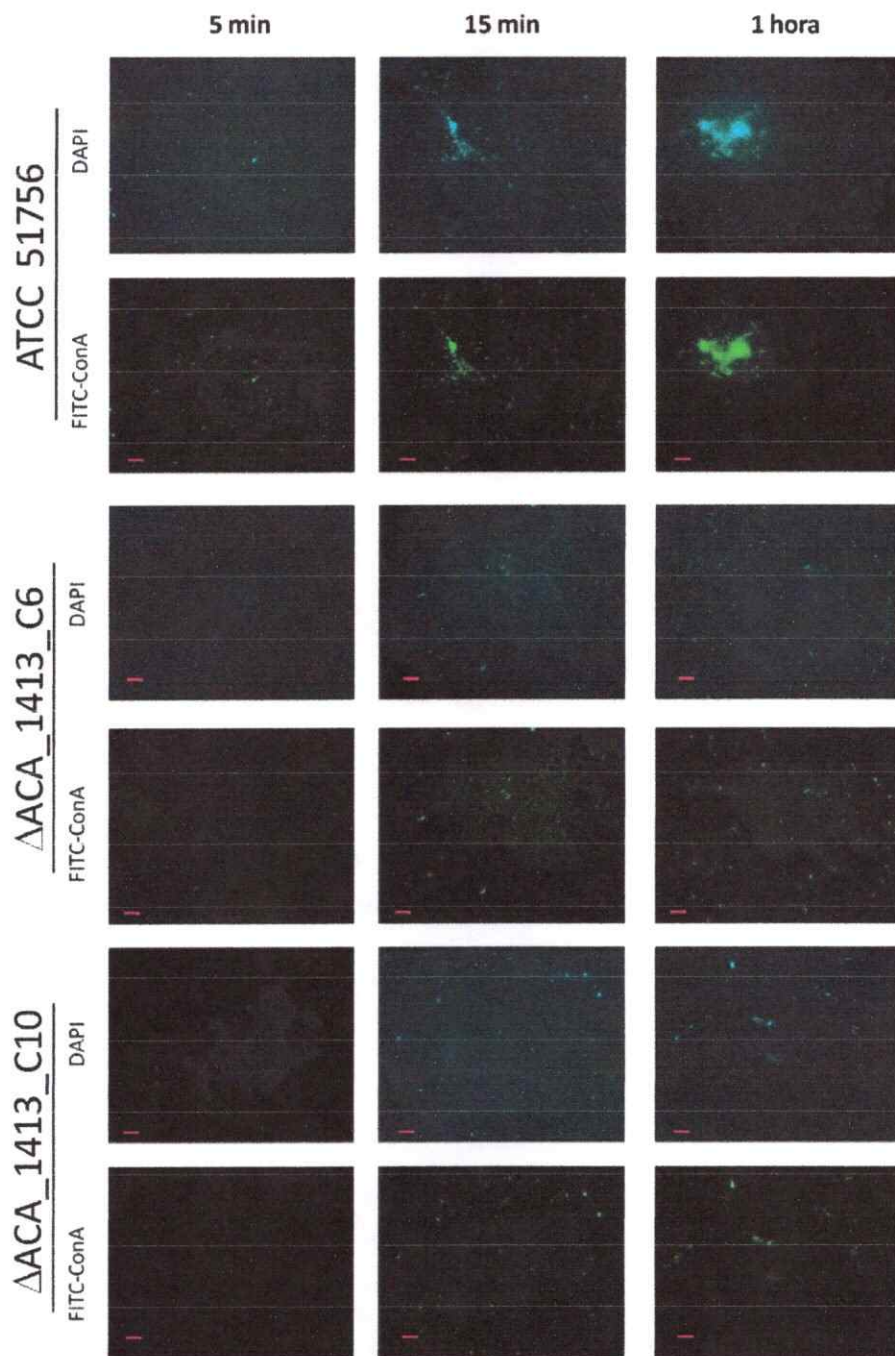


Figura 22. Evaluación de la adherencia de las cepas cepas silvestre y Δ ACA_1413 de *At. caldus* a sustrato sólido (azufre elemental) mediante microscopía de fluorescencia. El panel superior de cada cepa corresponde a las microfotografías adquiridas con DAPI, mientras que el panel inferior muestra las microfotografías adquiridas con FITC-ConA. La barra roja representa 10 μ m.

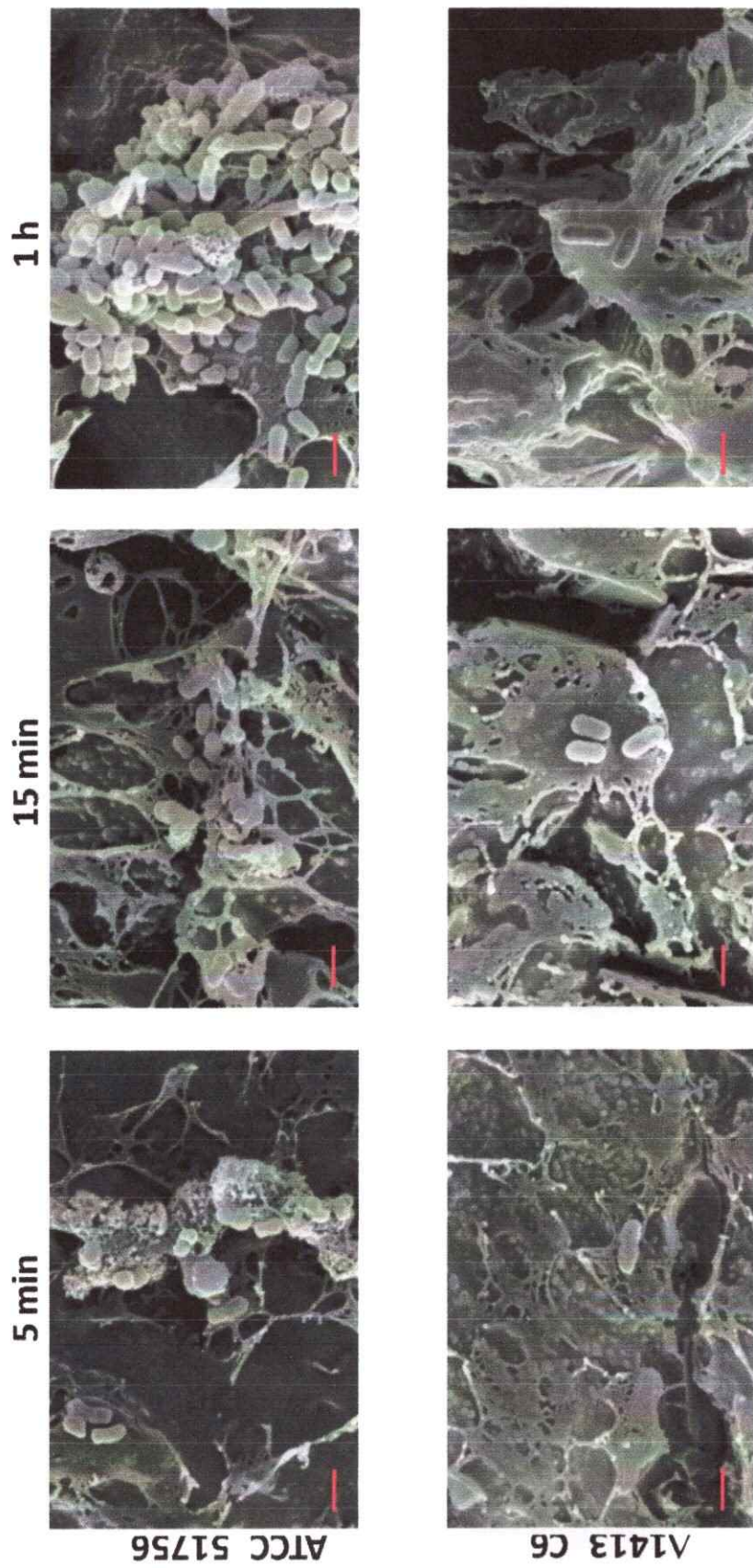


Figura 23. Evaluación de adherencia de las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de *At. caldus* a sustrato sólido (azufre elemental) mediante microscopía de barrido. La barra roja representa 1 μ m.

Para caracterizar la motilidad de *At. caldus*, se optó por desarrollar un medio semisólido. Luego de probar varias condiciones, se definió un medio cuya composición consistente en MSM (pH 4,7), 0,2% (p/v) Phytigel (Sigma-Aldrich) como agente gelificante y tetrionato como fuente energética. Las placas fueron inoculadas con una gota de 5 μ l de cultivo en fase exponencial (1×10^8 células/ml), incubadas 4 días a 45°C y fotografiadas cada 24 h (figura 24).

3.7.5 Comparación de la motilidad de las cepas ATCC 51756 y Δ ACA1413 de *At. caldus*

Sobre la base de los resultados obtenidos con el desarrollo del medio semisólido para caracterizar la capacidad de motilidad de *At. caldus*, se compararon las cepas silvestre y mutante Δ ACA_1413. El ensayo consistió en sembrar una gota de 5 μ L (1×10^8 células/ml) de cada cepa sobre placas con tres medios semisólidos diferentes con distinto porcentaje de agente gelificante y pH. Las placas se incubaron 4 días a 45°C. En el medio [MSM, 0,2% Phytigel, pH 4,7 y tetrionato 0,2%] no se observaron diferencias significativas (anexo 10), mientras que los medios [MSM, 0,08% Phytigel, pH 4,7 y tetrionato 0,2%] y [MSM, 0,08% Phytigel, pH 2,5 y tetrionato 0,2%] permitieron visualizar diferencias de motilidad significativas entre las cepas silvestre y mutante (figuras 25 y 26). En comparación con la cepa silvestre, cuyo diámetro de migración promedia un centímetro, los clones 6 y 10 de la cepa Δ ACA_1413 presentan una motilidad aumentada, alcanzando diámetros de migración entre 1,5 y 2 centímetros. Esto sugiere fuertemente que niveles bajos de c-di-GMP promueven la motilidad de *At. caldus*.

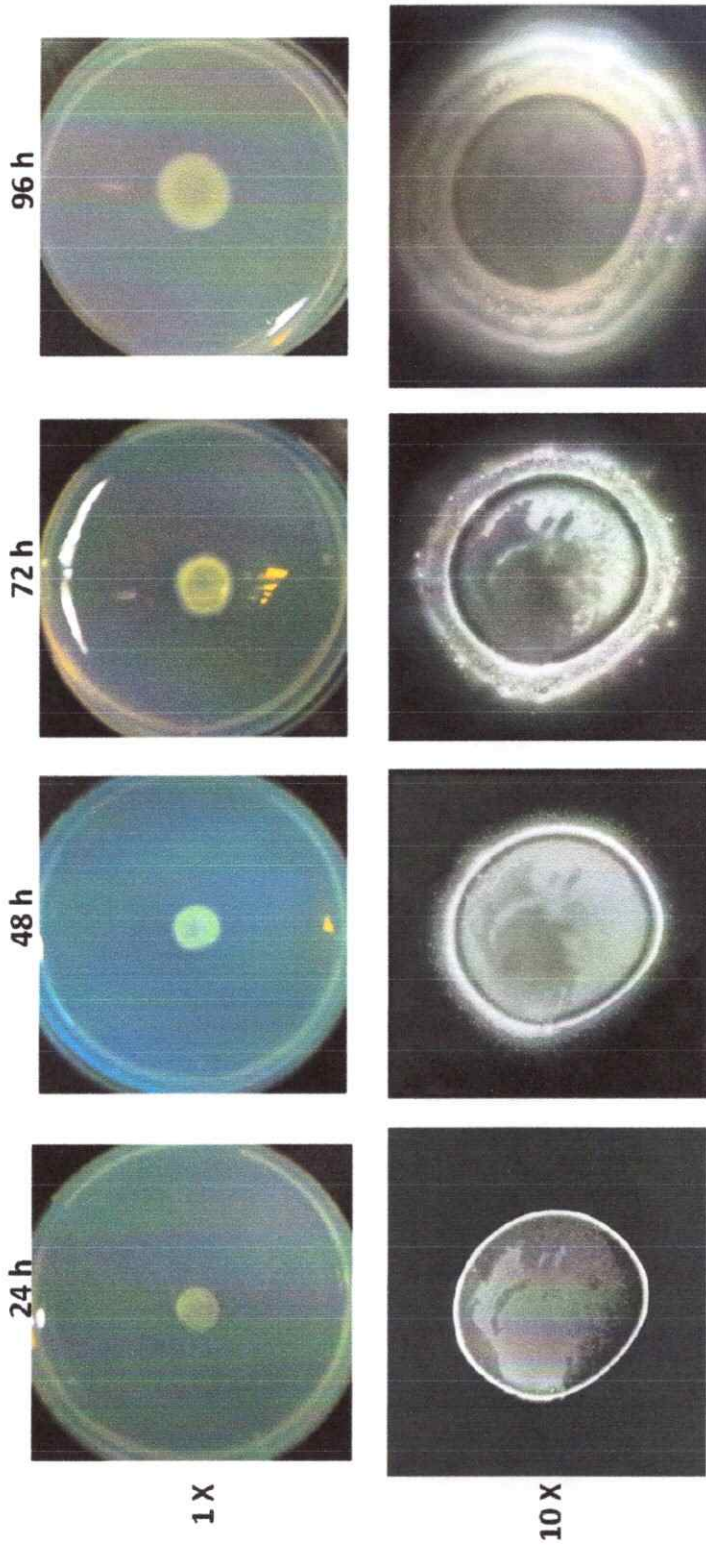


Figura 24. Ensayo de motilidad de *At. caldus* ATCC 51756 en medio semisólido (Phytigel 0,2%, pH 4,7). El medio fue inoculado con una gota de cultivo ($5 \mu\text{l}$) conteniendo 1×10^8 células/ml, e incubado a 45°C por 4 días.

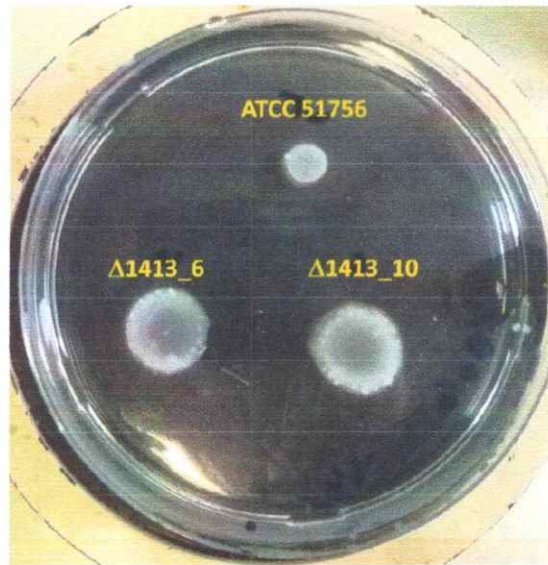
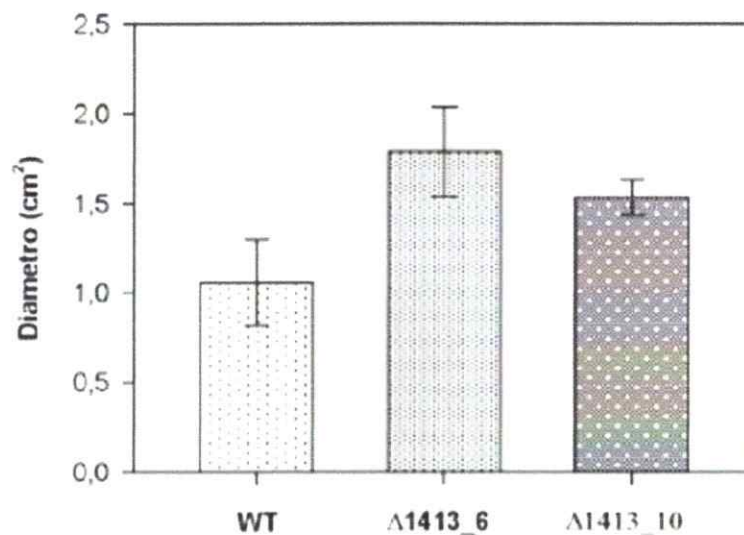
A**B****C**

Figura 25. Comparación de la motilidad entre las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de *At. caldus* en el medio [Phytigel 0,08%, pH 4,7]. Las cepas silvestre y mutante fueron inoculadas en medio semisólido e incubadas a 45°C durante 4 días (A). En (B) se muestra una ampliación (10X) de cada resultado lograda con una lupa óptica. En (C) se muestra la longitud del diametro alcanzado por las distintas cepas. La cuantificación se basó en tres replicas.

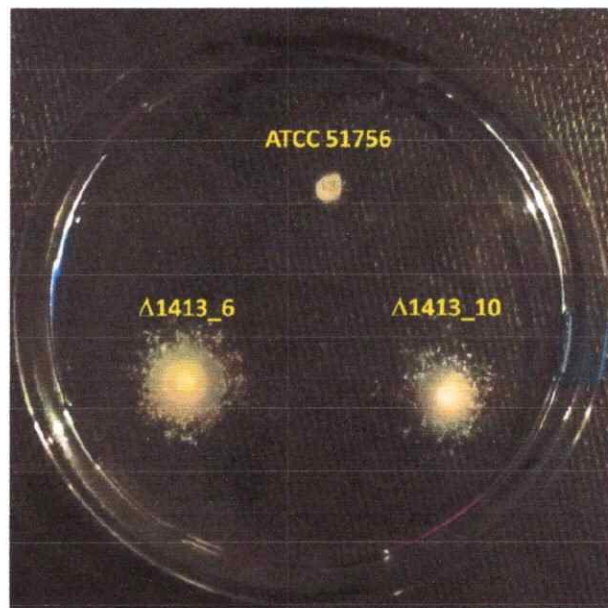
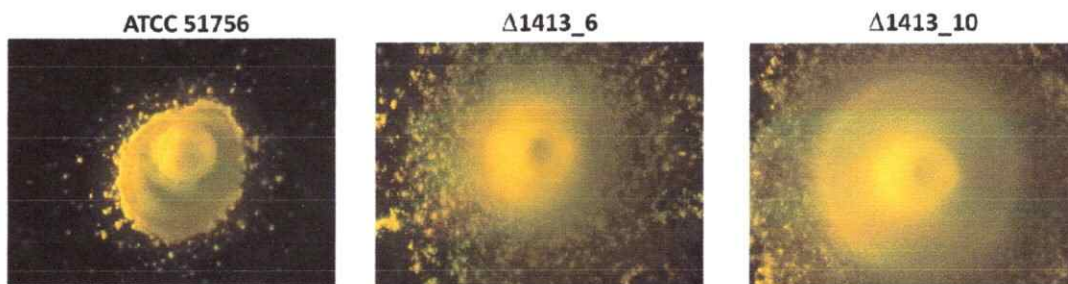
A**B**

Figura 26. Comparación de la motilidad entre las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de *A. caldus* en medio [Phytigel 0,08%, pH 2,5]. Las cepas silvestre y mutante fueron inoculadas en medio semisólido e incubadas a 45°C durante 4 días (A). En (B) se muestra una ampliación (10X) de cada resultado lograda con una lupa óptica. En (C) se muestra la longitud del diametro alcanzado por las distintas cepas.

4. DISCUSIÓN

La presencia de genes que codifican proteínas relacionadas con el c-di-GMP en genomas de distintos *Acidithiobacillus*, abrió la posibilidad de que una vía de señalización basada en este segundo mensajero exista como mecanismo regulatorio común en este género (Castro y cols., 2009). Si bien en esta tesis se utilizó a *At. caldus* como modelo de estudio para investigar acerca de la relación de la vía del c-di-GMP con la adherencia a sustrato y la motilidad, la caracterización bioinformática de los posibles componentes de esta vía se extendió a todas las cepas de *Acidithiobacillus* cuyos genomas se encuentran disponibles, lo que reveló que la cantidad y tipos de elementos relacionados con el c-di-GMP varían incluso entre cepas de la misma especie (tabla 13).

4.1 Análisis comparativo de la vía del c-di-GMP en diferentes especies de *Acidithiobacillus*

4.1.1 Funcionalidad de las DGCs y PDEs

El 90% (68/76) de las proteínas con dominio GGDEF (con o sin dominio EAL) presentes en las cuatro especies de *Acidithiobacillus* analizadas se predijeron como DGCs funcionales (tabla 14).

En el caso de *At. caldus*, once de quince proteínas con dominio GGDEF serían DGCs funcionales, lo que se comprobó *in vivo* para cuatro de ellas (ACA_1872, ACA_1413, ACA_0279 y ACA_2590) utilizando ensayos de complementación fenotípica en *S. typhimurium* y/o *E. coli* (figuras 10-12, páginas 67-70). Ensayos similares han demostrado la funcionalidad de cuatro DGCs de *At. thiooxidans* (Díaz, 2012) y cuatro DGCs de *At. ferrooxidans* ATCC 23270 (Ruiz y cols., 2012), lo que junto con la detección del c-di-GMP en extractos celulares de estos tres *Acidithiobacillus* comprueban la capacidad de estos microorganismos para sintetizar c-di-GMP.

Tabla 13. Dominios relacionados con la vía del c-di-GMP en *Acidithiobacillus*.

	<i>At. ferrooxidans</i>		<i>At. thiooxidans</i>	<i>At. caldus</i>		<i>At. ferrivorans</i>
	ATCC 23270	ATCC 53993	ATCC 19377	ATCC 51756	SM-1	SS3
GGDEF	N.D.	1	9	9	8	3
EAL	1	1	3	3	3	N.D.
GGDEF-EAL	4	3	12	6	6	15
HD-GYP	N.D.	N.D.	1	N.D.	N.D.	1
PilZ	2	2	9	8	6	6
PelD	N.D.	N.D.	1	1	1	N.D.

N.D., No detectado.

Tabla 14. Predicción de la actividad DGC o PDE de los dominios GGDEF y EAL encontrados en *Acidithiobacillus*.

GGDEF-EAL	GGDEF⁺	GGDEF⁻	TOTAL
EAL⁺	42	3	45
EAL⁻	0	1	1
TOTAL	42	4	46

GGDEF	GGDEF⁺	GGDEF⁻	TOTAL
	26	4	30

EAL	EAL⁺	EAL⁻	TOTAL
	6	5	11

GGDEF⁺ y EAL⁺ indican dominios predichos como DGC y PDE funcionales, respectivamente. GGDEF⁻ y EAL⁻ indican dominios no funcionales como DGC y PDE. La primera parte de la tabla muestra que de las 46 proteínas con dominios GGDEF-EAL (en rojo), 42 contendrían dominios funcionales como DGC y PDE, 3 tendrían un dominio GGDEF inactivo como DGC y un dominio EAL funcional como PDE, mientras que sólo uno tendría ambos dominios inactivos.

Al contrario de *At. thiooxidans* y *At. ferrivorans*, los que poseen un OFR que codifica una proteína con dominio HD-GYP, *At. ferrooxidans* y *At. caldus* no presentan elementos genéticos candidatos para este dominio, por lo que en estas últimas especies la actividad PDE debería residir solamente en los dominios EAL. El 93% (53/57) de las proteínas con dominio EAL (con o sin dominio GGDEF) presentes en las cuatro especies de *Acidithiobacillus* analizadas se predijeron como PDEs funcionales (tabla 14). En *At. caldus*, siete de nueve proteínas con dominio EAL fueron predichas como PDEs funcionales, entre las que se encuentra ACA_1873, una proteína que consiste solamente en un dominio EAL. La expresión de ACA_1873 en ensayos de complementación de la cepa MAE 282 de *S. typhimurium* no permitió atenuar el fenotipo rdar, lo que podría indicar, contrariamente a la predicción anterior, que esta proteína no es funcional como PDE (anexo 11). Sin embargo, una comparación nucleotídica entre las cepas SM-1 y ATCC 51756 de *At. caldus* reveló una alta identidad entre la región que contiene a *aca_1873* en ATCC 51756 y la que contiene un gen que codifica para una proteína GGDEF-EAL en la cepa SM-1, sugiriendo que un reordenamiento del genoma podría haber fragmentado un gen que codificaba para una proteína GGDEF-EAL, dejando al dominio EAL de ACA_1873 solo. Así, tal como ocurre en otras proteínas GGDEF-EAL (Christen y cols., 2005, Kumar y Chatterji, 2008), la ausencia del dominio GGDEF podría impactar negativamente la actividad PDE del dominio EAL, lo que podría explicar la eventual falta de actividad PDE de ACA_1873. Al igual que esta última, dos proteínas EAL de *At. thiooxidans* ATCC 19733 (111_81 y 128_46) no complementaron la cepa MAE 282 de *S. typhimurium* (Díaz, 2012), mientras que cuatro proteínas GGDEF-EAL de *At. ferrooxidans* ATCC 23270, cuya actividad DGC ha sido comprobada, no mostraron actividad PDE en ensayos de sobre-expresión en *E. coli* (Ruiz y cols., 2012), por lo que hasta la fecha, no ha sido posible detectar experimentalmente la actividad PDE en miembros del género *Acidithiobacillus*. La ausencia de reversión fenotípica no establece irrefutablemente la ausencia de actividad PDE. Al contrario de lo que ocurre durante la sobreexpresión de una DGC, donde los altos niveles de c-di-GMP alcanzados pueden afectar distintos efectores, la sobre-expresión de una PDE no es garantía de que ésta se asocie con componentes efectores de un determinado módulo, por lo que la

ausencia de un fenotipo, en este caso la disminución del morfotipo rdar, no indica necesariamente que la proteína en cuestión no tenga actividad PDE en su microorganismo de origen. Por otro lado, se han reportado proteínas EAL que a pesar de no poseer actividad PDE participan de una regulación mediante el c-di-GMP. Es así como la proteína EAL Ydiv (STM1344) de *S. typhimurium*, no muestra actividad PDE *in vitro*, no obstante, influye en el metabolismo del c-di-GMP al reprimir la expresión de las PDEs STM 1703 y STM 3611 (Simm y cols., 2009). Entonces, una eventual falta de actividad PDE tampoco es suficiente para descartar algún rol de las proteínas EAL en una vía del c-di-GMP en *Acidithiobacillus*. Este conjunto de datos plantea la necesidad de abordar de forma distinta la detección y caracterización de una actividad PDE en *Acidithiobacillus*.

DGCs y PDEs de membrana cumplen funciones regulatorias sobre procesos que allí ocurren (Kader y cols., 2006, Tal y cols., 1998). Por ejemplo, en *S. typhimurium*, la DGC AdrA se ancla a la membrana a través de su dominio MASE (membrane-associated sensor), donde es capaz de activar el complejo celulosa sintasa e inducir la formación de biopelículas. Una revisión de 11.248 proteínas con dominio GGDEF y/o EAL codificadas en 618 genomas bacterianos, reveló que el 51% (5.687) de ellas presentan señales de localización de membrana o se superficie (Seshasayee y cols., 2010). Una búsqueda de segmentos transmembrana en las proteínas involucradas con el metabolismo del c-di-GMP, reveló que en *At. ferrivorans* el 42% de las proteínas (8 de 19) tendrían al menos un segmento transmembrana. Esta proporción disminuye a 20% en *At. thiooxidans* (5 de 25), 6% en *At. caldus* (1 de 18) y a 0% en *At. ferrooxidans* (0 de 5), sugiriendo que en *Acidithiobacillus* la mayoría de las proteínas con dominio GGDEF y/o EAL son citoplasmáticas. Aunque se requiere realizar experimentos para comprobarlo, una razón para esta ubicación mayoritariamente citoplasmática, podría ser el pH ácido del periplasma de estos microorganismos acidófilos.

4.1.2 Dominios sensores y posibles estímulos extracelulares para la regulación del metabolismo del c-di-GMP en *Acidithiobacillus*

La mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP de las cuatro especies de *Acidithiobacillus* analizadas poseen dominios sensores caracterizados previamente en otras bacterias, o bien, una cantidad de aminoácidos suficientes (>100) como para acomodar uno o más dominios no caracterizados hasta ahora (tabla 15). Los dominios mayormente representados, PAS, GCS y GAF, se han relacionado con la detección del oxígeno molecular y/o el potencial redox en otras bacterias (Chang y cols., 2001, Cho y cols., 2009, Kitanishi y cols., 2010, Kumar y cols., 2007, Tuckerman y cols., 2009), sugiriendo que el metabolismo del c-di-GMP en *Acidithiobacillus* podría estar regulado por estos estímulos. Los *Acidithiobacillus* requieren grandes cantidades de energía para soportar la fijación de carbono, siendo el oxígeno el aceptor final de electrones más favorable. Por otro lado, al ser el potencial redox de la pareja Fe^{2+}/Fe^{3+} (+770 mV a pH 2) casi tan positivo como de O_2/H_2O (+820 mV a pH 7), la oxidación de hierro sólo ocurre en condiciones aerobias, lo que es relevante para los oxidadores de hierro *At. ferridurans*, *At. ferrivorans* y *At. ferrooxidans*. Este último, es capaz de utilizar aceptores finales de electrones distintos del oxígeno, como es el caso del ion férrico (Sugio y cols., 1990, Sugio y cols., 1988, Suzuki y cols., 1990). Sin embargo, a la fecha es la única especie de *Acidithiobacillus* para la cual una respiración anaeróbica ha sido caracterizada (Hallberg y cols., 2001), lo cual revela la importancia del oxígeno molecular en el metabolismo energético para los *Acidithiobacillus*.

La presencia de dominios REC en proteínas GGDEF y GGDEF-EAL de *Acidithiobacillus* indican que la síntesis o degradación de c-di-GMP podría estar regulada/acoplada por sistemas quimiosensoriales de dos (o más) componentes, tal como ocurre en los sistemas DivK/J-PleC/D de *C. crescentus* (Paul y cols., 2008), WspF/R de *P. aeruginosa* (Hickman y cols., 2005) y VieS/A/B de *V. cholerae* (Martinez-Wilson y cols., 2008).

Tabla 15. Dominios sensores presentes en proteínas GGDEF, EAL, GGDEF-EAL y HD-GYP de *Acidithiobacillus*.

	GGDEF	EAL	GGDEF-EAL	HDGYP	Total
Secuencias no anotadas*	13	1	15	-	29
PAS	12	-	13	-	25
GAF	4	-	16	-	20
GCS	-	1	6-9**	-	7-10**
REC	1	-	3	2	6
HDOD	2	2	-	-	4
HD	1	-	-	-	1
MASE1	-	-	1	-	1
Total	30	11	46	2	***

* Corresponden a secuencias de más de cien aminoácidos que no se asocian con algún dominio particular.

** Las cepas SM-1 de *At. caldus* y ATCC 23270 y 53993 de *At. ferrooxidans* poseen un dominio GCS trunco.

*** El total de proteínas relacionadas con el metabolismo del c-di-GMP (89) difiere de la sumatoria de los dominios sensores (93-96) debido a que en una misma proteína puede haber más de uno de éstos.

4.1.3 Efectores y componentes blanco

Mientras que las enzimas responsables del metabolismo del c-di-GMP son fácilmente identificables por sus dominios GGDEF, EAL y HD-GYP, los efectores que sensan c-di-GMP no pueden ser identificados exclusivamente por un dominio en particular, ni tampoco por un sitio único de unión al dinucleótido (tabla 4, página 19). Sin embargo, en diferentes especies bacterianas, dominios GGDEF y EAL inactivos como DGC y PDEs respectivamente, así como también dominios PilZ y homólogos a PeID han sido caracterizados como efectores de la vía del c-di-GMP.

Dominios GGDEF y EAL inactivos

Cuatro proteínas con dominios EAL fueron predichas como PDEs inactivas, cada una codificada en cuatro cepas distintas de *Acidithiobacillus*: *At. caldus* ATCC 51756 y SM-1, *At. thiooxidans* ATCC 19377 y *At. ferrivorans* SS3. Tres de estas posibles proteínas, ACA_1348 y YP_004750159.1 de *At. caldus* ATCC 51756 y SM-1, respectivamente, y “83_33” de *At. thiooxidans* ATCC19377, presentan un alto grado de identidad entre sí, y los genes que las codifican se encuentran en contextos génicos conservados, lo que sugiere que se trata de proteínas ortólogas. Éstas consisten en un dominio EAL acoplado a un dominio HDOD situado hacia el C-terminal, lo que sugiere que la unión de c-di-GMP al dominio EAL podría regular la actividad fosfohidrolasa asociada a estos dominios. En el caso del ortólogo de *At. caldus*, ACA_1348, el dominio HDOD está incompleto, por lo que difícilmente podría ser capaz de actuar como fosfohidrolasa. Sin embargo, el dominio HDOD trunco de ACA_1348 podría estar cumpliendo otro rol en la transducción del c-di-GMP. Hasta ahora, se han descrito dos efectores con dominio EAL, FimX y LapD, de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, respectivamente (Newell y cols., 2009, Qi y cols., 2011). Además del dominio EAL, ambos efectores contienen otros dominios hacia el N-terminal, los que están involucrados en la transducción de la señal mediante interacciones proteína-proteína. Este tipo de interacciones se han reportado en otros miembros de la familia HD (Ryan y cols., 2012), por lo que ACA_1348 podría jugar un rol en la interacción molecular con otras proteínas. La cuarta proteína con dominio EAL inactivo corresponde a YP_004783418.1 de *At. ferrivorans* SS3, la

que además contiene un dominio GGDEF predicho como inactivo y cuenta con un motivo RxxD de unión a c-di-GMP. La presencia de este motivo en combinación con la ausencia de residuos clave para la actividad DGC es característica de los dominios GGDEF que cumplen la función de efectores (Boyd y O'Toole, 2012). Por ende, ésta y otras tres proteínas (ACA_1412 de *At. caldus*, YP_004783418.1 de *At. ferrivorans* y “3_2” de *At. thiooxidans*) que poseen un motivo RxxD dentro de un dominio GGDEF predicho como inactivo, podrían actuar como efectores de la vía del c-di-GMP en estos microorganismos, mientras que en *At. ferrooxidans* no fue posible identificar elementos que permitieran apoyar una función efectora de los dominios GGDEF.

Dominio PilZ

Se detectaron genes que codifican proteínas con dominios PilZ en los cuatro genomas de *Acidithiobacillus* analizados. En otras bacterias, la mayoría de estas proteínas se relaciona con la formación del pili tipo IV, lo que sugiere que procesos dependientes de este apéndice, como la motilidad tipo “twitching” y la formación de biopelículas, podrían ser regulados por una vía del c-di-GMP en *Acidithiobacillus*. *At. caldus*, *At. thiooxidans* y *At. ferrivorans* presentan dominios PilZ codificados por genes homólogos a *bcsA*, el que codifica para la subunidad A de la celulosa sintasa, los cuales además conservan en su contexto a *bcsB*, el que codifica para la subunidad B de la celulosa sintasa. Esto sugiere que en estas bacterias un componente objetivo de alguno de los módulos de la vía del c-di-GMP podría ser un eventual complejo celulosa sintasa, el que podría regular la síntesis de polímeros extracelulares tal como ocurre en *G. xilynus* (Weinhouse y cols., 1997; Ryjenkov y cols., 2006). Por otro lado, en *At. caldus* SM-1 un dominio PilZ está asociado a un dominio de unión a DNA, HTH, en una misma cadena polipeptídica, indicando que tal como ocurre en otras bacterias (Fazli y cols., 2011), el c-di-GMP podría regular la transcripción génica. En todos los *Acidithiobacillus* se encontraron proteínas GGDEF o GGDEF-EAL codificadas inmediatamente río abajo o río arriba de genes PilZ (figura 6, página 60), lo que podría indicar la participación de éstos en un mismo módulo de regulación. Efectivamente, a pesar de que muchas de las proteínas que componen un módulo están

codificadas en distintas regiones del genoma, algunos componentes de un mismo módulo pueden estar codificados en genes contiguos, formando un operón (Tuckerman y cols., 2009).

PelD

En *P. aeruginosa*, se han reportado tres operones involucrados en la síntesis de SPEs: *pel*, *alg* y *psl*, los que están involucrados en la síntesis de los exopolisacáridos PEL, alginato y PSL, respectivamente (Franklin y cols., 2011). Estos tres exopolímeros son estructural y funcionalmente distintos. El alginato es generalmente considerado como el exopolisacárido involucrado en la conversión mucoide que ocurre meses o años después de la colonización, mientras que PSL y PEL estarían involucrados en las etapas tempranas de la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* (Chung y cols., 2008). PEL es un polímero rico en glucosa distinto de la celulosa, cuya síntesis depende de genes ubicados en el operón *pelABCDEFGHIJ* (Friedman y Kolter, 2004a). Los mecanismos biosintéticos de este exopolisacárido no están completamente entendidos, sin embargo, análisis de comparación estructural *in silico* han predicho que, a excepción de *pelF*, todas las proteínas codificadas en el operón *pel* conformarían un complejo con componentes de membrana interna, periplasmáticos y de membrana externa (Franklin y cols., 2011). Una de las pocas proteínas cuyo rol ha sido experimentalmente comprobado es PelD (Lee y cols., 2007). PelD es una proteína de membrana interna posee un dominio citoplasmático estructuralmente similar al dominio GGDEF sin actividad DGC, el que contiene un motivo RxxD similar al sitio Ip de las DGC. La unión de c-di-GMP a este sitio permite la activación de la síntesis del polisacárido Pel (Lee y cols., 2007). Aunque el mecanismo por el cual PelD ejerce su acción es desconocido, su localización celular permite sugerir el transporte del polímero a través de la membrana interna hacia el periplasma, donde otros componentes periplasmáticos y de membrana externa terminan su secreción (Franklin y cols., 2011). De forma interesante, homólogos de PelD de *P. aeruginosa* sólo fueron encontrados en los oxidadores de azufre *At. caldus* y *At. thiooxidans*. Ambos ortólogos conservan un motivo RxxD de unión a c-di-GMP y sus contextos génicos presentan la totalidad de los genes que conforman el operón *pel* (figura 5, página 57), involucrado en la síntesis del

exopolisacárido PEL. Además, en ambos operones se encuentra un gen que codifica para una UDP-glucosa 4-epimersa, la cual probablemente esté involucrada en la síntesis del precursor del exopolisacárido PEL. Esto podría sugerir que en los oxidadores de azufre *At. caldus* y *At. thiooxidans*, PelD pudiese actuar como un efector que activa un complejo de membrana responsable de la síntesis del exopolisacárido PEL, el cual pudiese ser relevante para la adherencia al sustrato de estos microorganismos.

4.1.4 Hipótesis Modular

La presencia de numerosos genes que codifican proteínas con dominios GGDEF, EAL y/o HD-GYP en un mismo genoma indica una redundancia en la función específica de estos dominios (sintetizar o degradar c-di-GMP). Sin embargo, ciertas DGCs y PDEs regulan determinados procesos de forma específica. Para tener cuenta de esta realidad se ha definido el concepto de “c-di-GMP control module” (Hengge, 2009). Un módulo se compone del conjunto de DGCs y PDEs que sintetizan y degradan c-di-GMP, de un efector que une el c-di-GMP en un sitio alostérico, y de un componente blanco u objetivo que regula un fenotipo en respuesta a la interacción directa con el complejo efector-c-di-GMP. Por ejemplo, en *E. coli*, dos DGCs, YegE y YedQ, y la PDE YhjH controlan los niveles de c-di-GMP responsables de regular negativamente la motilidad a través la interacción del efector YcgR (cargado con c-di-GMP) con componentes de la maquinaria de rotación del flagelo (Pesavento y cols., 2008, Povolotsky y Hengge, 2012). Un módulo particular puede regular un fenotipo mediante la activación de otro módulo distinto. Por ejemplo, la DGC YdaM y la PDE YciR controlan los niveles de c-di-GMP que regulan positivamente la expresión del regulador transcripcional *csgD*, el que además de activar la transcripción de los genes estructurales de la fimbria *csgBAC*, induce la expresión de *yaiC* y *yoaD* (Pesavento y cols., 2008, Weber y cols., 2006), los que codifican para las DGC y PDE candidatas YaiC y YoaD, respectivamente, las que a su vez regulan la actividad del complejo celulosa sintasa (Brombacher y cols., 2003; Brombacher y cols., 2006). En este caso, una unidad del componente

objetivo (BcsA) está covalentemente asociado al efector (dominio PilZ), revelando la proximidad espacial entre los componentes del módulo.

Diversos trabajos han demostrado la interacción entre proteínas de un módulo. Es así como la PDE RpfG, de *Xanthomonas axonopodis pv citri*, interactúa directamente con varias proteínas con dominio GGDEF (Andrade y cols., 2006). También se han detectado interacciones entre la DGC HmsT, la PDE HmsP, la glicosiltransferasa HmsR y su factor asociado HmsS, todos los cuales se presentan adheridos a membrana interna y son necesarios para la excreción de exopolisacáridos y formación de biopelículas (Bobrov y cols., 2008). Asimismo, se ha sugerido la interacción directa entre el efector con dominio PilZ, Alg44, y la glicosiltransferasa responsable de la síntesis de alginato, Alg8, en la cara interna de la membrana plasmática de *P. aeruginosa* (Oglesby y cols., 2008). Otro ejemplo son la DGC DosC y la PDE DosP de *E. coli*, las que se encuentran asociadas a una polinucleótido fosforilasa (PNPase) formando un degradosoma, cuya actividad se ve aumentada por unión de c-di-GMP a este último componente (Tuckerman y cols., 2011). La interacción directa y localizada de los componentes de un módulo permitiría que la concentración local de c-di-GMP sea biológicamente efectiva, y que en una misma célula se encuentren funcionando simultáneamente distintos módulos, cuya síntesis de c-di-GMP no interfiere directamente en otros módulos (Povolotsky y Hengge, 2012).

La expresión de los elementos involucrados en la vía del c-di-GMP en *At. ferrooxidans* (Ruiz y cols., 2012), *At. thiooxidans* (Díaz, 2012) y *At. caldus* (esta tesis), sugieren la presencia de distintos módulos de control mediados por c-di-GMP en estas bacterias. La diferencia en el número de genes relacionados con el metabolismo del c-di-GMP entre los *Acidithiobacillus* podría reflejar la cantidad y la diversidad de procesos regulados por este segundo mensajero en cada cepa. En este sentido, de las cuatro especies, *At. ferrooxidans* es el que posee la cantidad más baja de genes relacionados con el metabolismo del c-di-GMP, y a la vez, es el único que posee un sistema funcional de Quorum Sensing tipo AI-1 (Farah y cols., 2005, Valdés y cols., 2008).

4.2 *Acidithiobacillus caldus* ΔACA_1413 como evidencia directa de una relación entre una vía de c-di-GMP y los fenotipos de formación de biopelículas y motilidad

Los efectores candidatos encontrados en los genomas de distintos miembros del género *Acidithiobacillus*, sugieren que la vía del c-di-GMP podría influir en la síntesis de exopolisacáridos y la motilidad tipo “Twitching”, dos procesos involucrados en el desarrollo de biopelículas en otras bacterias (López y cols., 2010). Una manera directa de relacionar una vía de c-di-GMP con un fenotipo en particular podría ser mediante la sobreexpresión o la inactivación de una DGC funcional, y la evaluación comparativa del fenotipo de esta cepa contra la silvestre. En el caso de la sobreexpresión, los niveles intracelulares de c-di-GMP pueden multiplicarse cientos de veces (Nakayama y cols., 2011, Simm y cols., 2004), lo que podría afectar uno o más fenotipos a través de distintos efectores. En este sentido, la inactivación de una determinada DGC probablemente afecte de forma más selectiva un efector y un fenotipo, los que se relacionan directamente con el c-di-GMP sintetizado por esta DGC.

La importancia de *At. caldus* en procesos de biolixiviación (Dopson y Lindstrom, 1999) (Rawlings, 2002, Rawlings y cols., 1999) (Dopson y Lindstrom, 2004) (Okibe y cols., 2003, Okibe y Johnson, 2004) (Semenza y cols., 2002) así como también sus capacidades para desplazarse mediante motilidad flagelar y para adherirse a sustratos sólidos (Edwards y cols., 2000, Edwards y Rutenberg, 2001), hacen que esta bacteria sea un excelente candidato para evaluar una relación entre una vía funcional del c-di-GMP y los fenotipos de adherencia a sustrato y formación de biopelículas. En esta tesis, fue posible complementar fenotipos dependientes de c-di-GMP en enterobacterias con cinco DGCs de *At. caldus*, dentro de las cuales, tanto por la intensidad del fenotipo como por los niveles de c-di-GMP alcanzados, se destaca la proteína ACA_1413 (ver resultados, páginas 66-74). Por otra parte, el genoma de *At. caldus* posee ortólogos de dos tipos de efectores involucrados directamente en la

formación de biopelículas, BcsA y PelD. No menos importante, recientemente se ha demostrado la factibilidad de obtener mutantes nulos de esta bacteria (Chen y cols., 2012, van Zyl y cols., 2008). Por estas razones, nos propusimos construir una cepa mutante de *At. caldus* que careciera de la DGC ACA_1413 y analizar el efecto de tal mutación sobre fenotipos particulares. La delección de *aca_1413* fue generada mediante la técnica de intercambio de marcador (MEM), para lo cual se construyó el plasmidio suicida pOT-ACA1413:Kan. Además de pOTACA1413:Kan, se construyeron otros tres plasmidios suicidas, pOTACA1873:Kan, pOTACA0987:Kan y pOTACA1266:Kan, los que se diseñaron para anular genes que codifican una PDE, el ortólogo de PelD y una proteína con dominio PilZ, respectivamente. Para cada uno de estos cuatro plasmidios suicidas se realizaron a lo menos tres ensayos de conjugación o electrotransformación. Exceptuando el caso de pOTACA1873:Kan, para el que no se obtuvieron transformantes, las transformaciones con el resto de los plasmidios siempre resultaron en numerosas colonias resistentes a kanamicina. Cerca de noventa colonias por cada construcción fueron analizadas mediante “colony blot”. La totalidad de las colonias analizadas provenientes de las transformaciones con pOTACA0987:Kan resultaron ser recombinantes simples (anexo 13). Por otra parte, de las transformaciones con los plasmidios pOTACA1413:Kan y pOTACA1266:Kan, 21 y 17 colonias respectivamente, mostraron ser recombinantes dobles según los ensayos de “colony blot”. Es probable que estas colonias provengan de un solo clon, ya que la frecuencia de recombinación doble reportada para *At. caldus* es cercana a 10^{-7} (van Zyl y cols., 2008).

Las mediciones y comparaciones de los niveles de c-di-GMP revelaron que la cepa mutante Δ ACA_1413 de *At. caldus* produce 3,5 veces menos c-di-GMP que la cepa silvestre (figura 18, página 82). Este resultado sugiere que la DGC ACA_1413 podría ser responsable del 71,6% de la producción total de c-di-GMP. Esto coincide con los experimentos realizados en *Salmonella*, donde la complementación del fenotipo *rdar* fue más notoria con el gen *aca_1413*. Estos resultados sugieren que la DGC ACA_1413 jugaría una función central en la vía del c-di-GMP en *At. caldus*, y además, en

correlación con los análisis bioinformáticos y de cuantificación de c-di-GMP en la cepa Δ ACA_1413, indica que existen otras DGCs actuando en paralelo.

4.2.1 Adherencia a sustrato y formación de biopelículas

Este es el primer trabajo donde se ha caracterizado la formación de biopelículas formadas por *At. caldus* sobre azufre elemental. Este microorganismo es capaz de adherirse al azufre elemental en tiempos tan cortos como 5 min. Debido a que en condiciones óptimas (45°C, pH 2,5), *At. caldus* presenta un tiempo generacional de 2-3 h (Hallberg y Lindstrom, 1994), es probable que a tiempos cortos de incubación (< 60 min) las células adheridas a la superficie del azufre elemental provengan del inoculo inicial y no de la duplicación de las primeras células adheridas. Posteriormente, grandes agrupaciones celulares cubren la superficie del cupón (figura 20, página 84), contrastando con lo reportado para superficies como piritita, en donde pocas células de *At. caldus* se adhieren a imperfecciones minoritarias de los cupones de ese mineral (Edwards y cols., 2000). Esta diferencia de comportamiento según el sustrato energético sólido podría explicarse por la diferencia desde el punto de vista electrostático de las superficies de ambos sustratos. En *At. ferrooxidans* las SPEs varían de acuerdo al sustrato utilizado. En piritita *At. ferrooxidans* produce SPE con una alta proporción de ácidos urónicos acomplejados con hierro (III), mientras que en azufre elemental produce principalmente SPEs hidrofóbicas con altas proporciones de ácidos grasos (Gehrke y cols., 2001, Gehrke y cols., 1998, Kinzler y cols., 2003, Sand y Gerke, 2006). Probablemente, las SPEs sintetizadas por *At. caldus* contienen ácidos grasos apolares que interactúan con el azufre elemental. Las microfotografías adquiridas utilizando el fluoroforo FITC acoplado a la lectina Concanavalina A, sugieren que las SPEs de *At. caldus* también están compuestas por exopolisacáridos, los que podrían ser sintetizados por los complejos de membrana Bcs o Pel, identificados mediante el análisis bioinformático (esta tesis), y cuya producción es regulada por c-di-GMP en otras bacterias (Lee y cols., 2007, Ross y cols., 1991). Desde las 8 h de incubación, las células de *At. caldus* comienzan a relacionarse a través de filamentos de diversa longitud formando una biopelícula interconectada, la que se desarticula entre las 72 y 96 h de

incubación. Los ensayos de adherencia a sustrato revelan diferencias leves entre las biopelículas formadas por la cepa silvestre y mutante Δ ACA_1413 de *At. caldus*. A tiempos cortos, en el mutante Δ ACA_1413 la colonización inicial del sustrato se observa retrasada, sugiriendo que esta cepa podría estar sufriendo una disminución en la capacidad de adherirse o un aumento en la capacidad de desprenderse de la superficie, o ambas a la vez. Por otro lado, fue posible observar que la cepa Δ ACA_1413, al igual que la silvestre, es capaz de sintetizar y conectarse a través de filamentos (figura 24, pág 96), sugiriendo que la DGC ACA_1413 no estaría involucrada en la formación de estos apéndices. Hasta el momento, no existen estudios que hayan identificado ni caracterizado estructuras de superficies en *Acidithiobacillus*, por lo que la naturaleza de estos filamentos, así como su función son inciertas en esta bacteria. Sin embargo, otras bacterias utilizan este tipo de estructuras para comunicar distintas señales o estímulos.

Apéndices extracelulares de superficie y comunicación celular en *At. caldus*

En la literatura se han reportado filamentos que se asemejan a los observadas en las biopelículas de *At. caldus* (anexo 14). El sistema de secreción tipo IV (T4SS) es responsable de la conjugación plasmidial y la transferencia de elementos integrativos y conjugativos (ICEs) entre bacterias, así como también del traspaso de toxinas proteicas desde bacterias a células eucariontes. Los T4SS están compuestos de una adhesina que media el contacto célula-célula, un canal de secreción que conduce el sustrato desde la célula donante hacia la receptora, y una proteína de acople, la que actúa como receptor de los sustratos en la entrada del canal de secreción. En el caso de *E. coli*, la longitud del llamado Pili-F varía entre 2 y 20 μ m, lo que comprende la longitud de las proyecciones observadas en *At. caldus*. Recientemente, se han caracterizado en *At. caldus* elementos genéticos involucrados en el proceso de conjugación, incluyendo los componentes del canal de secreción (Acuña y cols., 2013), lo que sugiere que los apéndices detectados podrían corresponder a estas estructuras. Otra alternativa pudiese ser los nanocables (“nanowires”), filamentos proteicos capaces de conducir una corriente eléctrica in vivo bajo ciertas condiciones biológicas. Estos filamentos fueron reportados por primera

vez en la bacteria *Geobacter sulfurreducens*, los que mostraron ser altamente conductivos y requeridos para la reducción de óxido de hierro III (Reguera y cols., 2005). La longitud de un nanocable puede variar entre 10 y 20 μm y están formados por subunidades de PilA, una pilina relacionada con el pili tipo IV. *At. caldus* posee un ORF con 71% de similitud con pilA de *G. sulfurreducens*, el cual se encuentra río arriba de una DGC y un efector tipo PilZ (figura 8, página 64). Por otra parte, *Pelotomaculum thermopropionicum* expresa un flagelo que se une específicamente a *M. thermautotrophicus*, un metanógeno que utiliza H_2 para reducir dióxido de carbono (Ishii y cols., 2005). Este anclaje, permite una relación de sintrofia entre estos microorganismos, en la que *M. thermautotrophicus* se mantiene dentro del alcance de la difusión de H_2 que produce *P. thermopropionicum* e induce la expresión de genes requeridos para la metanogénesis (Shimoyama y cols., 2009). *At. caldus* posee un flagelo polar (Halberg y Lindstrom 1994), por lo que estos filamentos podrían estar formados por componentes del aparato flagelar. El anexo 14 permite distinguir cierta similitud morfológica entre las proyecciones de *P. thermopropionicum* con las que presenta *At. caldus*. Finalmente, de forma reciente, se han descrito nanotubos bacterianos, conexiones tubulares de aproximadamente 30-130 nm de ancho y hasta 1 μm de largo, de origen membranoso y que permiten el traspaso de componentes citoplasmáticos como DNA y proteínas (Dubey y Ben-Yehuda, 2011; Schertzer y Whiteley, 2011). Estas estructuras son distintas del pili conjugativo, el que se ha descrito como un apéndice más delgado. Al igual que lo observado para *P. thermopropionicum* y *M. thermautotrophicus*, estos nanotubos se dan entre distintas especies como *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Los filamentos extracelulares producidos por *At. caldus* aparecen como parte importante de la conexión estructural de las biopelículas desarrollada por este microorganismo, por lo que dilucidar la identidad y funcionalidad de sus componentes será un tópico importante en futuras investigaciones.

4.2.2 Motilidad

Las sutiles diferencias observadas entre las cepas Δ ACA_1413 y silvestre de *At. caldus* en los ensayos de adherencia, reforzó la idea de evaluar otro fenotipo que pudiese ser regulado por c-di-GMP e involucrado con la capacidad de colonizar y “descolonizar” un sustrato sólido. En este sentido, la motilidad flagelar aparece como un aspecto relevante debido a que su regulación por c-di-GMP se ha reportado en diversas especies bacterianas (anexo 1).

Las agrupaciones celulares motiles de *At. caldus* mostraron un patrón de anillos concéntricos, cuyo desplazamiento varía dependiendo de la concentración del medio semisólido. Considerando el “swarming” como un proceso por el cual organismos motiles se esparcen activamente sobre una superficie (Kaiser, 2007), es posible clasificar la motilidad de *At. caldus* analizada en medio semisólido como del tipo “swarming”. Por otro lado, las bacterias provenientes de placas de motilidad muestran claramente un apéndice flagelar, sugiriendo que la motilidad presentada en estos ensayos dependen de este aparato (anexo 9) y, por ende, el desplazamiento de *At. caldus* puede enmarcarse en la definición clásica de “swarming”, la cual involucra el flagelo (Henrichsen, 1972). Tal como ocurre en otras bacterias como *Proteus mirabilis* (Rauprich y cols., 1996), es probable que los anillos sean el resultado de la repetición de ciclos compuestos por dos etapas: el “swarming” propiamente tal, seguido de la fase de consolidación, en la cual las células revierten hacia una forma vegetativa.

Por otro lado, el análisis comparativo entre las cepas silvestre y mutante reveló que en las cepas Δ ACA1413 de *At. caldus* presentan un mayor grado de motilidad. El mecanismo por el cual la DGC ACA_1413 podría regular la motilidad en *At. caldus* es desconocido. Esta proteína de 280 aminoácidos está compuesta de un dominio GGDEF ubicado en el C-terminal. Los primeros 120 aminoácidos de ACA_1413 no poseen similitud significativa con ningún dominio en particular. Sin embargo, una búsqueda preliminar determinó la presencia de un motivo “coiled coil” en esta región, los que podrían

permitir la dimerización y entonces la activación de monómeros de ACA_1413, tal como se ha reportado para las DGCs DgcA y DgcB de *C. crescentus* (Schirmer y Jenal, 2009). El contexto génico de *aca_1413* comprende dos genes predichos para codificar una DGC y una fosfolipasa D (PLD) río abajo, y genes que codifican una proteína hipotética, FliL, MotA, MotB y una proteína con un dominio GGDEF aparentemente inactivo DGC, ACA_1419 río arriba. De forma interesante, este locus está flanqueado por regiones con homología a secuencias de inserción encontradas en *A. ferrooxidans* (Valdes y cols., 2008) y por genes que codifican transposasas, sugiriendo que este locus podría transmitirse entre diferentes genomas como un módulo regulador de la motilidad. En este escenario, ACA_1412 podría actuar como efector uniendo el c-di-GMP sintetizado por ACA_1413 y reprimir la motilidad interviniendo el funcionamiento de FliL, MotA o MotB. De hecho, en *C. crescentus* la expresión de FliL es reprimida por el efector DgrA (Christen y cols., 2007), mientras que en *E. coli*, otro efector con dominio PilZ, YcgR, interactúa con MotA provocando la disminución de la velocidad de rotación del flagelo (Boehm y cols., 2010).

5. CONCLUSIONES

Al comenzar esta tesis, la evidencia de la existencia de una vía de c-di-GMP en bacterias acidófilas quimiolitotroficas se limitaba a *At. ferrooxidans* (Ruíz y cols., 2007). El presente trabajo ha permitido sugerir que esta vía de señalización está ampliamente presente en especies pertenecientes a los generos *Acidithiobacillus* (Castro y cols., 2009), abriendo espacio para esta tesis de doctorado y la tesis de post grado de Mauricio Díaz (vía d c-di-GMP en *At. thiooxidans*). Concretamente, de esta tesis es posible concluir que:

1.- Análisis bioinformáticos determinaron que *At. caldus* posee los elementos genéticos necesarios para articular una vía de señalización funcional mediante c-di-GMP (DGCs, PDEs, efectores y componentes blanco), la cual estaría regulada por el oxígeno molecular y/o potencial redox

2.- *At. caldus* es capaz de sintetizar c-di-GMP a través de al menos cinco DGCs funcionales diferentes.

3.- La DGC ACA_1413 de *At. caldus*, está relacionada con la regulación de la motilidad tipo “swarming” y, en menor medida, quizás como consecuencia de aquello, con la colonización del azufre elemental.

Esto implica que por primera vez se ha identificado un fenotipo regulado por este segundo mensajero en un miembro del género *Acidithiobacillus*, lo que prueba de forma inequívoca la funcionalidad de esta vía en este tipo de bacterias. Así, este trabajo permite avanzar hacia un nuevo nivel de profundidad en la comprensión de la vía del c-di-GMP presente en *Acidithiobacillus*, el que deberá incluir efectores y componentes blanco que conecten la producción de c-di-GMP con los fenotipos ya descritos y los que quedan por descubrir.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel S, Chien P, Wassmann P, Schirmer T, Kaefer V, Laub M T, Baker T A y Jenal U. 2011. Regulatory cohesion of cell cycle and cell differentiation through interlinked phosphorylation and second messenger networks. *Mol Cell* 43 (4):550-560.
- Acuña L G, Covarrubias P A, Cárdenas J P, Haristoy J J, Flores R, Nuñez H, Riadi G, Shmaryahu A, Valdés J, Dopson M, Rawlings D E, Banfield J F, Holmes D y Quatrini R. 2013. Genomic Architecture and Gene Repertoire of the Mobilome of Extreme Acidophile *Acidithiobacillus caldus*. PLoS One Enviado
- Agilent_Technologies. 2008. Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System.
- Aldridge P, Paul R, Goymer P, Rainey P y Jenal U. 2003. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol* 47 (6):1695-1708.
- Aloni Y, Cohen R, Benziman M y Delmer D. 1983. Solubilization of the UDP-glucose:1,4-beta-D-glucan 4-beta-D-glucosyltransferase (cellulose synthase) from *Acetobacter xylinum*. A comparison of regulatory properties with those of the membrane-bound form of the enzyme. *J Biol Chem* 258 (7):4419-4423.
- Aloni Y, Delmer D P y Benziman M. 1982. Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1,4-beta-D-glucan: activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, polyethylene glycol, and a protein factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (21):6448-6452.
- Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W y Lipman D J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (17):3389-3402.
- Allen B L, Gerlach G F y Clegg S. 1991. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 173 (2):916-920.
- Amikam D y Benziman M. 1989. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 171 (12):6649-6655.
- An S, Wu J y Zhang L H. 2010. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Appl Environ Microbiol* 76 (24):8160-8173.
- Antoniani D, Bocci P, Maciag A, Raffaelli N y Landini P. 2010. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol* 85 (4):1095-1104.
- Arora S K, Ritchings B W, Almira E C, Lory S y Ramphal R. 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* 179 (17):5574-5581.
- Ausmees N, Jonsson H, Hoglund S, Ljunggren H y Lindberg M. 1999. Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* 145 (Pt 5) 1253-1262.
- Ausmees N, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M y Lindberg M. 2001. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* 204 (1):163-167.
- Bagdigian R M y Myerson A S. 1986. The adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on coal surfaces. *Biotechnol Bioeng* 28 (4):467-479.
- Baker B J y Banfield J F. 2003. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol Ecol* 44 (2):139-152.
- Barends T R, Hartmann E, Griese J J, Beitlich T, Kirienko N V, Ryjenkov D A, Reinstein J, Shoeman R L, Gomelsky M y Schlichting I. 2009. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* 459 (7249):1015-1018.
- Barreto M, Gehrke T, Harneit K, Sand W, Jedlicki E y Holmes D. 2005a. Unexpected Insights into Biofilm Formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* Revealed by Genome Analysis and Experimental Approaches. Proc. 16th International Biohydrometallurgy Symposium, Cape Town, South Africa, eds S. Harrison, D Rawlings and J. Peterson, Compress Co 817-825.
- Barreto M, Jedlicki E y Holmes D S. 2005b. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 71 (6):2902-2909.

- Bellenberg S, Vera M y Sand W. 2011. Transcriptomic studies of capsular polysaccharide export systems involved in biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Proceedings of the 19th International Biohydrometallurgy Symposium, Changsha, China p 460-464.
- Benach J, Swaminathan S S, Tamayo R, Handelman S K, Folta-Stogniew E, Ramos J E, Forouhar F, Neely H, Seetharaman J, Camilli A y Hunt J F. 2007. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *Embo J* 26 (24):5153-5166.
- Beyhan S, Bilecen K, Salama S R, Casper-Lindley C y Yildiz F H. 2007. Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of vpsT, vpsR, and hapR. *J Bacteriol* 189 (2):388-402.
- Beyhan S, Odell L S y Yildiz F H. 2008. Identification and characterization of cyclic diguanylate signaling systems controlling rugosity in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 190 (22):7392-7405.
- Beyhan S y Yildiz F H. 2007. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. *Mol Microbiol* 63 (4):995-1007.
- Bharati B K, Sharma I M, Kasetty S, Kumar M, Mukherjee R y Chatterji D. 2012. A full-length bifunctional protein involved in c-di-GMP turnover is required for long-term survival under nutrient starvation in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 158 (Pt 6):1415-1427.
- Black F T, Freundt E A, Vinther O y Christiansen. 1979. Flagellation and swimming motility of *Thermoplasma acidophilum*. *J Bacteriol* 137 (1):456-460.
- Bobrov A G, Kirillina O, Forman S, Mack D y Perry R D. 2008. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol* 10 (6):1419-1432.
- Bobrov A G, Kirillina O y Perry R D. 2005. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol Lett* 247 (2):123-130.
- Boehm A, Kaiser M, Li H, Spangler C, Kasper C A, Ackermann M, Kaefer V, Sourjik V, Roth V y Jenal U. 2010. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* 141 (1):107-116.
- Boles B R y McCarter L L. 2002. *Vibrio parahaemolyticus* scrABC, a novel operon affecting swarming and capsular polysaccharide regulation. *J Bacteriol* 184 (21):5946-5954.
- Bomchil N, Watnick P y Kolter R. 2003. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, mbaA, involved in maintenance of biofilm architecture. *J Bacteriol* 185 (4):1384-1390.
- Boyd C D y O'Toole G A. 2012. Second Messenger Regulation of Biofilm Formation: Breakthroughs in Understanding c-di-GMP Effector Systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28 439-462.
- Bradley D E. 1980. A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* 26 (2):146-154.
- Breed A W, Dempers C J, Searby G E, Gardner M N, Rawlings D E y Hansford G S. 1999. The effect of temperature on the continuous ferrous-iron oxidation kinetics of a predominantly *Leptospirillum ferrooxidans* culture. *Biotechnol Bioeng* 65 (1):44-53.
- Brombacher E, Baratto A, Dorel C y Landini P. 2006. Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol* 188 (6):2027-2037.
- Brombacher E, Dorel C, Zehnder A J y Landini P. 2003. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 149 (Pt 10):2847-2857.
- Bryant R D, McGroarty K M, Costerton J W y Laishley E J. 1983. Isolation and characterization of a new acidophilic *Thiobacillus* species (*T. albertis*). *Canadian Journal of Microbiology* 29 (9):1159-1170.
- Cao Z, Livoti E, Losi A y Gartner W. 2010. A blue light-inducible phosphodiesterase activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Photochem Photobiol* 86 (3):606-611.
- Castro M, Rufz L M, Barriga A, Jerez C A, Holmes D y Guillian N. 2009. c-di-GMP Pathway in Biomining Bacteria. *Adv Mat Res* 71-73 223-226.
- Claret L, Miquel S, Vieille N, Ryjenkov D A, Gomelsky M y Darfeuille-Michaud A. 2007. The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* 282 (46):33275-33283.
- Clark D A y Norris P R. 1996. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen. nov., sp. nov. : mixed-culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species]. *Microbiology* 142 785-790.

- Coram N J y Rawlings D E. 2002. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. *Appl Environ Microbiol* 68 (2):838-845.
- Chan C, Paul R, Samoray D, Amiot N C, Giese B, Jenal U y Schirmer T. 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (49):17084-17089.
- Chang A L, Tuckerman J R, Gonzalez G, Mayer R, Weinhouse H, Volman G, Amikam D, Benziman M y Gilles-Gonzalez M A. 2001. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* 40 (12):3420-3426.
- Chen L, Lin J, Li B, Lin J y Liu X. 2010. Method development for electrotransformation of *Acidithiobacillus caldus*. *J Microbiol Biotechnol* 20 (1):39-44.
- Chen L, Ren Y, Lin J, Liu X, Pang X y Lin J. 2012. *Acidithiobacillus caldus* Sulfur Oxidation Model Based on Transcriptome Analysis between the Wild Type and Sulfur Oxygenase Reductase Defective Mutant. *PLoS One* 7 (9):e39470.
- Chin K H, Lee Y C, Tu Z L, Chen C H, Tseng Y H, Yang J M, Ryan R P, McCarthy Y, Dow J M, Wang A H y Chou S H. 2010. The cAMP receptor-like protein CLP is a novel c-di-GMP receptor linking cell-cell signaling to virulence gene expression in *Xanthomonas campestris*. *J Mol Biol* 396 (3):646-662.
- Cho H Y, Cho H J, Kim Y M, Oh J I y Kang B S. 2009. Structural insight into the heme-based redox sensing by DosS from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 284 (19):13057-13067.
- Choy W K, Zhou L, Syn C K, Zhang L H y Swarup S. 2004. MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* 186 (21):7221-7228.
- Christen B, Christen M, Paul R, Schmid F, Folcher M, Jenoe P, Meuwly M y Jenal U. 2006. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem* 281 (42):32015-32024.
- Christen M, Christen B, Allan M G, Folcher M, Jenoe P, Grzesiek S y Jenal U. 2007. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (10):4112-4117.
- Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A y Jenal U. 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* 280 (35):30829-30837.
- Chung I Y, Choi K B, Heo Y J y Cho Y H. 2008. Effect of PEL exopolysaccharide on the wspF mutant phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Microbiol Biotechnol* 18 (7):1227-1234.
- D'Argenio D A, Calfee M W, Rainey P B y Pesci E C. 2002. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* 184 (23):6481-6489.
- Darland G, Brock T D, Samsonoff W y Conti S F. 1970. A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* 170 (3965):1416-1418.
- De N, Navarro M V, Raghavan R V y Sonderrmann H. 2009. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol* 393 (3):619-633.
- De N, Pirruccello M, Krasteva P V, Bae N, Raghavan R V y Sonderrmann H. 2008. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. *PLoS Biol* 6 (3):e67.
- Decho A W, Frey R L y Ferry J L. 2011. Chemical challenges to bacterial AHL signaling in the environment. *Chem Rev* 111 (1):86-99.
- DePamphilis M L y Adler J. 1971. Fine structure and isolation of the hook-basal body complex of flagella from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 105 (1):384-395.
- Dfiaz M. 2012. Estudio funcional de la vía del segundo mensajero c-di-GMP de *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 9463. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. Escuela de postgrado, facultad de ciencias, Universidad de Chile.
- Dispirito A A, Dugan P R y Tuovinen O H. 1983. Sorption of *Thiobacillus ferrooxidans* to particulate material. *Biotechnol Bioeng* 25 (4):1163-1168.
- Dopson M, Baker-Austin C, Hind A, Bowman J P y Bond P L. 2004. Characterization of *Ferroplasma* isolates and *Ferroplasma acidarmanus* sp. nov., extreme acidophiles from acid mine drainage and industrial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol* 70 (4):2079-2088.
- Dopson M y Lindstrom E B. 2004. Analysis of community composition during moderately thermophilic bioleaching of pyrite, arsenical pyrite, and chalcopyrite. *Microb Ecol* 48 (1):19-28.
- Dopson M y Lindstrom E B. 1999. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Appl Environ Microbiol* 65 (1):36-40.

- Drenkard E y Ausubel F M. 2002. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416 (6882):740-743.
- Dubey G P y Ben-Yehuda S. 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* 144 (4):590-600.
- Duerig A, Abel S, Folcher M, Nicollier M, Schwede T, Amiot N, Giese B y Jenal U. 2009. Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression. *Genes Dev* 23 (1):93-104.
- Dufresne S, Bousquet J, Boissinot M y Guay R. 1996. *Sulfobacillus disulfidooxidans* sp. nov., a new acidophilic, disulfide-oxidizing, gram-positive, spore-forming bacterium. *Int J Syst Bacteriol* 46 (4):1056-1064.
- Edwards K J, Bond P L y Banfield J F. 2000. Characteristics of attachment and growth of *Thiobacillus caldus* on sulphide minerals: a chemotactic response to sulphur minerals? *Environ Microbiol* 2 (3):324-332.
- Edwards K J y Rutenberg A D. 2001. Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chemical Geology* 180 (1-4):19-32.
- Fang X y Gomelsky M. 2010. A post-translational, c-di-GMP-dependent mechanism regulating flagellar motility. *Mol Microbiol* 76 (5):1295-1305.
- Farah C, Vera M, Morin D, Haras D, Jerez C A y Guillani N. 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 71 (11):7033-7040.
- Fazli M, O'Connell A, Nilsson M, Niehaus K, Dow J M, Givskov M, Ryan R P y Tolker-Nielsen T. 2011. The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol Microbiol* 82 (2):327-341.
- Ferreira R B, Antunes L C, Greenberg E P y McCarter L L. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *J Bacteriol* 190 (3):851-860.
- Ferreira R B, Chodur D M, Antunes L C, Trimble M J y McCarter L L. 2011. Output targets and transcriptional regulation by a cyclic dimeric GMP-responsive circuit in the *Vibrio parahaemolyticus* Scr network. *J Bacteriol* 194 (5):914-924.
- Finn R D, Clements J y Eddy S R. 2011. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* 39 (Web Server issue):W29-37.
- Franklin M J, Nivens D E, Weadge J T y Howell P L. 2011. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol* 2 167.
- Freedman J C, Rogers E A, Kostick J L, Zhang H, Iyer R, Schwartz I y Marconi R T. 2010. Identification and molecular characterization of a cyclic-di-GMP effector protein, PlzA (BB0733): additional evidence for the existence of a functional cyclic-di-GMP regulatory network in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 58 (2):285-294.
- Friedman L y Kolter R. 2004a. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Mol Microbiol* 51 (3):675-690.
- Friedman L y Kolter R. 2004b. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* 186 (14):4457-4465.
- Fuchs T, Huber G, Teiner K, Burggraf S y Stetter K O. 1995. *Metallosphaera prunae*, sp. nov., a Novel Metal-mobilizing, Thermoacidophilic Archaeum, Isolated from a Uranium Mine in Germany. *Systematic and Applied Microbiology* 18 (4):560-566.
- Galperin M Y, Natale D A, Aravind L y Koonin E V. 1999. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1 (2):303-305.
- Galperin M Y, Nikolskaya A N y Koonin E V. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol Lett* 203 (1):11-21.
- García B, Latasa C, Solano C, Garcia-del Portillo F, Gamazo C y Lasa I. 2004. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* 54 (1):264-277.
- García Jr O, Tuovinen O H y Bigham J M. 1995. Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology* 41 (6):508-514.
- Gehrke T, Hallmann R, Kinzler K y Sand W. 2001. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*-a model for structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water Sci Technol* 43 (6):159-167.
- Gehrke T, Telegdi J, Thierry D y Sand W. 1998. Importance of Extracellular Polymeric Substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for Bioleaching. *Appl Environ Microbiol* 64 (7):2743-2747.

- Gjermansen M, Ragas P, Sternberg C, Molin S y Tolker-Nielsen T. 2005. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environ Microbiol* 7 (6):894-906.
- Goebel B M y Stackebrandt E. 1994. Cultural and phylogenetic analysis of mixed microbial populations found in natural and commercial bioleaching environments. *Appl Environ Microbiol* 60 (5):1614-1621.
- Golovacheva R S. 1979. Attachment of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* cells to the surface of sulfide minerals]. *Mikrobiologija* 48 (3):528-533.
- Goltsman D S, Denev V J, Singer S W, VerBerkmoes N C, Lefsrud M, Mueller R S, Dick G J, Sun C L, Wheeler K E, Zemla A, Baker B J, Hauser L, Land M, Shah M B, Thelen M P, Hettich R L y Banfield J F. 2009. Community genomic and proteomic analyses of chemoautotrophic iron-oxidizing "*Leptospirillum rubrum*" (Group II) and "*Leptospirillum ferrodiazotrophum*" (Group III) bacteria in acid mine drainage biofilms. *Appl Environ Microbiol* 75 (13):4599-4615.
- Golyshina O V, Pivovarova T A, Karavaiko G I, Kondrateva T F, Moore E R, Abraham W R, Lunsdorf H, Timmis K N, Yakimov M M y Golyshin P N. 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 3 997-1006.
- González D M, Lara R H, Alvarado K N, Valdez-Perez D, Navarro-Contreras H R, Cruz R y Garcia-Meza J V. 2012. Evolution of biofilms during the colonization process of pyrite by *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Appl Microbiol Biotechnol* 93 (2):763-775.
- Gorby Y A, Yanina S, McLean J S, Rosso K M, Moyles D, Dohnalkova A, Beveridge T J, Chang I S, Kim B H, Kim K S, Culley D E, Reed S B, Romine M F, Saffarini D A, Hill E A, Shi L, Elias D A, Kennedy D W, Pinchuk G, Watanabe K, Ishii S, Logan B, Neelson K H y Fredrickson J K. 2006. Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (30):11358-11363.
- Gormely L S y Duncan D W. 1974. Estimation of *Thiobacillus ferrooxidans* concentrations. *Canadian Journal of Microbiology* 20 (10):1453-1455.
- Gouet P, Courcelle E, Stuart D I y Metz F. 1999. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15 (4):305-308.
- Grogan D W. 1989. Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J Bacteriol* 171 (12):6710-6719.
- Gronewold T M y Kaiser D. 2001. The act operon controls the level and time of C-signal production for *Myxococcus xanthus* development. *Mol Microbiol* 40 (3):744-756.
- Gualdi L, Tagliabue L, Bertagnoli S, Ierano T, De Castro C y Landini P. 2008. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. *Microbiology* 154 (Pt 7):2017-2024.
- Guilliani N, Bengrine A, Borne F, Chippaux M y Bonnefoy V. 1997. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* 143 (Pt 7) 2179-2187.
- Guzman L M, Belin D, Carson M J y Beckwith J. 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177 (14):4121-4130.
- Habazettl J, Allan M G, Jenal U y Grzesiek S. 2011. Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *J Biol Chem* 286 (16):14304-14314.
- Hallberg K B, Dopson M y Lindstrom E B. 1996a. Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J Bacteriol* 178 (1):6-11.
- Hallberg K B, Dopson M y Lindström E B. 1996b. Arsenic toxicity is not due to a direct effect on the oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by *Thiobacillus caldus*. *FEMS Microbiology Letters* 145 (3):409-414.
- Hallberg K B, Gonzalez-Toril E y Johnson D B. 2010. *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.; facultatively anaerobic, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles* 14 (1):9-19.
- Hallberg K B y Lindstrom E B. 1994. Characterization of *Thiobacillus caldus* sp. nov., a moderately thermophilic acidophile. *Microbiology* 140 (Pt 12) 3451-3456.

- Hallberg K B, Thomson H E C, Boeselt I y Johnson D B. 2001. Aerobic and anaerobic sulfur metabolism by acidophilic bacteria. *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development* 423-431.
- Harneit K, Göksel A, Kock D, Klock J H, Gehrke T y Sand W. 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83 (1-4):245-254.
- He M, Ouyang Z, Troxell B, Xu H, Moh A, Piesman J, Norgard M V, Gomelsky M y Yang X F. 2011. Cyclic di-GMP is essential for the survival of the Lyme disease spirochete in ticks. *PLoS Pathog* 7 (6):e1002133.
- He Y W, Boon C, Zhou L y Zhang L H. 2009. Co-regulation of *Xanthomonas campestris* virulence by quorum sensing and a novel two-component regulatory system RavS/RavR. *Mol Microbiol* 71 (6):1464-1476.
- Hecht G B y Newton A. 1995. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* 177 (21):6223-6229.
- Hedrich S y Johnson D B. 2013. *Acidithiobacillus ferridurans*, sp. nov.; an acidophilic iron-, sulfur- and hydrogen-metabolizing chemolithotrophic Gammaproteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*
- Hengge R. 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7 (4):263-273.
- Henrichsen J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36 (4):478-503.
- Hickman J W y Harwood C S. 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* 69 (2):376-389.
- Hickman J W, Tifrea D F y Harwood C S. 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (40):14422-14427.
- Hinsa S M, Espinosa-Urgel M, Ramos J L y O'Toole G A. 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 49 (4):905-918.
- Hinsa S M y O'Toole G A. 2006. Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: a role for LapD. *Microbiology* 152 (Pt 5):1375-1383.
- Hippe H. 2000. *Leptospirillum* gen. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev., including *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. (ex Markosyan 1972), nom. rev. and *Leptospirillum thermoferrooxidans* sp. nov. (Golovacheva et al. 1992). *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 2 501-503.
- Hisert K B, MacCoss M, Shiloh M U, Darwin K H, Singh S, Jones R A, Ehrt S, Zhang Z, Gaffney B L, Gandotra S, Holden D W, Murray D y Nathan C. 2005. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* 56 (5):1234-1245.
- Hobley L, Fung R K, Lambert C, Harris M A, Dabhi J M, King S S, Basford S M, Uchida K, Till R, Ahmad R, Aizawa S, Gomelsky M y Sockett R E. 2012. Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathog* 8 (2):e1002493.
- Hoffman L R, D'Argenio D A, MacCoss M J, Zhang Z, Jones R A y Miller S I. 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436 (7054):1171-1175.
- Howland J. 1998. Extremophiles — Microbial life in extreme environments: Edited by K Horikoshi and W D Grant. pp. 322. Wiley-Liss, New York. 1998. ISBN 0-471-02618-2. *Biochemical Education* 26 (4):331-331.
- Huang B, Whitchurch C B y Mattick J S. 2003. FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185 (24):7068-7076.
- Huber B, Riedel K, Kothe M, Givskov M, Molin S y Eberl L. 2002. Genetic analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111. *Mol Microbiol* 46 (2):411-426.
- Huber G, Spinnler C, Gambacorta A y Stetter K O. 1989. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. Represents a New Genus of Aerobic, Metal-Mobilizing, Thermoacidophilic Archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 12 (1):38-47.
- Huber G y Stetter K O. 1991. *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a Novel Strictly Chemolithoautotrophic Thermophilic Archaeal Species of Metal-Mobilizers. *Systematic and Applied Microbiology* 14 (4):372-378.
- Huitema E, Pritchard S, Matteson D, Radhakrishnan S K y Viollier P H. 2006. Bacterial birth scar proteins mark future flagellum assembly site. *Cell* 124 (5):1025-1037.
- Hull T D, Ryu M H, Sullivan M J, Johnson R C, Klena N T, Geiger R M, Gomelsky M y Bennett J A. 2012. Cyclic Di-GMP phosphodiesterases RmdA and RmdB are involved in regulating colony morphology and development in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* 194 (17):4642-4651.

- Ishii S, Kosaka T, Hori K, Hotta Y y Watanabe K. 2005. Coaggregation facilitates interspecies hydrogen transfer between *Pelotomaculum thermopropionicum* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Appl Environ Microbiol* 71 (12):7838-7845.
- Jin S M, Yan W M y Wang Z N. 1992. Transfer of IncP Plasmids to Extremely Acidophilic *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 58 (1):429-430.
- Johnson D B, Bacelar-Nicolau P, Okibe N, Thomas A y Hallberg K B. 2009. *Ferrimicrobium acidiphilum* gen. nov., sp. nov. and *Ferrithrix thermotolerans* gen. nov., sp. nov.: heterotrophic, iron-oxidizing, extremely acidophilic actinobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59 (Pt 5):1082-1089.
- Johnson M R, Montero C I, Conners S B, Shockley K R, Bridger S L y Kelly R M. 2005. Population density-dependent regulation of exopolysaccharide formation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Molecular Microbiology* 55 (3):664-674.
- Jones H A, Lillard J W, Jr. y Perry R D. 1999. HmsT, a protein essential for expression of the haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis*. *Microbiology* 145 (Pt 8) 2117-2128.
- Joys T M. 1968. The structure of flagella and the genetic control of flagellation in Eubacteriales. A review. *Antonie Van Leeuwenhoek* 34 (2):205-225.
- Kader A, Simm R, Gerstel U, Morr M y Romling U. 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. *Mol Microbiol* 60 (3):602-616.
- Kaiser D. 2007. Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr Biol* 17 (14):R561-570.
- Kazmierczak B I, Lebron M B y Murray T S. 2006. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 60 (4):1026-1043.
- Kelly D P y Wood A P. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 2 511-516.
- Kimura S, Chen H P, Saxena I M, Brown R M, Jr. y Itoh T. 2001. Localization of c-di-GMP-binding protein with the linear terminal complexes of *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 183 (19):5668-5674.
- Kinzler K, Gehrke T, Telegdi J y Sand W. 2003. Bioleaching - a result of interfacial processes caused by extracellular polymeric substances (EPS). *Hydrometallurgy* 71 (1-2):83-88.
- Kirillina O, Fetherston J D, Bobrov A G, Abney J y Perry R D. 2004. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* 54 (1):75-88.
- Kitanishi K, Kobayashi K, Kawamura Y, Ishigami I, Ogura T, Nakajima K, Igarashi J, Tanaka A y Shimizu T. 2010. Important roles of Tyr43 at the putative heme distal side in the oxygen recognition and stability of the Fe(II)-O₂ complex of YddV, a globin-coupled heme-based oxygen sensor diguanylate cyclase. *Biochemistry* 49 (49):10381-10393.
- Ko J, Ryu K S, Kim H, Shin J S, Lee J O, Cheong C y Choi B S. 2010. Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by PilZ domain proteins. *J Mol Biol* 398 (1):97-110.
- Ko M y Park C. 2000. Two novel flagellar components and H-NS are involved in the motor function of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 303 (3):371-382.
- Kotze A A, Tuffin I M, Deane S M y Rawlings D E. 2006. Cloning and characterization of the chromosomal arsenic resistance genes from *Acidithiobacillus caldus* and enhanced arsenic resistance on conjugal transfer of ars genes located on transposon TnAtcArs. *Microbiology* 152 (Pt 12):3551-3560.
- Krasteva P V, Fong J C, Shikuma N J, Beyhan S, Navarro M V, Yildiz F H y Sondermann H. 2010. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science* 327 (5967):866-868.
- Kuchma S L, Connolly J P y O'Toole G A. 2005. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187 (4):1441-1454.
- Kulshina N, Baird N J y Ferre-D'Amare A R. 2009. Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* 16 (12):1212-1217.
- Kumagai Y, Matsuo J, Cheng Z, Hayakawa Y y Rikihisa Y. 2011. Cyclic dimeric GMP signaling regulates intracellular aggregation, sessility, and growth of *Ehrlichia chaffeensis*. *Infect Immun* 79 (10):3905-3912.
- Kumar A, Toledo J C, Patel R P, Lancaster J R, Jr. y Steyn A J. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (28):11568-11573.

- Kumar M y Chatterji D. 2008. Cyclic di-GMP: a second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 154 (Pt 10):2942-2955.
- Kusano T, Sugawara K, Inoue C, Takeshima T, Numata M y Shiratori T. 1992. Electrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a mer determinant. *J Bacteriol* 174 (20):6617-6623.
- Labbate M, Zhu H, Thung L, Bandara R, Larsen M R, Willcox M D, Givskov M, Rice S A y Kjelleberg S. 2007. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol* 189 (7):2702-2711.
- Lai T H, Kumagai Y, Hyodo M, Hayakawa Y y Rikihisa Y. 2009. The Anaplasma phagocytophilum PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. *J Bacteriol* 191 (3):693-700.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J y Higgins D G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21):2947-2948.
- Larsen S H, Reader R W, Kort E N, Tso W W y Adler J. 1974. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *Escherichia coli*. *Nature* 249 (452):74-77.
- Leduc J L y Roberts G P. 2009. Cyclic di-GMP allosterically inhibits the CRP-like protein (Clp) of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *J Bacteriol* 191 (22):7121-7122.
- Lee E R, Baker J L, Weinberg Z, Sudarsan N y Breaker R R. 2010. An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. *Science* 329 (5993):845-848.
- Lee V T, Matewish J M, Kessler J L, Hyodo M, Hayakawa Y y Lory S. 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* 65 (6):1474-1484.
- Li W y He Z G. 2012. LtmA, a novel cyclic di-GMP-responsive activator, broadly regulates the expression of lipid transport and metabolism genes in *Mycobacterium smegmatis*. *Nucleic Acids Res*
- Li Y Q, Wan D S, Huang S S, Leng F F, Yan L, Ni Y Q y Li H Y. 2009. Type IV pili of *Acidithiobacillus ferrooxidans* are necessary for sliding, twitching motility, and adherence. *Curr Microbiol* 60 (1):17-24.
- Lim B, Beyhan S, Meir J y Yildiz F H. 2006. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol Microbiol* 60 (2):331-348.
- Lim B, Beyhan S y Yildiz F H. 2007. Regulation of *Vibrio* polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 189 (3):717-729.
- Lin F C, Brown R M, Jr., Drake R R, Jr. y Haley B E. 1990. Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-Glc. *J Biol Chem* 265 (9):4782-4784.
- Liu X, Lin J, Zhang Z, Bian J, Zhao Q, Liu Y, Lin J y Yan W. 2007. Construction of conjugative gene transfer system between *E. coli* and moderately thermophilic, extremely acidophilic *Acidithiobacillus caldus* MTH-04. *J Microbiol Biotechnol* 17 (1):162-167.
- Liu Z, Borne F, Ratouchniak J y Bonnefoy V. 2001. Genetic transfer of IncP, IncQ and IncW plasmids to four *Thiobacillus ferrooxidans* strains by conjugation. *Hydrometallurgy* 59 (2&3):339-345.
- Liu Z, Guilliani N, Appia-Ayme C, Borne F, Ratouchniak J y Bonnefoy V. 2000. Construction and characterization of a recA mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J Bacteriol* 182 (8):2269-2276.
- López D, Vlamakis H y Kolter R. 2010. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (7):a000398.
- Lovering A L, Capeness M J, Lambert C, Hobley L y Sockett R E. 2011. The structure of an unconventional HD-GYP protein from *Bdellovibrio* reveals the roles of conserved residues in this class of cyclic-di-GMP phosphodiesterases. *MBio* 2 (5):
- Macelroy R. 1974. Some comments on the evolution of extremophiles. *Biosystems* 6 (1):74-75.
- Mackintosh M E. 1978. Nitrogen Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology* 105 (2):215-218.
- Malone J G, Williams R, Christen M, Jenal U, Spiers A J y Rainey P B. 2007. The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology* 153 (Pt 4):980-994.
- Mangold S, Laxander M, Harneit K, Rohwerder T, Claus G n y Sand W. 2008. Visualization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* biofilms on pyrite by atomic force and epifluorescence microscopy under various experimental conditions. *Hydrometallurgy* 94 (1-4):127-132.
- Mangold S, Valdes J, Holmes D S y Dopson M. 2011. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Front Microbiol* 2 17.

- Marketon M M, Glenn S A, Eberhard A y Gonzalez J E. 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **185** (1):325-331.
- Marsh R M y Norris P R. 1983. The isolation of some thermophilic, autotrophic, iron- and sulphur-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **17** (1-3):311-315.
- Martinez-Wilson H F, Tamayo R, Tischler A D, Lazinski D W y Camilli A. 2008. The *vibrio cholerae* hybrid sensor kinase VieS contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *J Bacteriol* **190** (19):6439-6447.
- May T y Okabe S. 2008. *Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and Curli. *J Bacteriol* **190** (22):7479-7490.
- Mayer R, Ross P, Weinhouse H, Amikam D, Volman G, Ohana P, Calhoon R D, Wong H C, Emerick A W y Benziman M. 1991. Polypeptide composition of bacterial cyclic diguanylic acid-dependent cellulose synthase and the occurrence of immunologically crossreacting proteins in higher plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (12):5472-5476.
- McGoran C J, Duncan D W y Walden C C. 1969. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on various substrates. *Can J Microbiol* **15** (1):135-138.
- Mendez-Ortiz M M, Hyodo M, Hayakawa Y y Membrillo-Hernandez J. 2006. Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid. *J Biol Chem* **281** (12):8090-8099.
- Merighi M, Lee V T, Hyodo M, Hayakawa Y y Lory S. 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **65** (4):876-895.
- Merkel T J, Barros C y Stibitz S. 1998. Characterization of the *bvgR* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **180** (7):1682-1690.
- Merritt J H, Ha D G, Cowles K N, Lu W, Morales D K, Rabinowitz J, Gitai Z y O'Toole G A. 2010. Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases. *MBio* **1** (4):
- Minasov G, Padavattan S, Shuvalova L, Brunzelle J S, Miller D J, Basle A, Massa C, Collart F R, Schirmer T y Anderson W F. 2009. Crystal structures of YkuI and its complex with second messenger cyclic Di-GMP suggest catalytic mechanism of phosphodiester bond cleavage by EAL domains. *J Biol Chem* **284** (19):13174-13184.
- Mohsin S, Yang Y y Zumwalt M. 2007. Quantitative analysis of opiates in urine using RRHT LC/MS/MS. Application Agilent Technologies
- Monds R D, Newell P D, Gross R H y O'Toole G A. 2007. Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol* **63** (3):656-679.
- Mueller R S, Deneff V J, Kalnejais L H, Suttle K B, Thomas B C, Wilmes P, Smith R L, Nordstrom D K, McCleskey R B, Shah M B, Verberkmoes N C, Hettich R L y Banfield J F. 2010. Ecological distribution and population physiology defined by proteomics in a natural microbial community. *Mol Syst Biol* **6** 374.
- Nakayama S, Kelsey I, Wang J, Roelofs K, Stefane B, Luo Y, Lee V T y Sintim H O. 2011. Thiazole orange-induced c-di-GMP quadruplex formation facilitates a simple fluorescent detection of this ubiquitous biofilm regulating molecule. *J Am Chem Soc* **133** (13):4856-4864.
- Navarro M V, De N, Bae N, Wang Q y Sondermann H. 2009. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. *Structure* **17** (8):1104-1116.
- Navarro M V, Newell P D, Krasteva P V, Chatterjee D, Madden D R, O'Toole G A y Sondermann H. 2011. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biol* **9** (2):e1000588.
- Newell P D, Boyd C D, Sondermann H y O'Toole G A. 2011a. A c-di-GMP effector system controls cell adhesion by inside-out signaling and surface protein cleavage. *PLoS Biol* **9** (2):e1000587.
- Newell P D, Monds R D y O'Toole G A. 2009. LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (9):3461-3466.
- Newell P D, Yoshioka S, Hvorecny K L, Monds R D y O'Toole G A. 2011b. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J Bacteriol* **193** (18):4685-4698.

- Norris P, Colin Murrell J y Hinson D. 1995. The potential for diazotrophy in iron-and sulfur-oxidizing acidophilic bacteria. *Archives of Microbiology* 164 (4):294-300.
- Norris P R, Clark D A, Owen J P y Waterhouse S. 1996. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology* 142 (Pt 4) 775-783.
- O'Shea T M, Klein A H, Geszvain K, Wolfe A J y Visick K L. 2006. Diguanylate cyclases control magnesium-dependent motility of *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* 188 (23):8196-8205.
- O'Toole G A y Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30 (2):295-304.
- Oglesby L L, Jain S y Ohman D E. 2008. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology* 154 (Pt 6):1605-1615.
- Ohmura N, Sasaki K, Matsumoto N y Saiki H. 2002. Anaerobic respiration using Fe(3+), S(0), and H(2) in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 184 (8):2081-2087.
- Okibe N, Gericke M, Hallberg K B y Johnson D B. 2003. Enumeration and characterization of acidophilic microorganisms isolated from a pilot plant stirred-tank bioleaching operation. *Appl Environ Microbiol* 69 (4):1936-1943.
- Okibe N y Johnson D B. 2004. Biooxidation of pyrite by defined mixed cultures of moderately thermophilic acidophiles in pH-controlled bioreactors: significance of microbial interactions. *Biotechnol Bioeng* 87 (5):574-583.
- Parro V y Moreno-Paz M. 2003. Gene function analysis in environmental isolates: the *nif* regulon of the strict iron oxidizing bacterium *Leptospirillum ferrooxidans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (13):7883-7888.
- Parro V y Moreno-Paz M. 2004. Nitrogen fixation in acidophile iron-oxidizing bacteria: the *nif* regulon of *Leptospirillum ferrooxidans*. *Res Microbiol* 155 (9):703-709.
- Paul K, Nieto V, Carlquist W C, Blair D F y Harshey R M. 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "backstop brake" mechanism. *Mol Cell* 38 (1):128-139.
- Paul R, Jaeger T, Abel S, Wiederkehr I, Folcher M, Biondi E G, Laub M T y Jenal U. 2008. Allosteric regulation of histidine kinases by their cognate response regulator determines cell fate. *Cell* 133 (3):452-461.
- Paul R, Weiser S, Amiot N C, Chan C, Schirmer T, Giese B y Jenal U. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev* 18 (6):715-727.
- Peng J B, Yan W M y Bao X Z. 1994. Expression of Heterogenous Arsenic Resistance Genes in the Obligately Autotrophic Biomining Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 60 (7):2653-2656.
- Pesavento C, Becker G, Sommerfeldt N, Possling A, Tschowri N, Mehlis A y Hengge R. 2008. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 22 (17):2434-2446.
- Pitzer J E, Sultan S Z, Hayakawa Y, Hobbs G, Miller M R y Motaleb M A. 2011. Analysis of the *Borrelia burgdorferi* cyclic-di-GMP-binding protein PlzA reveals a role in motility and virulence. *Infect Immun* 79 (5):1815-1825.
- Pogliani C y Donati E. 1999. The role of exopolymers in the bioleaching of a non-ferrous metal sulphide. *J Ind Microbiol* 22 (2):88-92.
- Porter K y Feig Y. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microfloral. *Limnol. Oceanogr* 25 (5):943-948.
- Povolotsky T L y Hengge R. 2012. 'Life-style' control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second messenger c-di-GMP. *J Biotechnol* 160 (1-2):10-16.
- Pratt J T, Tamayo R, Tischler A D y Camilli A. 2007. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 282 (17):12860-12870.
- Qi Y, Chuah M L, Dong X, Xie K, Luo Z, Tang K y Liang Z X. 2011. Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change. *J Biol Chem* 286 (4):2910-2917.
- Qi Y, Rao F, Luo Z y Liang Z X. 2009. A flavin cofactor-binding PAS domain regulates c-di-GMP synthesis in AxDGC2 from *Acetobacter xylinum*. *Biochemistry* 48 (43):10275-10285.

- Rao F, Yang Y, Qi Y y Liang Z X. 2008. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190 (10):3622-3631.
- Raphael B H, Pereira S, Flom G A, Zhang Q, Ketley J M y Konkel M E. 2005. The *Campylobacter jejuni* response regulator, CbrR, modulates sodium deoxycholate resistance and chicken colonization. *J Bacteriol* 187 (11):3662-3670.
- Rashid M H, Rajanna C, Ali A y Karaolis D K. 2003. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett* 227 (1):113-119.
- Rauprich O, Matsushita M, Weijer C J, Siegert F, Esipov S E y Shapiro J A. 1996. Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J Bacteriol* 178 (22):6525-6538.
- Rawlings D E. 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb Cell Fact* 4 (1):13.
- Rawlings D E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* 56 65-91.
- Rawlings D E, Tributsch H y Hansford G S. 1999. Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* 145 (Pt 1) 5-13.
- Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Hoiby N, Givskov M, Molin S y Eberl L. 2001. N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147 (Pt 12):3249-3262.
- Rodríguez Y, Ballester A, Blázquez M L, González F y Muñoz J A. 2003. Study of Bacterial Attachment During the Bioleaching of Pyrite, Chalcopyrite, and Sphalerite. *Geomicrobiol J* 20 (2):131-141.
- 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 (3):239-248.
- Rohwerder T y Sand W. 2007. Oxidation of Inorganic Sulfur Compounds in Acidophilic Prokaryotes. *Engineering in Life Sciences* 7 (4):301-309.
- Romling U, Bian Z, Hammar M, Sierralta W D y Normark S. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* 180 (3):722-731.
- Romling U, Rohde M, Olsen A, Normark S y Reinkoster J. 2000. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* 36 (1):10-23.
- Ross P, Aloni Y, Weinhouse C, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Meyer R y Benziman M. 1985. An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett* 186 (2):191-196.
- Ross P, Aloni Y, Weinhouse H, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R y Benziman M. 1986. Control of cellulose synthesis *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. *Carbohydrate Research* 149 (1):101-117.
- Ross P, Mayer R y Benziman M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev* 55 (1):35-58.
- Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, Michaeli D, Weinberger-Ohana P, Mayer R, Braun S, de Vroom E, van der Marel G A, van Boom J H y Benziman M. 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325 (6101):279-281.
- Ruiz L M, Castro M, Barriga A, Jerez C A y Guilliani N. 2012. The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals. *Lett Appl Microbiol* 54 (2):133-139.
- Ruiz L M, Sand W, Jerez C A y Guilliani N. 2007. c-di-GMP Pathway in *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Analysis of Putative Diguanylate Cyclases (DGCs) and Phosphodiesterases (PDEs) Bifunctional Proteins. *Advanced Materials Research* 20-21 551-555.
- Ruiz L M, Valenzuela S, Castro M, Gonzalez A, Frezza M, Soulère L, Rohwerder T, Queneau Y, Doutheau A, Sand W, Jerez C A y Guilliani N. 2008. AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* 94 (1-4):133-137.
- Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream M A y Barrell B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16 (10):944-945.

- Ryan R P, Fouhy Y, Lucey J F, Crossman L C, Spiro S, He Y W, Zhang L H, Heeb S, Camara M, Williams P y Dow J M. 2006. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (17):6712-6717.
- Ryan R P, Lucey J, O'Donovan K, McCarthy Y, Yang L, Tolker-Nielsen T y Dow J M. 2009. HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 11 (5):1126-1136.
- Ryan R P, McCarthy Y, Kiely P A, O'Connor R, Farah C S, Armitage J P y Dow J M. 2012. Dynamic complex formation between HD-GYP, GGDEF and PilZ domain proteins regulates motility in *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* 86 (3):557-567.
- Ryjenkov D A, Simm R, Romling U y Gomelsky M. 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* 281 (41):30310-30314.
- Ryjenkov D A, Tarutina M, Moskvina O V y Gomelsky M. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* 187 (5):1792-1798.
- Sand W y Gerke T. 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Res Microbiol* 157 (1):49-56.
- Sauer K, Camper A K, Ehrlich G D, Costerton J W y Davies D G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184 (4):1140-1154.
- Saxena I M, Kudlicka K, Okuda K y Brown R M, Jr. 1994. Characterization of genes in the cellulose-synthesizing operon (acs operon) of *Acetobacter xylinum*: implications for cellulose crystallization. *J Bacteriol* 176 (18):5735-5752.
- Saxena I M, Lin F C y Brown R M, Jr. 1990. Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol Biol* 15 (5):673-683.
- Saxena I M, Lin F C y Brown R M, Jr. 1991. Identification of a new gene in an operon for cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol Biol* 16 (6):947-954.
- Schaeffer W I, Holbert P E y Umbreit W W. 1963. Attachment of *Thiobacillus thiooxidans* to sulfur crystals. *J Bacteriol* 85 137-140.
- Schippers A, Jozsa P y Sand W. 1996. Sulfur chemistry in bacterial leaching of pyrite. *Appl Environ Microbiol* 62 (9):3424-3431.
- Schippers A y Sand W. 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl Environ Microbiol* 65 (1):319-321.
- Schirmer T y Jenal U. 2009. Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* 7 (10):724-735.
- Schmidt A J, Ryjenkov D A y Gomelsky M. 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* 187 (14):4774-4781.
- Schrenk M O, Edwards K J, Goodman R M, Hamers R J y Banfield J F. 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: Implications for Generation of Acid Mine Drainage. *Science* 279 (5356):1519-1522.
- Seegerer A, Neuner A, Kristjansson J K y Stetter K O. 1986. *Acidianus infernus* gen. nov., sp. nov., and *Acidianus brierleyi* Comb. nov.: Facultatively Aerobic, Extremely Acidophilic Thermophilic Sulfur-Metabolizing Archaeobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36 (4):559-564.
- Semenza M, Viera M, Curutchet G y Donati E. 2002. The role of *Acidithiobacillus caldus* in the bioleaching of metal sulfides. *Latin American applied research* 32 303-306.
- Semmler A B, Whitchurch C B y Mattick J S. 1999. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145 (Pt 10) 2863-2873.
- Seshasayee A S, Fraser G M y Luscombe N M. 2010. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res* 38 (18):5970-5981.
- Silverman M y Simon M. 1974. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* 249 (452):73-74.
- Simm R, Lusch A, Kader A, Andersson M y Romling U. 2007. Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 189 (9):3613-3623.
- Simm R, Morr M, Kader A, Nitz M y Romling U. 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53 (4):1123-1134.

- Simm R, Remminghorst U, Ahmad I, Zakikhany K y Romling U. 2009. A role for the EAL-like protein STM1344 in regulation of CsgD expression and motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* 191 (12):3928-3937.
- Singer P C y Stumm W. 1970. Acidic mine drainage: the rate-determining step. *Science* 167 (3921):1121-1123.
- Skerker J M y Berg H C. 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (12):6901-6904.
- Smith K D, Lipchock S V, Ames T D, Wang J, Breaker R R y Strobel S A. 2009. Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat Struct Mol Biol* 16 (12):1218-1223.
- Smith K D, Shanahan C A, Moore E L, Simon A C y Strobel S A. 2011. Structural basis of differential ligand recognition by two classes of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate-binding riboswitches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (19):7757-7762.
- Spangler C, Bohm A, Jenal U, Seifert R y Kaefer V. 2010. A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J Microbiol Methods* 81 (3):226-231.
- Spiers A J, Bohannon J, Gehrig S M y Rainey P B. 2003. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* 50 (1):15-27.
- Stuedel R. 1996. Mechanism for the Formation of Elemental Sulfur from Aqueous Sulfide in Chemical and Microbiological Desulfurization Processes. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 35 (4):1417-1423.
- Sudarsan N, Lee E R, Weinberg Z, Moy R H, Kim J N, Link K H y Breaker R R. 2008. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321 (5887):411-413.
- Sugio T, Tsujita Y, Inagaki K y Tano T. 1990. Reduction of Cupric Ions with Elemental Sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 56 (3):693-696.
- Sugio T, Tsujita Y, Katagiri T, Inagaki K y Tano T. 1988. Reduction of Mo6+ with elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 170 (12):5956-5959.
- Sultan S Z, Pitzer J E, Boquoi T, Hobbs G, Miller M R y Motaleb M A. 2011. Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the enzootic life cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 79 (8):3273-3283.
- Suzuki I, Takeuchi T L, Yuthasastrakosol T D y Oh J K. 1990. Ferrous Iron and Sulfur Oxidation and Ferric Iron Reduction Activities of *Thiobacillus ferrooxidans* Are Affected by Growth on Ferrous Iron, Sulfur, or a Sulfide Ore. *Appl Environ Microbiol* 56 (6):1620-1626.
- Szabo Z, Sani M, Groeneveld M, Zolghadr B, Schelert J, Albers S V, Blum P, Boekema E J y Driessen A J. 2007. Flagellar motility and structure in the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* 189 (11):4305-4309.
- Tal R, Wong H C, Calhoon R, Gelfand D, Fear A L, Volman G, Mayer R, Ross P, Amikam D, Weinhouse H, Cohen A, Sapir S, Ohana P y Benziman M. 1998. Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J Bacteriol* 180 (17):4416-4425.
- Tamayo R, Tischler A D y Camilli A. 2005. The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *J Biol Chem* 280 (39):33324-33330.
- Tao F, He Y W, Wu D H, Swarup S y Zhang L H. 2010. The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol* 192 (4):1020-1029.
- Tarutina M, Ryjenkov D A y Gomelsky M. 2006. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* 281 (46):34751-34758.
- Tchigvintsev A, Xu X, Singer A, Chang C, Brown G, Proudfoot M, Cui H, Flick R, Anderson W F, Joachimiak A, Galperin M Y, Savchenko A y Yakunin A F. 2010. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol* 402 (3):524-538.
- Temple K L y Colmer A R. 1951. The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium, *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* 62 (5):605-611.
- Tian K L, Lin J Q, Liu X M, Liu Y, Zhang C K y Yan W M. 2003. Conversion of an obligate autotrophic bacteria to heterotrophic growth: expression of a heterogeneous phosphofructokinase gene in the chemolithotroph *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biotechnol Lett* 25 (10):749-754.

- Tischler A D y Camilli A. 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol* 53 (3):857-869.
- Tischler A D y Camilli A. 2005. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun* 73 (9):5873-5882.
- Tischler A D, Lee S H y Camilli A. 2002. The *Vibrio cholerae* vieSAB locus encodes a pathway contributing to cholera toxin production. *J Bacteriol* 184 (15):4104-4113.
- Tuckerman J R, Gonzalez G y Gilles-Gonzalez M A. 2011. Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *J Mol Biol* 407 (5):633-639.
- Tuckerman J R, Gonzalez G, Sousa E H, Wan X, Saito J A, Alam M y Gilles-Gonzalez M A. 2009. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry* 48 (41):9764-9774.
- Tuffin I M, de Groot P, Deane S M y Rawlings D E. 2005. An unusual Tn21-like transposon containing an ars operon is present in highly arsenic-resistant strains of the biomining bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Microbiology* 151 (Pt 9):3027-3039.
- Tyson G W, Lo I, Baker B J, Allen E E, Hugenholtz P y Banfield J F. 2005. Genome-directed isolation of the key nitrogen fixer *Leptospirillum ferrooxidans* sp. nov. from an acidophilic microbial community. *Appl Environ Microbiol* 71 (10):6319-6324.
- Valdes J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson R J, Tettelin H, Blake R, 2nd, Eisen J A y Holmes D S. 2008. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9 597.
- Valdés J, Pedroso I, Quatrini R y Holmes D S. 2008. Comparative genome analysis of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *A. caldus*: Insights into their metabolism and ecophysiology. *Hydrometallurgy* 94 (1-4):180-184.
- van Zyl L J, van Munster J M y Rawlings D E. 2008. Construction of arsB and tetH mutants of the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus caldus* by marker exchange. *Appl Environ Microbiol* 74 (18):5686-5694.
- Vasquez M y Espejo R T. 1997. Chemolithotrophic bacteria in copper ores leached at high sulfuric Acid concentration. *Appl Environ Microbiol* 63 (1):332-334.
- Vera M, Krok B, Sand W y Poetsch A. 2011. High throughput proteomic comparison of data for planktonic and biofilm-forming cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Proceedings of the 19th International Biohydrometallurgy Symposium, Changsha, China 358-361.
- Wachtershauser G. 1990. Evolution of the first metabolic cycles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1):200-204.
- Waksman S A. 1922. Microorganisms Concerned in the Oxidation of Sulfur in the Soil: IV. A Solid Medium for the Isolation and Cultivation of *Thiobacillus thiooxidans*. *J Bacteriol* 7 (6):605-608.
- Waksman S A y Joffe J S. 1922. Microorganisms Concerned in the Oxidation of Sulfur in the Soil: II. *Thiobacillus Thiooxidans*, a New Sulfur-oxidizing Organism Isolated from the Soil. *J Bacteriol* 7 (2):239-256.
- Wan X, Tuckerman J R, Saito J A, Freitas T A, Newhouse J S, Denery J R, Galperin M Y, Gonzalez G, Gilles-Gonzalez M A y Alam M. 2009. Globins synthesize the second messenger bis-(3'-5')-cyclic diguanosine monophosphate in bacteria. *J Mol Biol* 388 (2):262-270.
- Wassmann P, Chan C, Paul R, Beck A, Heerklotz H, Jenal U y Schirmer T. 2007. Structure of Bef3- -modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* 15 (8):915-927.
- Waters C M, Lu W, Rabinowitz J D y Bassler B L. 2008. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of vpsT. *J Bacteriol* 190 (7):2527-2536.
- Watling H R. 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides - A review. *Hydrometallurgy* 84 (1-2):81-108.
- Weber H, Pesavento C, Possling A, Tischendorf G y Hengge R. 2006. Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62 (4):1014-1034.
- Weinhouse H, Sapir S, Amikam D, Shilo Y, Volman G, Ohana P y Benziman M. 1997. c-di-GMP-binding protein, a new factor regulating cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett* 416 (2):207-211.
- Whitfield C. 2006. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem* 75 39-68.
- Wilksch J J, Yang J, Clements A, Gabbe J L, Short K R, Cao H, Cavaliere R, James C E, Whitchurch C B, Schembri M A, Chuah M L, Liang Z X, Wijburg O L, Jenney A W, Lithgow T y Strugnell R A.

2011. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog* 7 (8):e1002204.
- Wolfe A J y Visick K L. 2008. Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* 190 (2):463-475.
- Wong H C, Fear A L, Calhoun R D, Eichinger G H, Mayer R, Amikam D, Benziman M, Gelfand D H, Meade J H, Emerick A W y et al. 1990. Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (20):8130-8134.
- Zhao Q, Liu X M, Zhan Y, Lin J Q, Yan W M, Bian J y Liu Y. 2005. Construction of an engineered *Acidithiobacillus caldus* with high-efficiency arsenic resistance. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45 (5):675-679.
- Zhu J, Li Q, Jiao W, Jiang H, Sand W, Xia J, Liu X, Qin W, Qiu G, Hu Y y Chai L. 2012. Adhesion forces between cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* or *Leptospirillum ferrooxidans* and chalcopyrite. *Colloids Surf B Biointerfaces* 94 95-100.
- Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W y Romling U. 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* 39 (6):1452-1463.

ANEXOS

Anexo 1. Fenotipos relacionados con proteínas con dominio GGDEF y/o EAL en distintas bacterias.

Organismo	Proteína	Arquitectura (NH ₂ -COOH)	Fenotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	YedQ	X-GGDEF	Inhibición motilidad	(Pesavento y cols., 2008)
	YeaI	X-GGDEF	Inhibición motilidad	(Pesavento y cols., 2008)
	YhjH	EAL	Motilidad	(Ko y Park, 2000)
	YbjH		Motilidad	(Pesavento y cols., 2008)
	YegE	MASE1-PAS ³ -GGDEF-EAL	Motilidad	(Pesavento y cols., 2008)
	YoaD	CSS-EAL	Motilidad	(Brombacher y cols., 2006)
	YciR	X-PAS-GGDEF-EAL	Inhibición de la producción de EPS (celulosa), biopelículas y agregación	(Weber y cols., 2006)
	YddV	GGDEF-EAL	Inhibición de la producción de EPS (fimbria), inhibición de la formación de biopelículas	(Mendez-Ortiz y cols., 2006)
	YaiC	MASE2-GGDEF	Formación de biopelículas	(Brombacher y cols., 2003)
	YdaM	X-PAS-GGDEF	Producción de EPS, formación de biopelículas	(Weber y cols., 2006)
<i>Escherichia coli</i> AIEC	YhjH	EAL	Adherencia-Invasión pili tipo I	(Claret y cols., 2007)
	YaiC	MASE2-GGDEF	Producción de EPS (celulosa)	(Claret y cols., 2007)
<i>Escherichia chaffeensis</i>	PleD	REC-REC-GGDEF	Agregación proliferación	(Kumagai y cols., 2011)
<i>Salmonella typhimurium</i>	STM2123	MASE1-(PAS-PAC) ² -GGDEF-EAL	Producción de EPS (celulosa y fimbria)	(Simm y cols., 2004)
	STM3388	MHYT3-GGDEF-EAL	Producción de EPS (celulosa y fimbria)	(Simm y cols., 2004)
	AdrA	MASE2-GGDEF	Producción de EPS (celulosa y fimbria), Morfotipo rda	(Romling y cols., 2000)
	GopA	X-GGDEF	Formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	GopB	X-GGDEF	Formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	YegE	MASE1-GGDEF-EAL	Formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	YeaJ	X-GGDEF	Formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	GepF	MHYT3-GGDEF-EAL	Formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	YfiN	HAMP-GGDEF	Formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	YciR	X-GGDEF-EAL	Formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	YhjH		inhibición de la formación de biopelículas	(García y cols., 2004)
	CdgR	EAL	Motilidad, inhibición de la formación de biopelículas	(Simm y cols., 2004)
			Defensa antioxidante, sobrevivencia en hospedero y macrofago	(Hisert y cols., 2005)

Anexo 1. Continuación

Organismo	Proteína	Arquitectura (NH ₂ -COOH)	Fenotipo	Referencia	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	RocA	X-GGDEF	Producción de EPS, formación de biopelículas	(Merritt y cols., 2010)	
	WspR	CheY-GGDEF	Producción de EPS, formación de biopelículas, rugosidad de la colonia	(D'Argenio y cols., 2002)	
	WspR	REC-GGDEF	Formación de biopelículas	(Hickman y cols., 2005)	
	SadC	X-GGDEF	Formación de biopelículas, inhibición de la motilidad Biofilm	(Merritt y cols., 2010)	
	MorA		inhibición de la formación de biopelículas	(Choy y cols., 2004)	
	PvrR	REC-EAL	Represión de la adherencia	(Drenkard y Ausubel, 2002)	
	Arr	TM-EAL	Permite Formación de biofilm en respuesta a antibiótico	(Hoffman y cols., 2005)	
	SadR	REC-EAL	Inhibición de la estructuración de biopelículas	(Kuchima y cols., 2005)	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WspR	CheY-GGDEF	Producción de EPS, formación de biopelículas, rugosidad de colonias	(Spjers y cols., 2003)
		WspR	REC-GGDEF	Formación de biopelículas	(Newell y cols., 2011b)
RapA		EAL-CBS-GGDEF	Menos LapA en superficie, Adherencia biofilm	(Monds y cols., 2007)	
GcbA		REC-REC-GGDEF	Formación de biopelículas, inhibición de la motilidad	(Newell y cols., 2011b)	
GcbB		CHASE-PAS-PAS-GGDEF	Formación de biopelículas, inhibición de la motilidad	(Newell y cols., 2011b)	
GcbC		CACHE1-GGDEF	Formación de biopelículas, inhibición de la motilidad	(Newell y cols., 2011b)	
<i>Pseudomonas putida</i>		MorA	PAS-PAC-GGDEF-EAL	Mut sube swimming, hiperflagelados, sube tx de FliC (flagelina)	(Choy y cols., 2004)
		PP0165	GGDEF-EAL	Formación de biopelículas	(Gjermansen y cols., 2005)
		<i>V. parahaemolyticus</i>	SerC	GGDEF-EAL	Producción de EPS, rugosidad de la colonia, inhibición de la motilidad swarming
SerG			PAS-GGDEF-EAL	S.E. sube swarming, baja la tx de genes capsulares Mut. Baja swarming	Kim 2007
<i>V. fischeri</i>	MifA*	X-GGDEF-PAS	Mut aumento de flagelina, mas motil SE baja flagelina, menos motil	(O'Shea y cols., 2006)	
	MifB*	X-GGDEF	Mut aumento de flagelina, mas motil SE baja flagelina, menos motil	(O'Shea y cols., 2006)	

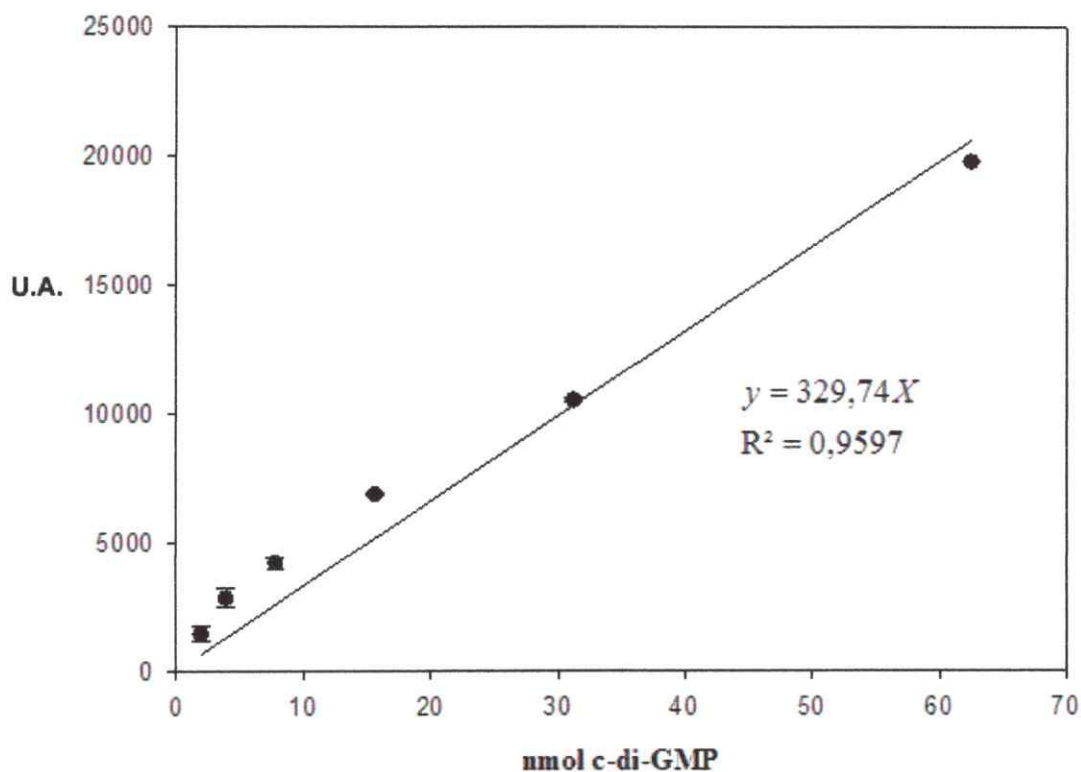
Anexo 1. Continuación

Organismo	Proteína	Arquitectura (NH ₂ -COOH)	Fenotipo	Referencia
<i>Vibrio cholerae</i>	MbaA	GGDEF-EAL	Producción de EPS, formación de biopelículas	(Bomchil y cols., 2003) (Beyhan y cols., 2007, Lim y cols., 2006)
	CdgA	X-GGDEF	Rugosidad de colonias	(Beyhan y Yildiz, 2007)
	VpvC*	X-HAMP-GGDEF	Rugosidad de colonias	(Beyhan y cols., 2008)
	CdgH*	PBPb-PBPb-GGDEF	Rugosidad de colonias	(Rashid y cols., 2003)
	RocS	PAS-GGDEF-EAL	Producción de EPS, rugosidad de la colonia, inhibición de la motilidad	(Lim y cols., 2006)
	CdgD	PAS-PAC-GGDEF	Formación de biopelículas, inhibición de la motilidad	(Tischler y Camilli, 2004)
	VieA	REC-REC-EAL-HTH	Inhibición de la formación de biopelículas	(Lim y cols., 2006)
	CdgC	GAF-GGDEF-EAL	Motilidad, inhibición de la formación de biopelículas	(Lim y cols., 2006)
	RocS	PAS-PAC-GGDEF-EAL	Motilidad, inhibición de la formación de biopelículas	(Lim y cols., 2006)
	MbaA	HAMP-GGDEF-EAL	Motilidad, inhibición de la formación de biopelículas	(Tischler y cols., 2002)
	VieA	REC-REC-EAL-HTH	Cholera toxin production	(Tischler y Camilli, 2005)
	VieA	REC-REC-EAL-HTH	Mutant sube cdiGMP, sube biofilm, baja tx toxinas, baja infección	(Huitema y cols., 2006)
	<i>C. crescentus</i>	TipF	X-EAL	Mut baja trad de fljK (flagelina) y fljE (hook) no filamento ni hook no motil
PleD		REC-REC-GGDEF	Adhesion y dispersión	(Tal y cols., 1998) (Tal y cols., 1998)
<i>G. xylinus</i>	DGCI	PAS-GGDEF-EAL	Producción de EPS (celulosa)	(Johnson y cols., 2005)
	PDEA	PAS-GGDEF-EAL	Inhibición de la producción de EPS (celulosa)	(Johnson y cols., 2005)
<i>T. maritima</i>	TM1163*	X-GGDEF	Autoagregación	(Kirilina y cols., 2004), (Bobrov y cols., 2005)
	TM1184*	X-PAS-PAS-X-GGDEF	Autoagregación	(Jones y cols., 1999)
<i>Y. pestis</i>	HmsP	X-GGDEF-EAL	Inhibición de la formación de biopelículas	(Wilksch y cols., 2011)
	HmsT	GCDEF	Autoagregación	(Wilksch y cols., 2011)
<i>K. pneumoniae</i>	YfiN	X-GGDEF	Formación de biopelículas	(Wilksch y cols., 2011)
	MtrJ	EAL	Inhibición de la formación de biopelículas	(Wilksch y cols., 2011)

Anexo 1. Continuación

Organismo	Proteína	Arquitectura (NH ₂ -COOH)	Fenotipo	Referencia
<i>X. campestris</i>	RpfG	REC-HDGYF	Producción proteasa, xantán, endoglucanasa, mannanasa	(Ryan y cols., 2006)
	RavR	GGDEF-EAL-REC	PDE, Virulencia	(He y cols., 2009)
<i>R. leguminosarum</i>	CelR2	REC-GGDEF	Producción de EPS (celulosa)	(Ausmees y cols., 1999)
<i>B. cepacia H111</i>	YciR	PAS-GGDEF-EAL	Formación biopelículas	(Huber y cols., 2002)
<i>M. xanthus</i>	ActA	REC-GGDEF	Formación de cuerpos fructíferos	(Gronewold y Kaiser, 2001)
<i>Bordetella pertussis</i>	BvgR	EAL	Repression of virulence	(Merkel y cols., 1998)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	PleD	REC-REC-GGDEF	Infección	(Lai y cols., 2009)
<i>Campylobacter jejuni</i>	CbrR	REC-REC-GGDEF	Resistencia a Sodium Deoxycholate y colonización chicken	(Raphael y cols., 2005)

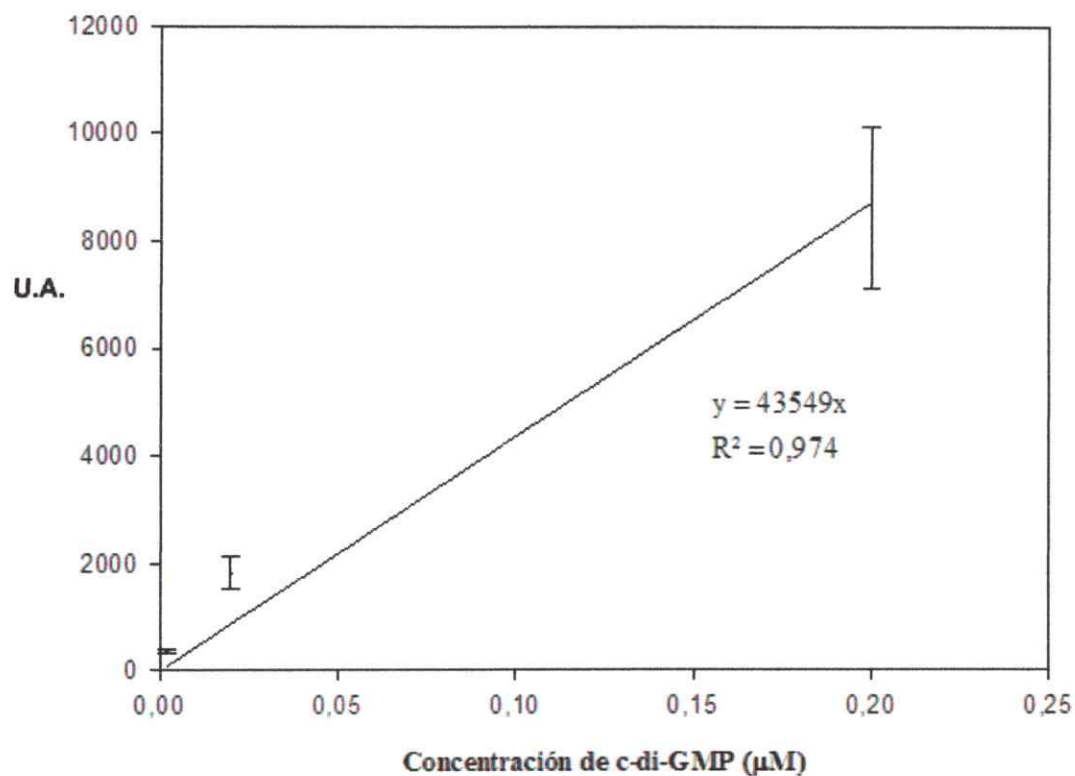
Anexo 2. Curva de calibración del estándar de c-di-GMP para análisis mediante HPLC. Para cada cantidad de c-di-GMP, se grafica el área bajo la curva del pico seleccionado en los cromatogramas (figura 14, página 73). U. A.: unidades arbitrarias. Los datos se detallan en la tabla bajo el gráfico.



Valores de respuesta para cada cantidad de estándar de c-di-GMP

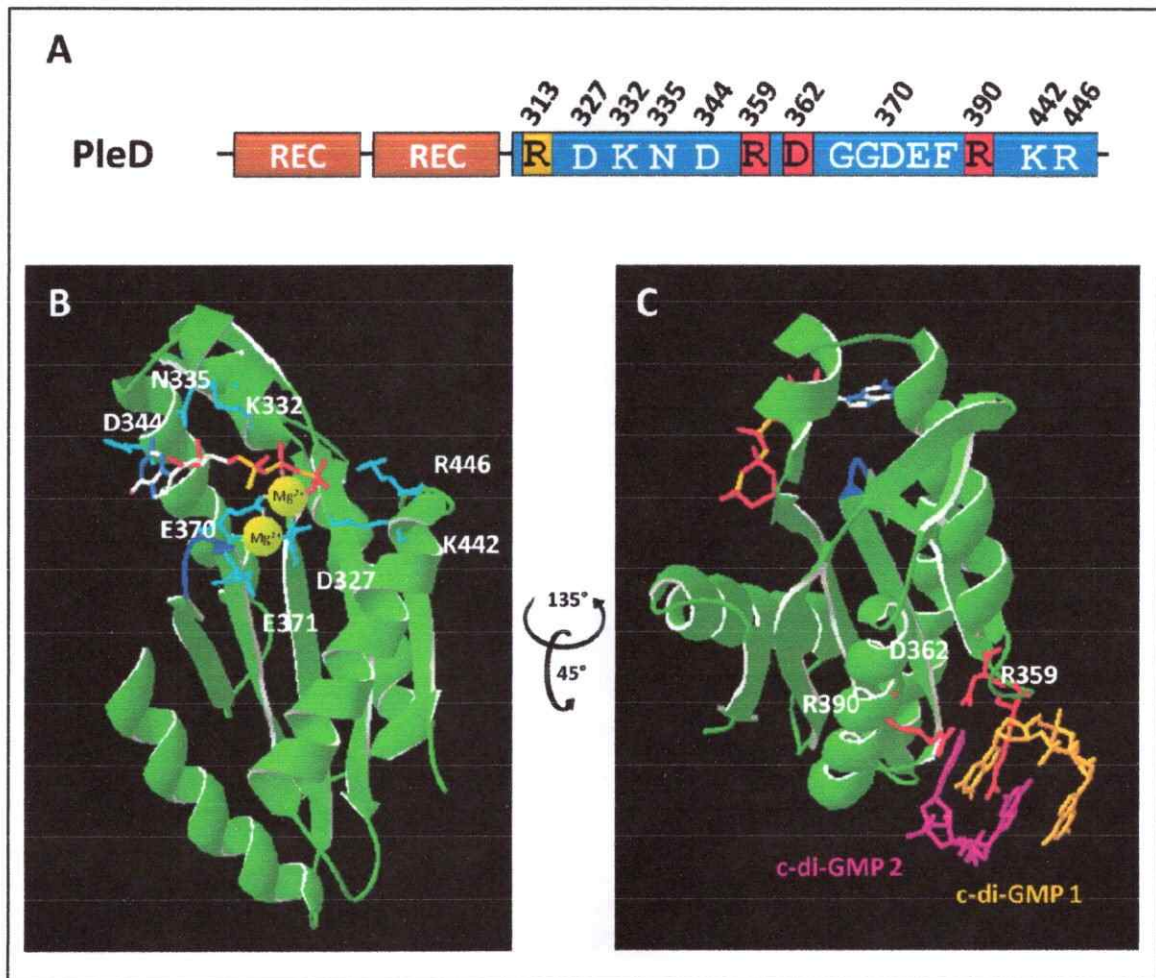
c-di-GMP (nmoles)	curva 1 (U.A.)	curva 2 (U.A.)	Prom	Desvestp
62,5	19736	19730	19733	3
31,25	10414	10563	10488,5	74,5
15,625	6890	6804	6847	43
7,8125	3976	4397	4186,5	210,5
3,90625	2444	3185	2814,5	370,5
1,953125	1136	1719	1427,5	291,5

Anexo 3. Curva de calibración del estándar c-di-GMP para análisis mediante MS-MS. Para cada cantidad de c-di-GMP, se grafica el área bajo la curva del pico seleccionado en los cromatogramas (figura 17, página 80). U. A.: unidades arbitrarias. Los datos se detallan en la tabla bajo el gráfico.

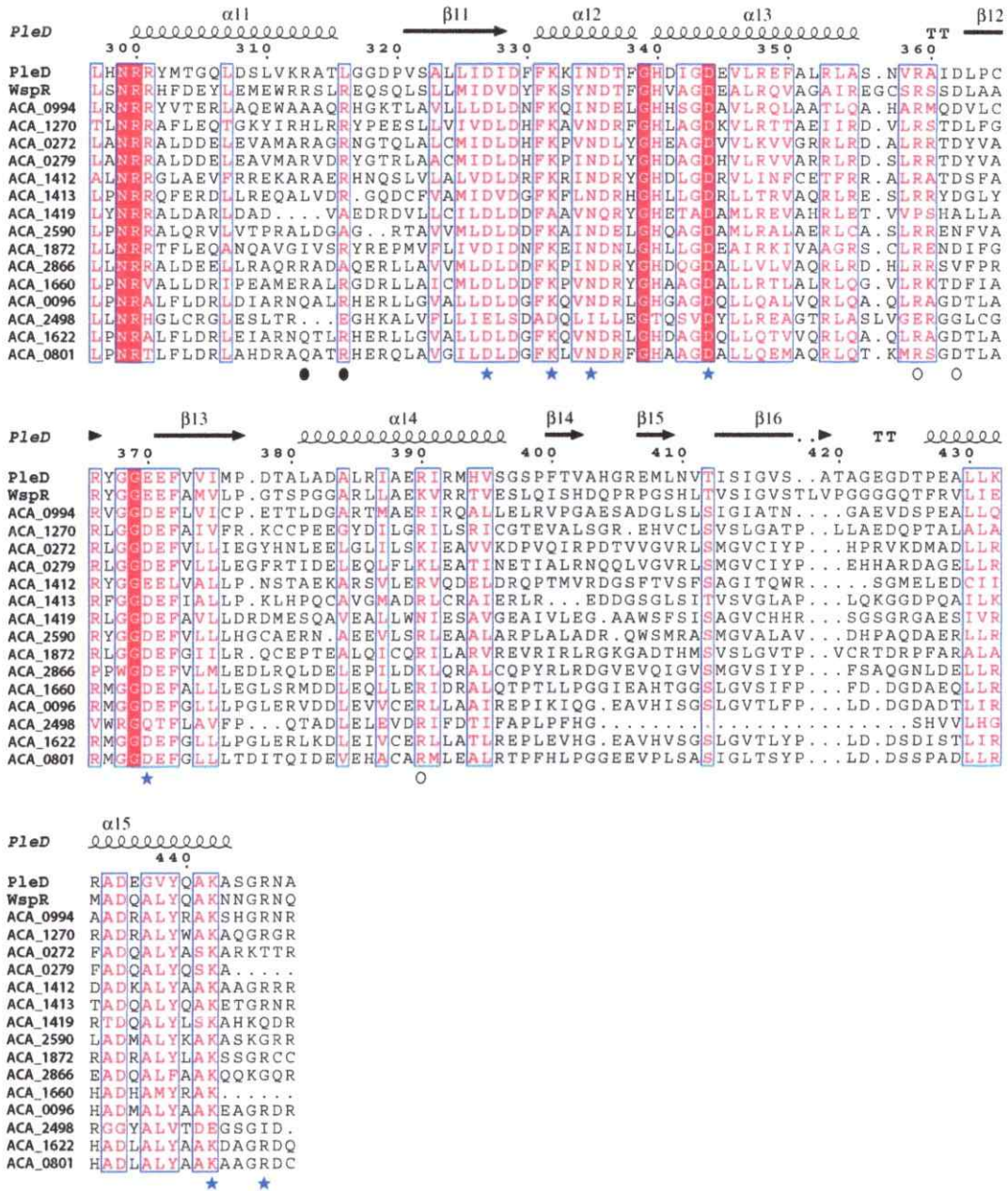


c-di-GMP (μM)	curva 1 (U.A.)	curva 2 (U.A.)	Prom	Desvestp
0,002	339	374	356,5	24,749
0,02	1624	2030	1827	287,085
0,2	7545	9678	8611,5	1508,259

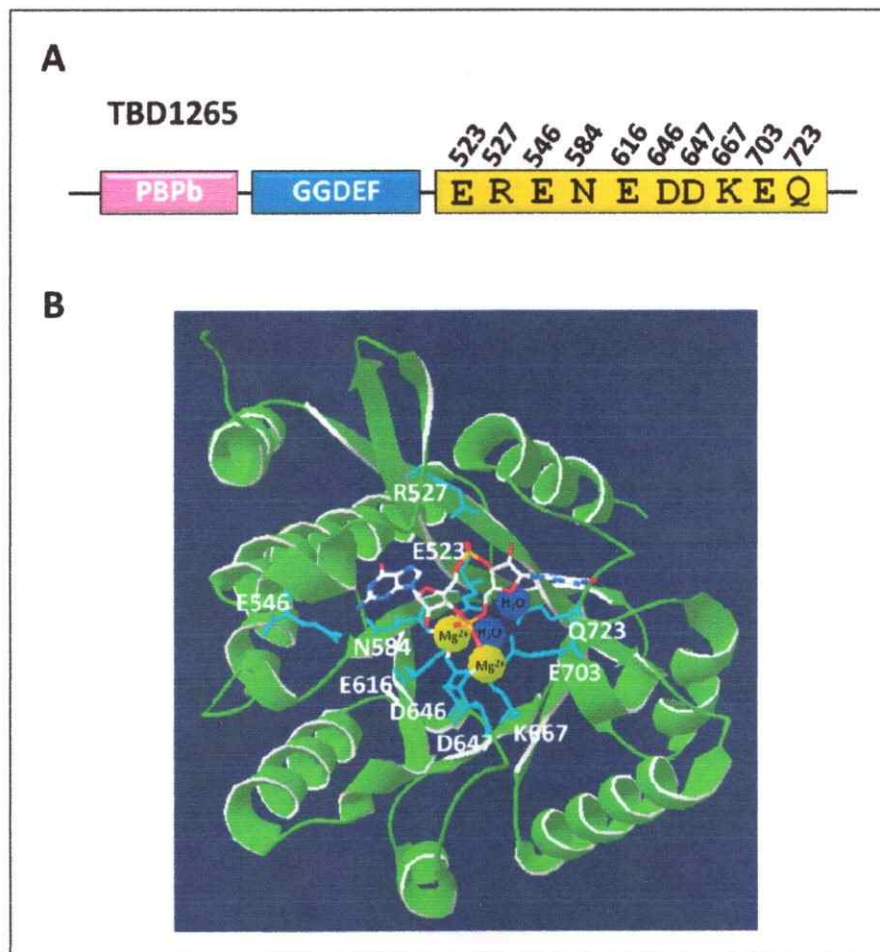
Anexo 4. Aminoácidos clave del dominio GGDEF en la unión de GTP y c-di-GMP. En el panel A se esquematiza la estructura de dominios de la DGC PleD de *C. crescentus*, correspondiente a dos dominios REC (café) y un dominio GGDEF (azul), cuyos aminoácidos importantes para la actividad DGC se muestran en blanco. También se señalan los sitios de inhibición primario (rojo) y secundario (naranja). El panel B muestra la estructura tridimensional del dominio GGDEF de PleD unida al sustrato análogo GTP α S (2V0N). El “ β -hairpin” donde se ubica el motivo GGDEF se indica en azul. Los iones magnesio están representados como esferas amarillas. En el panel C se muestra la unión del dímero de c-di-GMP unido al sitio de inhibición primario.



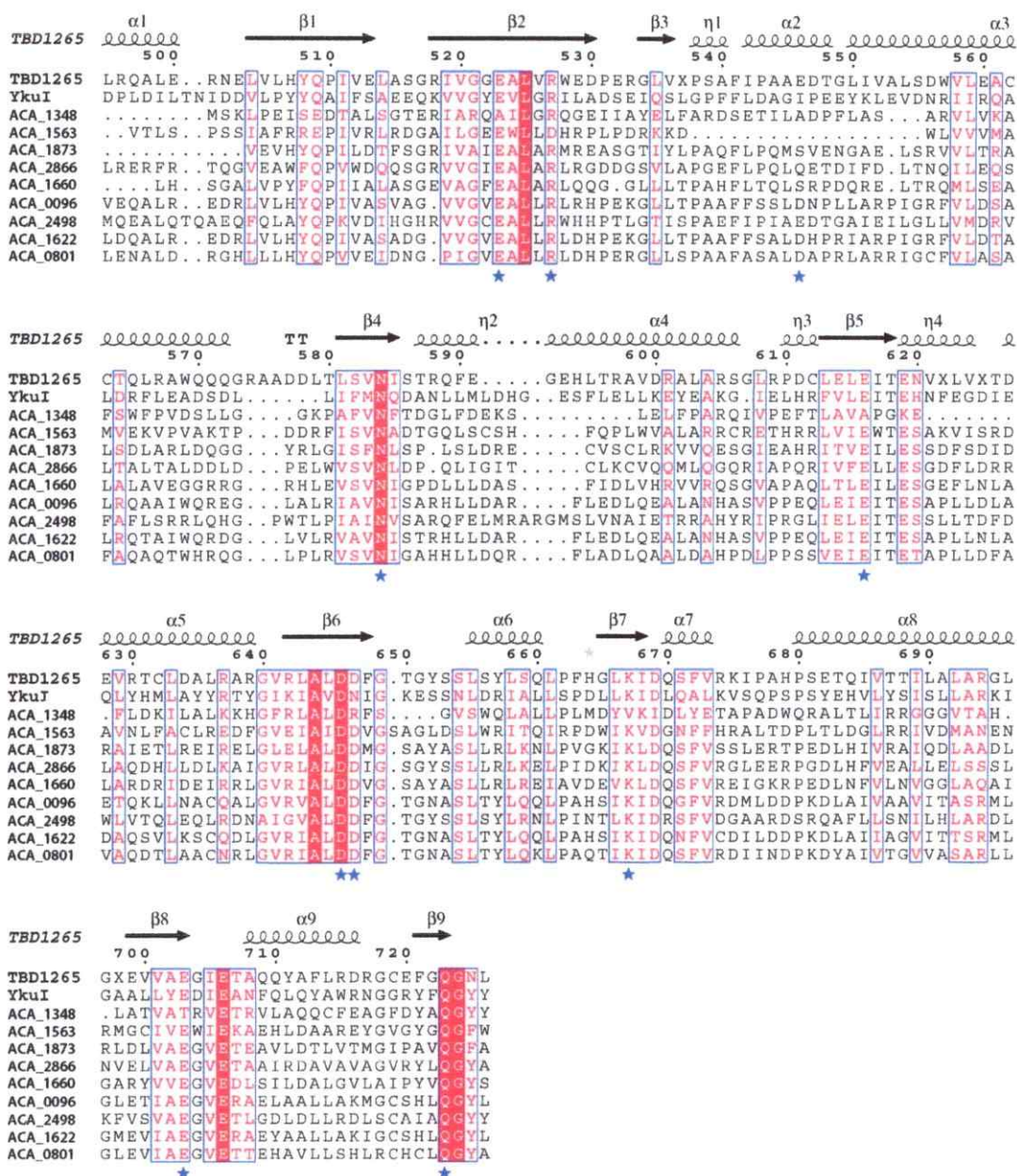
Anexo 5. Alineamientos de los dominios GGDEF de *At. caldus* con dominios GGDEF de DGCs.
 Sitio activo (estrella azul), sitio de inhibición primario (círculos blancos), sitio de inhibición secundario (círculos negros).



Anexo 6. Aminoácidos clave del dominio EAL en la actividad PDE. En el panel A se esquematiza la estructura de dominios de la PDE TBD1265 de *T. denitrificans*, correspondiente a un dominio PBPb (rosado), un dominio GGDEF (azul) y un dominio EAL, cuyos aminoácidos importantes para la actividad PDE se muestran en negro. El panel B muestra la estructura tridimensional del dominio EAL de TBD1265 unida a c-di-GMP (3N3T).



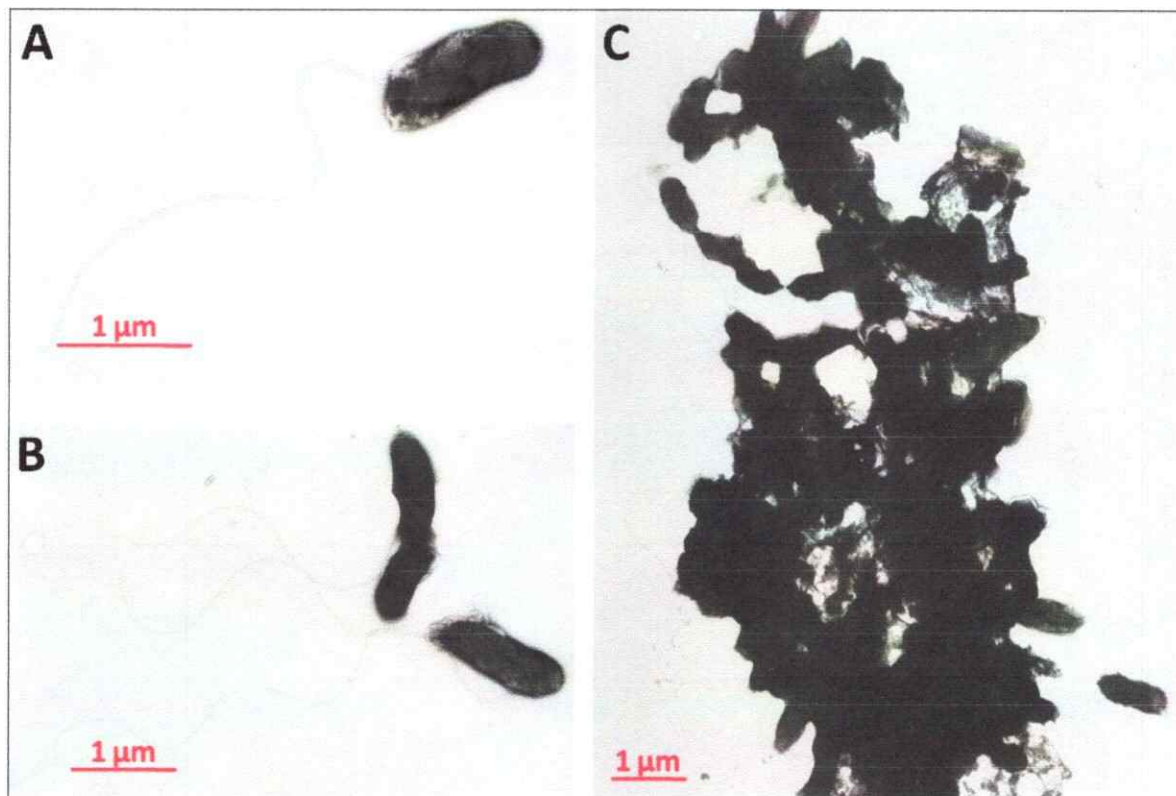
Anexo 7. Alineamientos de los dominios EAL de *At. caldus* con dominios EAL de PDEs. Los aminoácidos que conforman el sitio activo se muestran con una estrella azul.



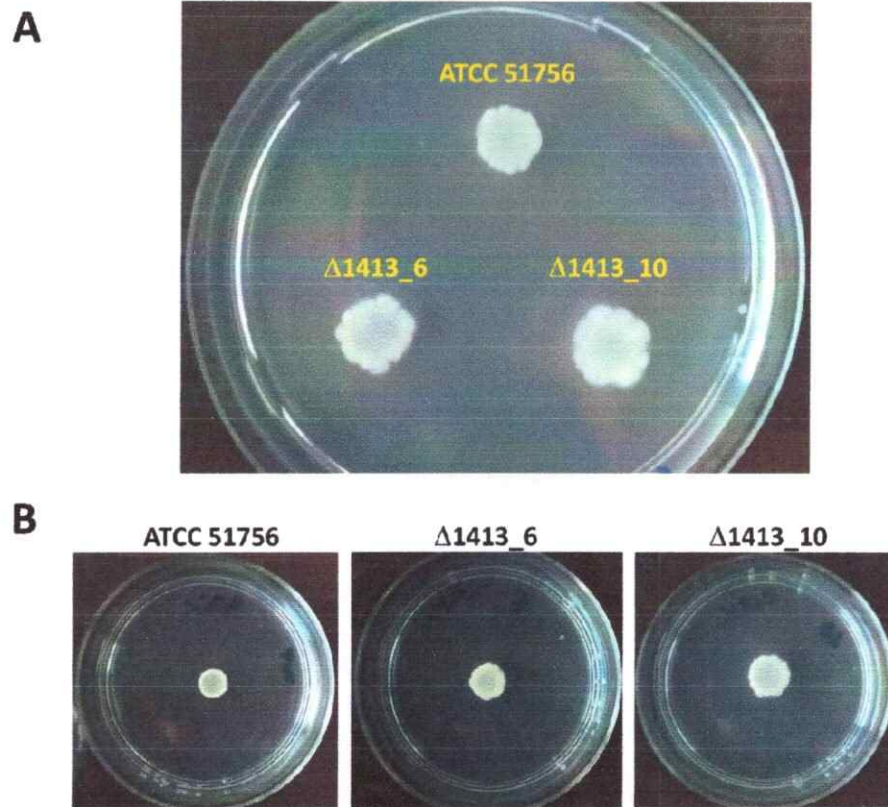
Anexo 8 . Cuantificación de c-di-GMP en las cepas silvestre y Δ 1413

Cepa	pmol de c-di-GMP/mg de proteína
ATCC 51756	4,95 \pm 2,05
ACA_1413 C6	0,36 \pm 0,10
ACA_1413 C10	0,75 \pm 0,34

Anexo 9. Microscopía de transmisión de células de cultivos de *A. caldus* crecidos en medio líquido con tetrionato (A), semisólido con tetrionato (B) y en medio líquido con azufre elemental (C).

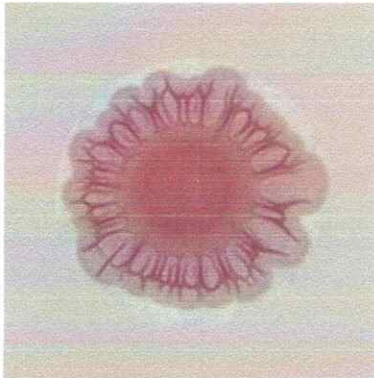


Anexo 10. Comparación de la motilidad entre las cepas silvestre y Δ ACA_1413 de *At. caldus*. Las cepas fueron inoculadas juntas (A) o separadas (B) en medio semisólido (Phytigel 0,2%, pH 4,7) e incubadas a 45°C por 4 días.

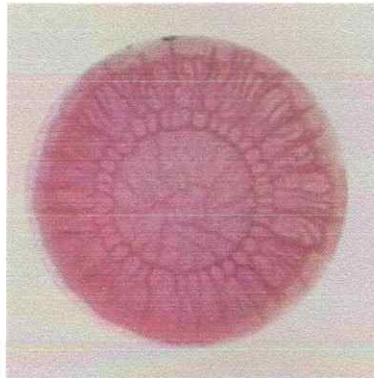


Anexo 11. Expresión de ACA_1873 (EAL) en la cepa MASE 282 de *S. typhimurium* (YciR⁻).

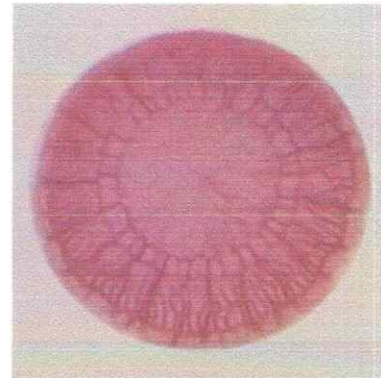
UMR1



ACA_1872



MAE282

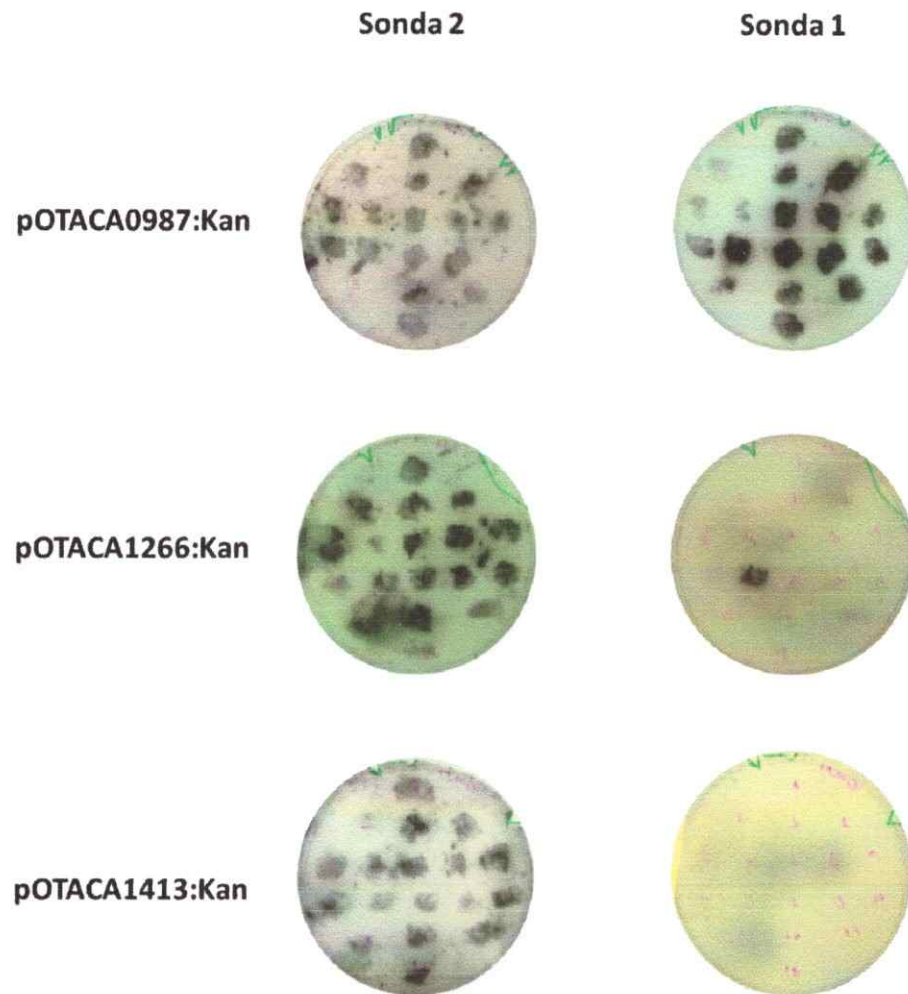


Anexo 12. Presencia de elementos genéticos involucrados con el c-di-GMP en bacterias acidófilas quimiolitotótrofas.

	<i>Acidithiobacillus</i>	<i>Leptospirillum</i>	<i>Sulfobacillus</i>	<i>Acidimicrobium</i>
GGDEF	✓	✓	✓	✓
EAL	✓	✓	✓	✓
GGDEF-EAL	✓	✓	✓	✓
HD-GYP	✓	✓	✓	N.D.
PhZ	✓	✓	N.D.	N.D.
PeID	✓	N.D.	N.D.	N.D.

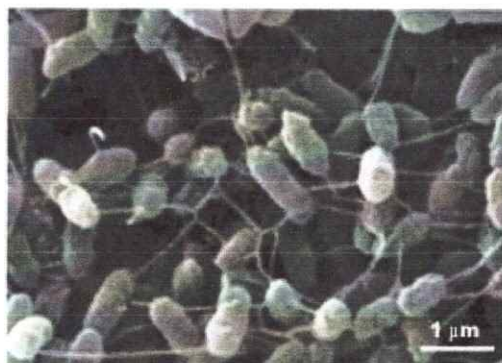
✓, Presencia. N.D., No detectado.

Anexo 13. “Colony blot” para los transconjugantes de *At. caldus* con diferentes plasmidios suicidas.

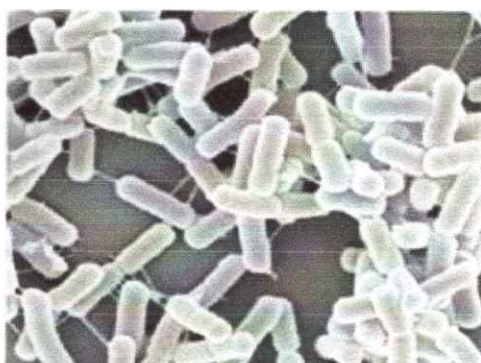


Anexo 14. Comparación entre diversas proyecciones celulares con similitud a las presentadas por *A. caldus*. Nanotubos de *B. subtilis* (Dubey y Ben-Yehuda, 2011), nanocables de *S. oneidensis* MR-1 y *Synechocystis* sp. (Gorby y cols., 2006), pili conjugativo de *E. coli* (May y Okabe, 2008) y flagelo de *P. thermopropionicum* (Ishii y cols., 2005).

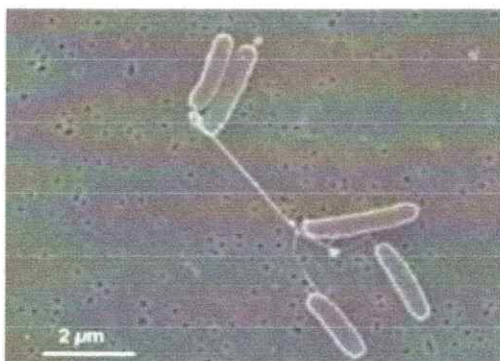
Acidithiobacillus caldus



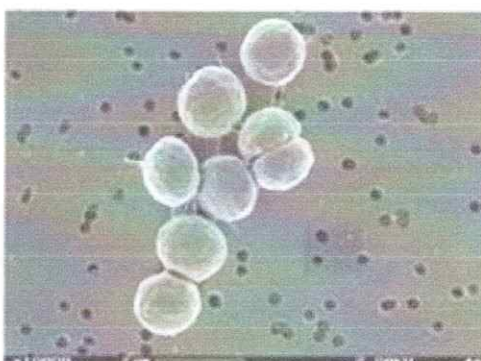
Bacillus subtilis



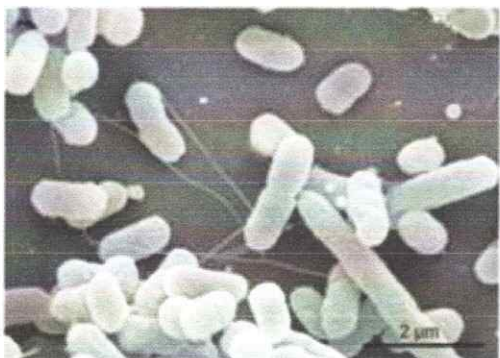
***Shewanella oneidensis* MR-1**



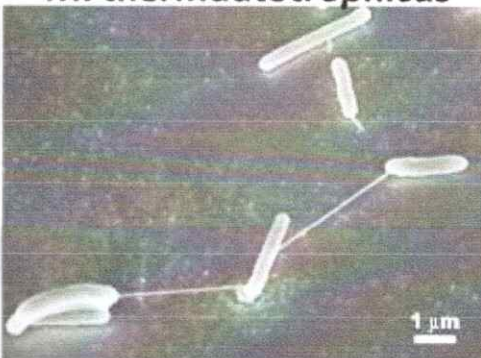
***Synechocystis* sp. PCC 6803**



Escherichia coli



***P. thermopropionicum* y
*M. thermautotrophicus***



Diguanylate cyclase null mutant reveals that c-di-GMP pathway regulates the motility of the extremophile bacterium *Acidithiobacillus caldus*
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Diguanylate cyclase null mutant reveals that c-di-GMP pathway regulates the motility of the extremophile bacterium <i>Acidithiobacillus caldus</i>
Short Title:	Cc-di-GMP pathway regulates <i>At. caldus</i> motility
Corresponding Author:	Nicolas Guilian, Ph.D. Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Santiago, CHILE
Keywords:	<i>Acidithiobacillus caldus</i> ; biofilm; Bioleaching; C-di-GMP pathway; Motility Mutant
Abstract:	The understanding of biofilm formation acquires relevance to design biological strategies to improve the efficiency of the bioleaching process and to prevent environmental damages caused by acid mine/rock drainages. For this reason, our laboratory is focused in the characterization of the molecular mechanisms involved in the biofilm formation in different biomining bacteria. In many bacteria, the intracellular levels of c-di-GMP molecules regulate the transition from the motile planktonic state to sessile community-based behaviors, such as biofilm development, through different kind of effectors. Thus, we recently started a study of c-di-GMP pathway in several biomining bacteria including <i>Acidithiobacillus caldus</i> . C-di-GMP molecules are synthesized by diguanylate cyclases (DGCs) and degraded by phosphodiesterases (PDEs). We previously reported the existence of molecular players involved in c-di-GMP pathway from different <i>Acidithiobacillus</i> species. Here, we report our work related to <i>A. caldus</i> ATCC 51756. We identified several putative-ORFs encoding DGC and PDE and effector proteins. By using total RNA extracted from <i>A. caldus</i> cells and RT-PCR, we demonstrated that these genes are expressed. Besides, by mass spectrometry we characterized the presence of c-di-GMP in <i>A. caldus</i> ATCC 51756 cell extracts. On the other hand, by heterologous complementation in <i>Salmonella</i> Typhimurium UMR1, we demonstrated that several genes encode for functional DGC enzymes. Moreover, mutagenesis experiments strongly indicated that c-di-GMP pathway regulates <i>A. caldus</i> adhesion to sulfur surfaces. Moreover, we developed a DGC defective mutant strains that strongly indicated that c-di-GMP pathway regulates the swarming motility and adhesion to sulfur surfaces by in <i>At. caldus</i> . Together, our results revealed that <i>A. caldus</i> possesses a functional c-di-GMP pathway which could be involved in ores colonization during the bioleaching process.
Order of Authors:	Matias Castro Shelly M. Dean Lina Ruiz David S. Holmes Douglas E. Rawlings Nicolas Guilian, Ph.D.
Suggested Reviewers:	Mark Dopson Centre for Ecology and Evolution in Microbial Model Systems (EEMiS), Biology and Environmental Sciences, Linnaeus University, Kalmar, Sweden mark.dopson@lnu.se Expert of bioleaching microorganisms and especially of <i>At. caldus</i> . Last publications: <i>Appl Environ Microbiol.</i> 2013 79(3):951-7. Gene identification and substrate regulation provide insights into sulfur accumulation during bioleaching with the psychrotolerant acidophile <i>Acidithiobacillus ferrivorans</i> ; <i>Extremophiles.</i> 2010. 14(6):485-91. Biofilm development in the extremely acidophilic archaeon ' <i>Ferroplasma acidarmanus</i> ' Fer1. D. Barrie Johnson

School of Biological Sciences, College of Natural Sciences, Bangor University, Deiniol Road, Bangor, LL57 2UW, UK.
d.b.johnson@bangor.ac.uk
Expert in acidophile microorganisms. Last publication: Environ Microbiol. 2012. 14(10):2620-31. Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfurmetabolizing microorganisms.

Susan T. L. Harrison
Centre for Bioprocess Engineering, Department of Chemical Engineering, University of Cape Town, Private Bag, Rondebosch, 7701, Cape Town, South Africa
sue.harrison@uct.ac.za
Expert in extremophile microorganisms and attachment to energetic substrats. Last Publication: Applied Microbiology and Biotechnology. 2013 97(3): 1317-1324.
Attachment of Acidithiobacillus ferrooxidans and Leptospirillum ferriphilum cultured under varying conditions to pyrite, chalcopyrite, low-grade ore and quartz in a packed column reactor

Ute Romling
Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden
ute.romling@ki.se
"God" of c-di-GMP pathway

Opposed Reviewers:

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
LABORATORIO DE COMUNICACION BACTERIANA

Las Palmeras 3425
Ñuñoa
Santiago Chile

Phone: (56 2) 2978 7241
E-mail: nguilian@uchile.cl
Fax: (56 2) 2978 2983

May 16th, 2013.

Dr Melanie R. Mormile
Editor
PLOSONE

Dear Dr. Mormile.

Please find enclosed our manuscript " Diguanylate cyclase null mutant reveals that c-di-GMP pathway modulates the motility of the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus*" by Matias Castro, Shelly Dean, Lina Ruiz, Douglas Rawlings and Nicolas Guiliani which we are submitting to PLOSONE for publication as a Research Article in Environmental (30.60.80) and/or Industrial Biotechnology (30.170.80) sections.

Our laboratory is focused on the characterization of molecular mechanisms involved biofilm formation by bacterial species dealing with bioleaching process. We have previously characterized functional Quorum Sensing and c-di-GMP pathways in the main studied specie *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

In this work, we have used several experimental strategies (bioinformatics, heterologous complementation, genetic, fluorescence and electronic microscopy) to characterize for the first time the c-di-GMP pathway in the extremophile leaching bacterium *At. caldus* and to obtain a specific mutant whose motility and adhesion to elemental sulfur are affected.

This is the first time that such kind of mutant affecting phenotypes involved in mineral colonization is obtained in *Acidithiobacillus* sp. Our results are very promising for the bioleaching process in order to define new strategies for the enhancement of metallic values production.

Thus, we expect that this important finding related to acidophilic leaching bacteria and bioleaching processes will be of interest to readers of PLOSONE. We sincerely hope that our manuscript will be suitable for publication in PLOSONE.

Best regards,

Dr. Nicolas Guiliani
Corresponding author
Facultad de Ciencias,
Universidad de Chile

1 **Diguanylate cyclase null mutant reveals that c-di-GMP pathway regulates**
2 **the motility of the extremophile bacterium *Acidithiobacillus caldus***

3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Castro M.¹, Dean S.², Ruiz L.¹, Holmes, D.³, Rawlings D.² and Guiliani, N.^{1*}

¹Laboratorio de Comunicación Bacteriana, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. ²Laboratory of microbiology, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa. ³Center for Bioinformatics and Genome Biology, FCV-MIFAB and University Andrés Bello, Santiago, Chile.

Corresponding author: Mailing address: ¹Laboratorio de Comunicación Bacteriana, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Phone: 56 2 9787241

E-mail: nguilian@uchile.cl

24

ABSTRACT

25 The understanding of biofilm formation acquires relevance to design biological strategies to
26 improve the efficiency of the bioleaching process and to prevent environmental damages
27 caused by acid mine/rock drainages. For this reason, our laboratory is focused in the
28 characterization of the molecular mechanisms involved in the biofilm formation in different
29 biomining bacteria. In many bacteria, the intracellular levels of c-di-GMP molecules
30 regulate the transition from the motile planktonic state to sessile community-based
31 behaviors, such as biofilm development, through different kind of effectors. Thus, we
32 recently started a study of c-di-GMP pathway in several biomining bacteria including
33 *Acidithiobacillus caldus*. C-di-GMP molecules are synthesized by diguanylate cyclases
34 (DGCs) and degraded by phosphodiesterases (PDEs). We previously reported the existence
35 of molecular players involved in c-di-GMP pathway from different *Acidithiobacillus*
36 species. Here, we report our work related to *A. caldus* ATCC 51756. We identified several
37 putative-ORFs encoding DGC and PDE and effector proteins. By using total RNA
38 extracted from *A. caldus* cells and RT-PCR, we demonstrated that these genes are
39 expressed. Besides, by mass spectrometry we characterized the presence of c-di-GMP in *A.*
40 *caldus* ATCC 51756 cell extracts. On the other hand, by heterologous complementation in
41 *Salmonella* Typhimurium UMR1, we demonstrated that several genes encode for functional
42 DGC enzymes. Moreover, mutagenesis experiments strongly indicated that c-di-GMP
43 pathway regulates *A. caldus* adhesion to sulfur surfaces. Moreover, we developed a DGC
44 defective mutant strains that strongly indicated that c-di-GMP pathway regulates the
45 swarming motility and adhesion to sulfur surfaces by in *At. caldus*. Together, our results
46 revealed that *A. caldus* possesses a functional c-di-GMP pathway which could be involved

47 in ores colonization during the bioleaching process.

48

C-di-GMP pathway in biomining bacteria

M. Castro¹, L. M. Ruíz¹, A. Barriga², C. A. Jerez³, D. Holmes⁴ and
N. Guilliani¹

¹Laboratory of Bacterial Communication, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile.

²Unidad de Espectrometría de Masas, Centro de Estudios para el Desarrollo de la Química (CEPEDEQ), Facultad de Ciencias Químicas y Farmaceuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

³Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences and Institute for Cell Dynamics and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile.

⁴Center for Bioinformatics and Genome Biology, FCV-MIFAB and University Andrés Bello, Santiago, Chile.

nguillian@uchile.cl

Keywords: *Acidithiobacillus*, biofilm, biomining, c-di-GMP.

Abstract. *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, and *A. caldus* are acidophilic Gram-negative γ -proteobacteria involved in the bioleaching of metal sulfides. Bacterial attachment to mineral surface and biofilm development play a pivotal role in this process. Therefore, the understanding of biofilm formation has relevance to the design of biological strategies to improve the efficiency of bioleaching processes. For this reason, our laboratory is focused on the characterization of the molecular mechanisms involved in biofilm formation in biomining bacteria. In many bacteria, the intracellular level of c-di-GMP molecules regulates the transition from the motile planktonic state to sessile community-based behaviors, such as biofilm development. Thus, we recently started the study of c-di-GMP pathway in biomining bacteria. C-di-GMP molecules are synthesized by diguanylate cyclases (DGCs) and degraded by phosphodiesterases (PDEs). So far, two kinds of effectors have been identified, including three protein families (pilZ, PleD and FleQ) and a conserved RNA domain (GEMM) which acts as a riboswitch. We previously reported the existence of different molecular players involved in c-di-GMP pathway in *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Here, we expanded our work to other *Acidithiobacillus* species: *A. thiooxidans* ATCC 19377 and *A. caldus* ATCC 51756. In both, we identified several putative-ORFs encoding DGC, PDE and effector proteins. By using total RNA extracted from *A. ferrooxidans* and *A. caldus* cells in RT-PCR and qPCR experiments, we demonstrated that these genes are expressed. In addition, we characterized the presence of c-di-GMP in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and *A. caldus* ATCC 51756 cell extracts. Taken together, these results strongly suggest that *A. ferrooxidans*, *A. caldus* and *A. thiooxidans* possess functional c-di-GMP pathways. As it occurs in other Gram-negative bacteria, this pathway should be involved in the regulation of the planktonic/biofilm switch. In the future, we have to integrate this new biological dimension to improve the biological understanding of bioleaching.

Introduction

During bioleaching process, insoluble metal sulfides are oxidized to metal soluble sulfates through the metabolic activity of a consortia composed of chemolithoautotrophic acidophilic microorganisms. Sulfur oxidizers, such as *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus caldus* and *Acidithiobacillus ferrooxidans* (also an iron oxidizer) are part of this consortia [1, 2]. It has been proved that these Gram-negative γ -proteobacteria are capable of developing biofilms consisting of a cell monolayer, which remain attached to the ore surface through the extracellular polymeric substance matrix (EPS) [3]. This mineral-bacteria interaction has been positively correlated with bioleaching rates [3, 4]. Therefore, the characterization of the molecular

mechanisms involved in biofilm formation becomes important for the design of biological strategies to improve the efficiency of bioleaching processes.

Recently, cyclic diguanylate (c-di-GMP) has been described as a second messenger used by most bacteria, but not eukaryotes or Archaea, to regulate phenotypes such as motility and biofilm formation [5]. It is widely accepted that low levels of c-di-GMP promote motility, while high levels promote sessile cellular states [6]. C-di-GMP is synthesized from two GTP molecules by the diguanylate cyclase enzyme (DGC) and it is degraded by two families of phosphodiesterases (PDEs) (Fig. 1).

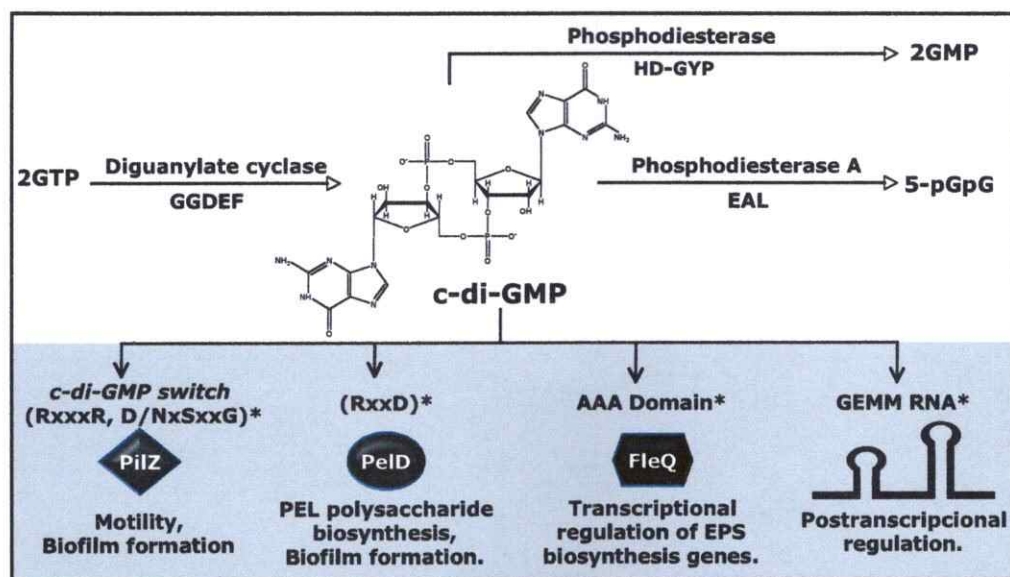


Figure 1. Cyclic diguanylate signaling pathway. c-di-GMP is synthesized by GGDEF domain present in DGCs and degraded by EAL or HD-GYP domains present in PDEs (white part). c-di-GMP can bind specific motifs or domains (*) from different types of effectors (grey part).

Each of these enzymatic activities resides in particular domains which are typically present in proteins containing multiple regulatory domains. These receive environmental signals and therefore modulate the activities of c-di-GMP synthesis or degradation domains [7, 8]. Finally, the intracellular levels of c-di-GMP determine physiological and behavioral changes [9]. To date, two types of effectors from this signaling pathway have been identified (fig. 1, gray part). The first one includes proteins with the PilZ domain and also the PelD and FleQ proteins. All of these proteins are capable of binding c-di-GMP and inducing biofilm formation. While the PilZ domain is necessary for flagella-based motility inhibition [10, 11], PelD and FleQ are involved in the regulation of exopolysaccharide synthesis which is necessary for biofilm formation [12, 13]. The second type of effector is the ribonucleotidic GEMM domain whose c-di-GMP binding can regulate mRNA translation [14].

We initially started the characterization of c-di-GMP pathway in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 [15]. However, for a better understanding of the biomining consortia dynamics at the biofilm level, we recently expanded our study to *A. thiooxidans* and *A. caldus*. Here, we present some of our results related to c-di-GMP pathway in these three *Acidithiobacillus* sp.

Methods

Bacterial strains and growth media. *A. ferrooxidans* ATCC 23270 was grown in ferrous iron-containing modified 9K medium at pH 1.5 as described previously or in DSMZ medium 71 containing 20 mM thiosulfate at pH 4.4 as described previously [16]. *A. caldus* ATCC 51756 was

cultivated in mineral salts medium (MSM) (acidified to pH 2.5 with H₂SO₄) containing tetrathionate (5 mM) or sulfur (1% wt/vol) as the energy source and trace elements [17].

Bioinformatic tools. The complete genome sequence of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 was obtained from the Institute for Genomic Research database (TIGR). Draft genome sequences of *A. thiooxidans* ATCC 19377 and *A. caldus* ATCC 51756 were obtained from the Center for Bioinformatics and Genome Biology (CBGB), Santiago, Chile. Protein domains were identified with HMMER. The corresponding amino acid sequences were compared against the GenBank nonredundant database and the Swissprot database.

Reverse transcription PCR (RT-PCR). *A. ferrooxidans* or *A. caldus* cells were harvested and washed twice with acidic water (pH 2.0) and 10 mM sodium citrate solutions. This was followed by alkaline lysis. RNA extraction was performed by a modified hot-phenol method as described previously [16]. The synthesis of cDNA was done with 1 µg of total RNA and 5-10 pmoles of specific primers. Reverse transcription was made with Improm II reverse transcriptase (Promega). cDNA obtained was used as a template to amplify each ORFs by PCR. The expected sizes for the PCR products were checked by agarose electrophoresis [16].

Mass spectrometry. c-di-GMP extraction from *A. ferrooxidans* and *A. caldus* was performed as described before [18]. Nucleotidic extracts were diluted 1:10 in 80% v/v acetonitrile and 20 mM ammonium acetate. Spectra were obtained in a electrospray-ionic trap mass spectrometer (Esquire 4000 ESI-IT. Bruker Daltonics, Inc., MA-USA). 100 µL of sample or standard were directly injected (Cole-Parmer, IL-USA). Standard c-di-GMP solution was prepared to a final concentration of 0.175 mg/ml in 80% v/v acetonitrile and 20 mM ammonium acetate. Spectrogram acquisition of MS and MS-MS was realized with negative polarity.

Results

Identification of putative DGC and PDE proteins. By means of bioinformatic analysis over the complete genome sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and the draft genome sequences of *A. thiooxidans* ATCC 19377 and *A. caldus* ATCC 51756, we identified several putative-ORFs encoding DGCs and PDEs (table 1, white part) and effector proteins (table 1, grey part).

Table 1. Putative proteins identified by bioinformatic analysis involved in metabolism and signal transduction of c-di-GMP in *A. ferrooxidans* ATCC 23270, *A. thiooxidans* ATCC 19377 and *A. caldus* ATCC 51756.

c-di-GMP functional domains	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	<i>A. thiooxidans</i> ATCC 19377	<i>A. caldus</i> ATCC 51756
GGDEF	+	+	+
EAL	+	+	+
HD-GYP	-	-	-
HD	+	+	+
PilZ	+	+	+
PelD	-	+	+
FleQ	+	+	+

Many of the predicted proteins possess sensor domains suggesting that the DGC and PDE activities of these three *Acidithiobacillus* sp. could be regulated by different environmental signals, as it occurs in other Gram-negative bacteria. Interestingly, a comparative analysis revealed that the genetic contexts of these genes are conserved among *A. thiooxidans* and *A. caldus*.

***A. ferrooxidans* and *A. caldus* cells synthesize c-di-GMP molecules.** By using MS-MS analysis, the characteristic c-di-GMP fragmentation peaks have been identified in the total nucleotide fractions obtained from *A. ferrooxidans* and *A. caldus* cells. According to this result, RT-PCR and qPCR experiments demonstrated that several ORFs encoding DGCs proteins are transcribed in both

ORIGINAL ARTICLE

The extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* possesses a c-di-GMP signalling pathway that could play a significant role during bioleaching of minerals

L.M. Ruiz¹, M. Castro¹, A. Barriga², C.A. Jerez³ and N. Guiliani¹

¹ Laboratorio de Comunicaciones Bacterianas, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

² CEPEDEQ, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile

³ Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, e Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB), Universidad de Chile, Santiago, Chile

Keywords

Acidithiobacillus ferrooxidans, biofilm, bioleaching, c-di-GMP, extremophile.

Correspondence

N. Guiliani, Laboratorio de Comunicaciones Bacterianas, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras, 3425 Ñuñoa, 780-0024, Santiago, Chile.
E-mail: nguilian@uchile.cl

2011/0945: received 7 June 2011, revised 14 November 2011 and accepted 15 November 2011

doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03180.x

Abstract

Aims: The primary goal of this study was to characterize the existence of a functional c-di-GMP pathway in the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Methods and Results: A bioinformatic search revealed that the genome sequence of *At. ferrooxidans* ATCC 23270 codes for several proteins involved in the c-di-GMP pathway, including diguanylate cyclases (DGC), phosphodiesterases and PilZ effector proteins. Overexpression in *Escherichia coli* demonstrated that four *At. ferrooxidans* genes code for proteins containing GGDEF/EAL domains with functional DGC activity. MS/MS analysis allowed the identification of c-di-GMP in nucleotide preparations obtained from *At. ferrooxidans* cells. In addition, c-di-GMP levels in cells grown on the surface of solid energetic substrates such as sulfur prills or pyrite were higher than those measured in ferrous iron planktonic cells.

Conclusions: *At. ferrooxidans* possesses a functional c-di-GMP pathway that could play a key role in *At. ferrooxidans* biofilm formation during bioleaching processes.

Significance and Impact of the Study: This is the first global study about the c-di-GMP pathway in an acidophilic bacterium of great interest for the bio-mining industry. It opens a new way to explore the regulation of biofilm formation by biomining micro-organisms during the bioleaching process.

Introduction

Acidithiobacillus ferrooxidans is an acidophilic Gram-negative bacterium whose energetic metabolism is responsible for the solubilization of metals present in ores, and therefore, the micro-organisms are directly involved in bio-mining. Adherence of *At. ferrooxidans* to the mineral surface and subsequent biofilm formation can improve the leaching efficiency (Schippers and Sand 1999; Rohwerder *et al.* 2003). Therefore, there is great interest in understanding the molecular mechanisms involved in biofilm formation by this acidophilic bacterium. *At. ferrooxidans* forms a monolayer biofilm composed by bacterial

cells embedded in an exopolysaccharide (EPS) matrix whose role is fundamental in creating a special microenvironment that favours mineral dissolution by oxidation (Harneit *et al.* 2006; Sand and Gehrke 2006).

C-di-GMP has been recognized as an important bacterial second messenger involved in the regulation of several physiological processes (Hengge 2009; Romling and Simm 2009; Schirmer and Jenal 2009). This messenger plays a central role in controlling surface attachment in many bacterial systems by regulating the transition from planktonic to biofilm lifestyles through the control of EPS production, biosynthesis of pili and flagellum and flagellar motor speed (Garcia *et al.* 2004; Hickman *et al.* 2005;

Thormann *et al.* 2006; Armitage and Berry 2010). C-di-GMP is synthesized by diguanylate cyclase (DGC) and degraded by phosphodiesterase (PDE) enzymes. DGC proteins are characterized by a GGDEF domain whereas PDE proteins can present EAL or HD-GYP domains. Five classes of c-di-GMP effector proteins capable of binding c-di-GMP molecules including PilZ domain have been identified until now (Newell *et al.* 2009; Schirmer and Jenal 2009; Tao *et al.* 2010).

During the course of identifying molecular mechanism that regulates biofilm formation in extremophilic bacteria involved in bioleaching processes, we previously reported the existence of a functional quorum-sensing system in *At. ferrooxidans* (Farah *et al.* 2005; Ruiz *et al.* 2008). Here, we present the first evidence for a functional c-di-GMP pathway in the acidophilic bacteria *At. ferrooxidans*. The intracellular levels of c-di-GMP increase in this microorganism during its biofilm lifestyle. These results in turn strongly suggest a key role for these signalling molecules during bacteria–mineral interactions.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

This study was carried out with the *At. ferrooxidans* type strain ATCC 23270. It was grown as described previously in ferrous iron-containing modified 9K medium (M9K) at pH 1.5 or in DSMZ medium 71 containing 20 mmol l⁻¹ thiosulfate at pH 4.4 and in elemental sulfur prills (Ramirez *et al.* 2004). Pyrite and a copper concentrate were kindly provided by W. Sand and C. Demergasso, respectively, and were used to 50 g l⁻¹ in modified 9K medium (M9K) at pH 1.5 (Demergasso *et al.* 2005; Ruiz *et al.* 2008).

Bioinformatic tools

Protein domains involved in c-di-GMP pathway (EAL, GGDEF, HD-GYP and PilZ) were used as queries to search in the genome sequence of *At. ferrooxidans* (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/shared/Genomes.cgi>) by using Artemis software (Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/artemis/>). The potential candidate proteins identified with Artemis were used to formulate a BlastP search at the nonredundant NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

C-di-GMP purification from *At. ferrooxidans*

Total nucleotides were extracted from *At. ferrooxidans* with organic solvents as described previously (Hisert *et al.* 2005). Cellular pellets obtained by centrifugation were

washed twice with acidified water at pH 2.0 (H₂SO₄) followed by a wash with sodium citrate (pH 7.0). Washed cells were then resuspended in 1 ml of 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl, pH 8.5 and disrupted by sonication on ice. Afterwards, lysates were centrifugated at 15 800 g for 30 min at 4°C, and the supernatants were saved. Subsequently, one volume of supernatant was combined with one volume of chloroform, four volumes of methanol and three volumes of nanopure water. Finally, after pelleting proteins and nucleic acids by centrifugation, the aqueous phase rich in nucleotides was evaporated under vacuum and stored at -80°C.

At. ferrooxidans cells present in biofilms formed on sulfur prills, pyrite or a copper concentrate, were separated from planktonic cells by centrifugation at low speed (3000 g). The colonized solid substrates were then washed three times with fresh M9K medium to remove the remaining planktonic cells. Colonized solid substrates were then incubated with fresh M9K medium supplemented with 0.05% of Triton X-100 for 5 min at 20°C and vortexed to release adhered cells that were recovered by centrifugation. Finally, cell pellets obtained from colonized solid substrates were processed as indicated above.

Detection and quantification of c-di-GMP by mass spectrometric analysis

Measurements were performed as previously described (Waters *et al.* 2008). Synthetic c-di-GMP was prepared in 80% acetonitrile and 20 mmol l⁻¹ ammonium acetate. Nucleotidic extracts from *At. ferrooxidans* and *Escherichia coli* were diluted 1:10 in 80% acetonitrile per 20 mmol l⁻¹ ammonium acetate. The spectrograms were obtained with an electrospray-ionization (ESI) ion-trap (IT) mass spectrometer (MS) Esquire 4000 ESI-IT (Bruker Daltonics, Inc., MA, USA). Synthetic c-di-GMP and samples were loaded directly into the ESI-IT-MS. The flux was 2.5 µl min⁻¹. The nebulization was performed at 300°C, 10.0 psi and 5 l min⁻¹. Samples were analysed in negative-ion detection mode. Based on (i) the *m/z* 689 [M-H]⁻ of the molecular ion and (ii) *m/z* signals 344 and 538 obtained by MS/MS fragmentation pattern of the molecular ion, synthetic c-di-GMP was used as a reference to identify c-di-GMP in the nucleotidic extracts obtained from the cells. To quantify c-di-GMP levels in nucleotide extracts from *At. ferrooxidans*, samples were analysed by HPLC (Agilent 1100, Agilent Technologies) coupled to mass spectrometry. A C18 column (150 × 1.0 mm; 4 µm and 90 Å) (Jupiter-Proteo, Phenomenex Inc., CA, USA) was directly connected to the MS. HPLC separations were performed with a 10 mmol l⁻¹ tributylamine, 15 mmol l⁻¹ acetic acid and 3% methanol solution and a methanol gradient.

All four *At. ferrooxidans* proteins with GGDEF/EAL domains have a DGC activity in *E. coli*

RT-PCR measurements revealed that AFE0053, AFE1360, AFE1373 and AFE1379 were transcribed (not shown). Thus, all genes encoding for both GGDEF/EAL domains were cloned and overexpressed in *E. coli*, and the four recombinant strains were tested for the cellulose-production phenotype, which is related to the intracellular levels of c-di-GMP, c-di-GMP synthesis and PDE activity.

On agar plates supplemented with CR, *E. coli* strains transformed with a plasmid harbouring a gene encoding for a DGC enzyme developed colonies with a characteristic red colour because of the binding of CR to cellulose (Spiers *et al.* 2003; Lee *et al.* 2007). Under our experimental conditions, no change was observed in the recombinant strain harbouring *At. ferrooxidans* AFE0053 gene compared with the negative control (pET-21b) (Fig. 1a). However, the levels of CR-binding after IPTG induction increased 2-fold in strains harbouring *At. ferrooxidans* ORFs AFE1360 and AFE1373 (Fig. 1a), strongly suggesting that both genes code for DGC enzymes. As cloning of AFE1379 gene into pET-21b failed, it was cloned into the overexpression vector pBADTOPO and transformed into the *E. coli* TOP10 strain. To compare the result obtained from the pBADTOPO::AFE1379 construction with the previous results, genes AFE0053 and AFE1360 were also cloned in this overexpression vector. Results obtained with the pBADTOPO::AFE0053 and pBADTOPO::AFE1360 constructs (Fig. 1b) were similar to those previously seen when using pET21b (Fig. 1a). On the other hand, the strain harbouring the plasmid pBADTOPO::AFE1379 gave no differences compared with the control (Fig. 1b). C-di-GMP levels strongly increased in the four recombinant strains compared with those of control strains (Table 2; Fig. S4). These results strongly suggest that AFE0053, AFE1360, AFE1373 and AFE1379 code for active DGC proteins with different functional specificities resulting on CR-binding differences.

Apparent role of c-di-GMP pathway in the regulation of biofilm formation in *At. ferrooxidans*

C-di-GMP levels were determined in planktonic and attached sulfur-grown bacterial subpopulations present in the same culture (Fig. 2a) and in *At. ferrooxidans* cells grown in different substrates (Fig. 2b). C-di-GMP levels increased 11-fold in cells conforming a biofilm on sulfur prills (568 ± 199.3 ng c-di-GMP per mg protein) compared with those of planktonic cells (56.4 ± 20.1 ng c-di-GMP per mg protein) harvested from the same culture (Fig. 2a). In agreement with this result, c-di-GMP levels were higher also (from 25- to 190-fold) in attached

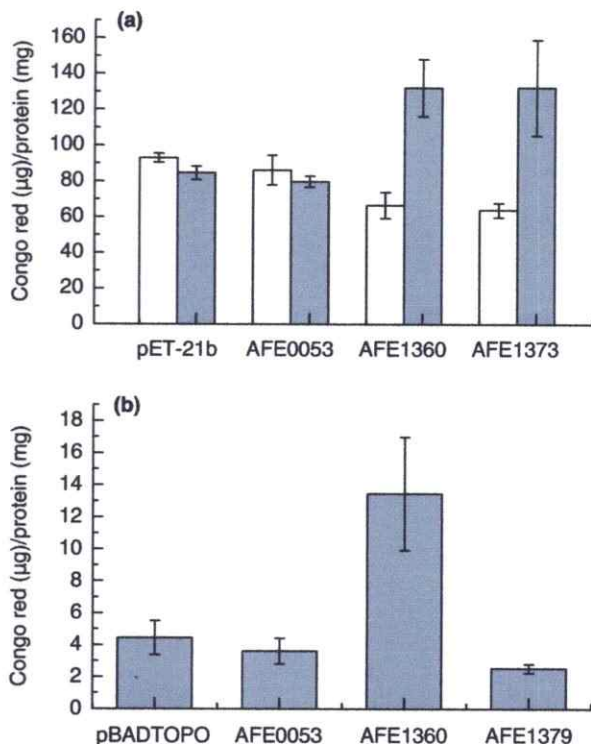


Figure 1 Phenotypic characterization of *Escherichia coli* BL21 (DE3) strain overexpressing genes coding proteins with GGDEF/EAL domains from *Acidithiobacillus ferrooxidans*. (a) Quantification of Congo red (CR)-binding to different *E. coli* BL21(DE3) strains expressing the genes coding for diguanylate cyclases (DGC)/ phosphodiesterase (PDE). White bars (without IPTG), black bars (with IPTG). (b) Quantitative analysis of CR-binding to *E. coli* TOP10 strains expressing *At. ferrooxidans* proteins with DGC/PDE domains cloned in pBADTOPO vector and induced by arabinose. As negative control pBADTOPO without insert was used.

Table 2 Relative quantities of *m/z* 344 signal evaluated by MS/MS analysis of nucleotide extracts from induced *Escherichia coli* strains transformed with *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes cloned in expression vectors pET-21b or pBADTOPO

	C-di-GMP relative quantity
pET21b/BL21+ I	1
AFE0053::pET21b/BL21+ I	50
AFE1360::pET21b/BL21+ I	12
AFE1373::pET21b/BL21+ I	45
pBADTOPO/TOP10+ A	1 (ND)
AFE1379::pBADTOPO/TOP10+ A	>145

I, IPTG; A, arabinose; ND, not detected.

cells grown on solid substrates than in planktonic cells grown on soluble substrate such as iron sulphate (Fig. 2b). These results strongly suggest that the c-di-GMP pathway is involved in biofilm formation in *At. ferrooxidans*.

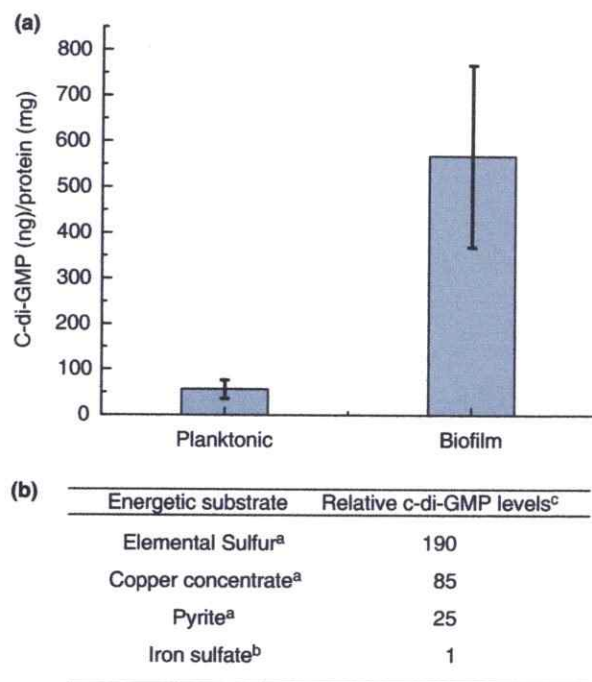


Figure 2 Analysis of c-di-GMP levels in *Acidithiobacillus ferrooxidans* by HPLC coupled to mass spectrometry. (a) *At. ferrooxidans* cells grown on sulfur (prills) medium. (b) *At. ferrooxidans* cells grown with different energy substrates. ^aSolid substrate, ^bSoluble substrate. Only attached cells were analysed when solid substrates were used. ^cRelative fold numbers are related to the basal level obtained in iron sulfate soluble substrate.

Discussion

Development of prokaryotic biofilms on mineral surfaces can contribute to enhanced leaching activities. This could be advantageous in biomining operations, but it is strongly negative for the environment in case of acid mine drainage generation (AMD). Therefore, studies to define new strategies to control biofilm formation are highly relevant (Farah *et al.* 2005; Ruiz *et al.* 2008). Except for our preliminary reports (Ruiz *et al.* 2007; Castro *et al.* 2009), no data were available for the c-di-GMP pathway in acidophilic leaching bacteria until now.

With only five ORFs involved in c-di-GMP metabolism, *At. ferrooxidans* genome, this signalling pathway in this bacterium has a lower complexity than that in several other bacterial species (Romling *et al.* 2005; Simm *et al.* 2007). In addition, as the four *At. ferrooxidans* proteins with GGDEF/EAL domains were able to synthesize c-di-GMP in *E. coli* recombinant strains (Fig. S4) and no change in PDE activity was detected (not shown), the PDE activity in *At. ferrooxidans* could be exclusively generated by the protein containing a single EAL domain (AFE1852).

The increased levels of c-di-GMP in cells adhered to solid energetic substrates compared with those in planktonic cells clearly indicate a role for the c-di-GMP pathway in biofilm formation by *At. ferrooxidans*. This is in agreement with previous results that by transcriptomic analysis revealed that proteins with GGDEF/EAL domains are preferentially expressed in the biofilm state of another Gram-negative iron-oxidizing bacteria (*Leptospirillum* spp.) living together with *At. ferrooxidans* in streamers (macroscopic biofilms) (Moreno-Paz *et al.* 2010). On the other hand, previous reports concluded that QS is also involved in regulation of biofilm formation by *At. ferrooxidans* (Farah *et al.* 2005; Rivas *et al.* 2005; Ruiz *et al.* 2008). All these results suggest that as it occurs in other Gram-negative bacteria (Ueda and Wood 2009), the QS system and the c-di-GMP pathway should be connected allowing *At. ferrooxidans* to switch from planktonic to biofilm lifestyle based on the integration of both environmental signals and cell density.

Twitching motility mediated by type IV pili and flagellar motility are regulated by proteins with the PilZ domain. In addition, twitching motility is required for the development of a biofilm structure (Kazmierczak *et al.* 2006; Guzzo *et al.* 2009; Paul *et al.* 2010). Results reported here allowed the identification of two putative c-di-GMP effector proteins with a PilZ domain. As conserved *fla* and *che* genes coding for flagella and chemotaxis functions respectively have not been identified in the genome of *At. ferrooxidans* (Valdes *et al.* 2008), c-di-GMP signalling pathway in this bacteria may be involved only in the regulation of twitching motility, controlling biofilm formation and mineral colonization.

Finally, this is the first global study on the c-di-GMP pathway in an acidophilic bacterium of great interest for the biomining industry. It opens a new way to explore molecular adaptation mechanisms in biomining microorganisms, especially on the regulation of the way of life of *At. ferrooxidans* in a biofilm state.

Acknowledgements

This work was supported by grant FONDECYT 1080441. L.M. Ruiz was supported by scholarships from DAAD (2004–2008) and CONICYT (2008–2009). M. Castro was supported by a doctoral fellowship MECESUP UCH 04/07. We thank the Institute of Genome Research (TIGR) and Integrated Genomics, Inc. (IG), for the use of their *At. ferrooxidans* genome sequences. We acknowledge N. Amiot and U. Jenal from Biozentrum (University of Basel, Switzerland) who kindly provided us synthetic c-di-GMP and the BL21(DE3) strain overexpressing the DGC PleD from *Caulobacter crescentus*, respectively.

References

- Armitage, J.P. and Berry, R.M. (2010) Time for bacteria to slow down. *Cell* **141**, 24–26.
- Castro, M., Ruiz, L.M., Barriga, A., Jerez, C.A., Holmes, D. and Guiliani, N. (2009) C-di-GMP pathway in biomining bacteria. *Adv Mat Res* **71–73**, 223–226.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Folcher, M., Schauerer, A. and Jenal, U. (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**, 30829–30837.
- Demergasso, C.S., Galleguillos, P.A., Escudero, L.V., Zepeda, V.J., Castillo, D. and Casamayor, E.O. (2005) Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy* **80**, 241–253.
- Farah, C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A. and Guiliani, N. (2005) Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7033–7040.
- Garcia, B., Latasa, C., Solano, C., Portillo, F.G., Gamazo, C. and Lasa, I. (2004) Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* **54**, 264–277.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D.I. and Metz, F. (1999) ESPript: multiple sequence alignments in Postscript. *Bioinformatics* **15**, 305–308.
- Guzzo, C.R., Salinas, R.K., Andrade, M.O. and Farah, C.S. (2009) PilZ protein structure and interactions with PilB and the FimX EAL domain: implications for control of type IV pilus biogenesis. *J Mol Biol* **393**, 848–866.
- Harneit, K., Goksel, A., Kock, D., Klock, J.H., Gehrke, T. and Sand, W. (2006) Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **83**, 245–254.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**, 263–273.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F. and Harwood, C.S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14422–14427.
- Hisert, K.B., MacCoss, M., Shiloh, M.U., Darwin, K.H., Singh, S., Jones, R.A., Ehrt, S., Zhang, Z. et al. (2005) A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol Microbiol* **56**, 1234–1245.
- Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B. and Murray, T.S. (2006) Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **60**, 1026–1043.
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Lory, S. (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* **65**, 1474–1484.
- Moreno-Paz, M., Gomez, M.J., Arcas, A. and Parro, V. (2010) Environmental transcriptome analysis reveals physiological differences between biofilm and planktonic modes of life of the iron oxidizing bacteria *Leptospirillum* spp. in their natural microbial community. *BMC Genomics* **11**, 404.
- Newell, P.D., Monds, R.D. and O'Toole, G.A. (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3461–3466.
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F. and Harshey, R.M. (2010) The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a "Backstop Brake" mechanism. *Mol Cell* **38**, 128–139.
- Ramirez, P., Guiliani, N., Valenzuela, L., Beard, S. and Jerez, C.A. (2004) Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4491–4498.
- Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D.S. and Jedlicki, E. (2005) A lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol Res* **38**, 283–297.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. and Sand, W. (2003) Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**, 239–248.
- Romling, U. and Simm, R. (2009) Prevailing concepts of c-di-GMP signaling. *Contrib Microbiol* **16**, 161–181.
- Romling, U., Gomelsky, M. and Galperin, M.Y. (2005) C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol Microbiol* **57**, 629–639.
- Ruiz, L.M., Sand, W., Jerez, C.A. and Guiliani, N. (2007) C-di-GMP pathway in *Acidithiobacillus ferrooxidans*: analysis of putative diguanylate cyclases (DGCs) and phosphodiesterases (PDEs) bifunctional proteins. *Adv Mat Res* **20–21**, 551–555.
- Ruiz, L.M., Valenzuela, S., Castro, M., Gonzalez, A., Frezza, M., Souler, L., Rohwerder, T., Queneau, Y. et al. (2008) AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency. *Hydrometallurgy* **94**, 133–137.
- Sand, W. and Gehrke, T. (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res Microbiol* **157**, 49–56.
- Schippers, A. and Sand, W. (1999) Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl Environ Microbiol* **65**, 319–321.
- Schirmer, T. and Jenal, U. (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signaling. *Nature Rev* **7**, 724–735.
- Simm, R., Lusch, A., Kader, A., Andersson, M. and Romling, U. (2007) Role of EAL-containing proteins in multicellular

- behavior of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J Bacteriol* **189**, 3613–3623.
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M. and Rainey, P.B. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* **50**, 15–27.
- Tao, F., He, Y.W., Wu, D.H., Swarup, S. and Zhang, L.H. (2010) The cyclic nucleotide monophosphate domain of *Xanthomonas campestris* global regulator Clp defines a new class of cyclic di-GMP effectors. *J Bacteriol* **192**, 1020–1029.
- Tchigvintsev, A., Xu, X., Singer, A., Chang, C., Brown, G., Proudfoot, M., Cui, H., Flick, R. et al. (2010) Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J Mol Biol* **402**, 524–538.
- Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M. and Spormann, A.M. (2006) Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J Bacteriol* **188**, 2681–2691.
- Ueda, A. and Wood, T.K. (2009) Connecting quorum sensing, c-di-GMP, Pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). *PLoS Pathog* **5**, e1000483.
- Valdes, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R.J., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J.A. and Holmes, D.S. (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* **9**, 597.
- Waters, C.M., Lu, W.Y., Rabinowitz, J.D. and Bassler, B.L. (2008) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J Bacteriol* **190**, 2527–2536.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1 Sequence alignments of the four GGDEF domains from *Acidithiobacillus ferrooxidans* with known GGDEF domains. Essential amino acid residues (Schirmer

and Jenal 2009) for diguanylate cyclases activity (blue stars) and c-di-GMP feedback inhibition (green and red stars) are noted. The figure was produced with ESPript (Gouet et al. 1999).

Figure S2 Sequence alignments of the five EAL domains from *Acidithiobacillus ferrooxidans* with TBD1265 from *Thiobacillus denitrificans*. Residue numbers and secondary structure at the top correspond to TBD1265. Partly and highly conserved residues are indicated by grey and black boxes, respectively. Essential residues for catalysis and structure of the active site (Tchigvintsev et al. 2010) are noted by blue stars. E546 strongly involved in phosphodiesterase activity (Tchigvintsev et al. 2010) is indicated by black dot. The figure was produced with ESPript (Gouet et al. 1999).

Figure S3 Production of c-di-GMP by *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells grown in thiosulfate. (A) Synthetic c-di-GMP spectrograms. MS spectrogram shows a strong signal, 689 m/z ([M-H]⁻) (black diamond) that is equivalent to 690 g mol⁻¹ of nominal mass. The 689 m/z signal was fragmented, and several specific signals (▼) were obtained out of which 344 m/z and 538 m/z were the strongest. (B) Spectrograms of nucleotides extracted from *At. ferrooxidans*. The second MS-step allowed the identification of the specific c-di-GMP fragments m/z 344 (343,9) and m/z 538.

Figure S4 HPLC-MS/MS analysis of nucleotidic extracts from *Escherichia coli* strains overexpressing *Acidithiobacillus ferrooxidans* GGDEF/EAL proteins. Higher levels of the specific fragments 344 m/z and 538 m/z (▼) were identified in all recombinant strains (C-E, G) compared with those in the controls (A, B and F).

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author.

microorganisms. In addition, RT-PCR studies revealed that some *pilZ* genes from *A. ferrooxidans* and *A. caldus* are expressed.

Conclusions

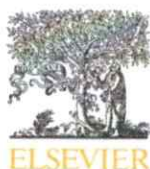
According to our results, c-di-GMP molecules and the molecular elements involved in its metabolism and the signal transduction are present in different bacterial members of biomining consortia. Therefore, we strongly suggest that *A. ferrooxidans*, *A. caldus* and *A. thiooxidans* possess a functional c-di-GMP pathway. This should be involved in the regulation of the transition between planktonic and biofilm lifestyles, as it occurs in many bacteria. Thus, our work opens a new way to explore the molecular mechanisms involved in the regulation of biofilm formation in biomining bacteria.

Acknowledgments

This work was supported by projects FONDECYT 1080441, 1090451, ICM P-05-001-F. M. Castro was supported by a doctoral grant MECESUP UCh-0407.

References

- [1] D. E. Rawlings: *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 56 (2002), p. 65
- [2] H.R. Watling: *Hydrometallurgy* Vol. 84 (2006), p. 81
- [3] K. Harneit, A. Göksel, D. Kock, J. H. Klock, T. Gehrke and W. Sand: *Hydrometallurgy* Vol. 8 (2006), p. 3245
- [4] C. Pogliani and E. Donati: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 22 (1999), p. 88
- [5] A. J. Wolfe and K. L. Visick: *J. Bacteriol.* Vol. 190 (2008), p. 463
- [6] R. Simm, M. Morr, A. Kader, M. Nimtz and U. Römling: *Mol. Microbiol.* Vol. 53 (2004), p. 123
- [7] A. L. Chang, J. R. Tuckerman, G. Gonzalez, R. Mayer, H. Weinhouse, G. Volman, D. Amikam, M. Benziman, and M. A. Gilles-Gonzalez: *Biochemistry* Vol. 40 (2001), p. 3420
- [8] D.A. Ryjenkov, M. Tarutina, O.V. Moskvina and M. J. Gomelsky: *J. Bacteriol.* Vol. 187 (2005), p. 1792
- [9] U. Romling, M. Gomelsky and M.Y. Galperin: *Mol. Microbiol.* Vol. 57 (2005), p. 629
- [10] D. A. Ryjenkov, R. Simm, U. Romling, and M. Gomelsky: *J. Biol. Chem.* Vol. 281 (2006), p. 303
- [11] M. Christen, B. Christen, M. G. Allan, M. Folcher, P. Jenö, S. Grzesiek and U. Jenal: *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 104 (2007), p. 4112
- [12] J. W. Hickman and C. S. Harwood: *Mol. Microbiol.* Vol. 69 (2008), p. 376
- [13] V. T. Lee, J. M. Matewish, J. L. Kessler, M. Hyodo, Y. Hayakawa and S. Lory: *Mol. Microbiol.* Vol. 65 (2007) p. 1474
- [14] N. Sudarsan, E. R. Lee, Z. Weinberg, R. H. Moy, J. N. Kim, K. H. Link, R. R. Breaker: *Science* Vol. 321 (2008), p. 411
- [15] L. M. Ruiz, W. Sand, C. A. Jerez and N. Guiliani: *Adv. Mat. Res.* Vols. 20-21 (2007), p. 551.
- [16] P. Ramirez, N. Guiliani, L. Valenzuela, S. Beard and C.A. Jerez: *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 70 (2004), p. 4491
- [17] M. Dopson and E. B Lindstrom: *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65 (1999), p. 36
- [18] K. B. Hisert, M. MacCoss, M. U. Shiloh, K. H. Darwin, S. Singh, R. A. Jones, S. Ehrhart, Z. Zhang, B. L. Gaffney, S. Gandotra, D. W. Holden, D. Murray and C. A. Nathan: *Mol. Microbiol.* Vol. 56 (2005), p. 1234



AHL communication is a widespread phenomenon in biomining bacteria and seems to be involved in mineral-adhesion efficiency

Lina María Ruiz^a, Susana Valenzuela^a, Matias Castro^a, Alex Gonzalez^a, Marine Frezza^b, Laurent Soullère^b, Thore Rohwerder^c, Yves Queneau^b, Alain Doutheau^b, Wolfgang Sand^c, Carlos A. Jerez^a, Nicolas Guiliani^{a,*}

^a Bacterial Communication Unit, Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences and Institute for Cell Dynamics and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile

^b Laboratoire de Chimie Organique, UMR 5246-ICBMS CNRS, Université Lyon 1, INSA, Lyon, France

^c Biofilm Centre Aquatische Biotechnologie, Universität Duisburg – Essen, Duisburg, Germany

ARTICLE INFO

Available online 24 June 2008

Keywords:

Quorum sensing
Acyl-homoserine lactones
Biofilm
Biomining
A. ferrooxidans

ABSTRACT

Biofilm development plays a pivotal role in the bioleaching process. Quorum sensing (QS) is recognized as one of the main regulatory ways of extracellular polymeric substances (EPS) production and biofilm formation in bacteria. Previous works revealed that *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 strain possesses a functional QS type AI-1 system. However, there is neither available data concerning the presence of a QS system in other *A. ferrooxidans* strains nor any other biomining bacterial species. Thus, in this work, different strains of *A. ferrooxidans* (ATCC 19859, ATCC 1927, ATCC 33020, DSMZ 583, DSMZ 9464), *Acidithiobacillus thiooxidans* (DSMZ 504, DSMZ 9463, DSMZ 11478) and *Leptospirillum ferrooxidans* (DSMZ 2391, DSMZ 2705) were screened for their ability to produce QS-signaling molecules [acyl-homoserine lactone (AHLs)]. Thin-layer chromatography (TLC) analysis revealed that all the *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains produced AHL-signaling molecules while both tested *L. ferrooxidans* strains did not. Nevertheless, by using bioinformatic tools to screen the genome sequence of a *Leptospirillum* sp. type III belonging to an AMD biofilm, a QS type AI-1 locus in which the structural organization is different from that of *A. ferrooxidans* has been identified. The effect of synthetic AHLs and AHL-analogues on attachment of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to pyrite was analyzed. Interestingly, preliminary results suggested that some of these molecules change the rate and extent of bacterial attachment to pyrite. The production of AHLs by *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains, the identification of a QS type AI-1 locus in *Leptospirillum* sp. type III and the impact of AHLs and AHL-analogues on the pyrite adhesion of *A. ferrooxidans* cells open new perspectives for the (bio)mining industry to eventually improve bioleaching process and control the acid mine drainage (AMD) contamination.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The attachment and adhesion of acidophilic bacteria to the sulfidic energy source and the subsequent biofilm formation are prerequisites for mineral dissolution in natural environments and industrial operations. Therefore, a thorough understanding of the molecular mechanisms involved in the control and regulation of biofilm formation would be of great importance to control the bioleaching process from the biomining industry and the acid mine drainage (AMD) damages.

Biofilm formation is a complex process that can be regulated at different levels through diverse mechanisms. The most studied mechanism that controls biofilm development is quorum sensing (QS) signaling (Waters and Bassler, 2005). QS is a cell-to-cell signaling

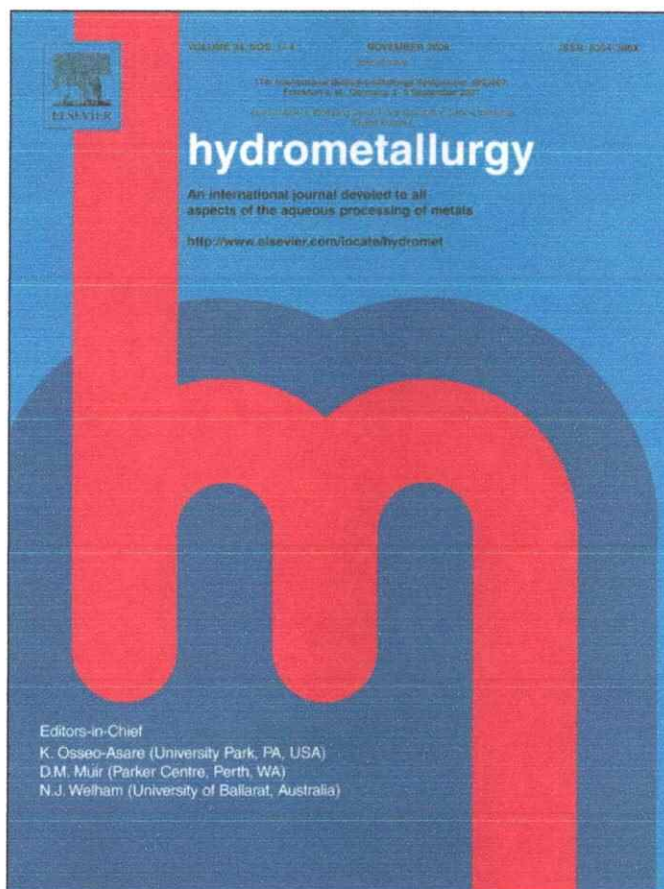
system that functions by means of diffusible autoinducer (AI) signal molecules that allow the regulation of cellular processes in a manner that depends on the density of the microbial population.

Recently, a functional QS system type AI-1 involving two divergent genes *afel* and *afeR* has been identified in the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Farah et al., 2005; Rivas et al., 2005). Overexpression of the protein Afel in *Escherichia coli* and the characterization of associated synthesis of AHLs demonstrated that Afel is an AHL synthase (Farah et al., 2005). *A. ferrooxidans* produces AHLs with acyl chains whose length oscillates between 8 and 16 carbons and presents substitutions of the type oxo- and hydroxyl- in C-3 (3-hydroxy-C8-AHL, 3-hydroxy-C10-AHL, C12-AHL, 3-oxo-C12-AHL, 3-hydroxy-C12-AHL, C14-AHL, 3-oxo-C14-AHL, 3-hydroxy-C14-AHL, and 3-hydroxy-C16-AHL). The AHL hydroxy substitution was independent of the nature of the culture medium whereas the keto substitution was displayed only in cells grown on sulfur and thiosulfate. Besides, the transcription of *afel* gene is higher in sulfur- and thiosulfate-grown cells with respect to iron-grown cells and appears to be related to phosphate metabolism (Farah et al., 2005). Based on this experimental background,

* Corresponding author. Unidad de Comunicación Bacteriana, Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Departamento de Biología, Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Tel.: +56 978 7241.

E-mail address: nguilian@uchile.cl (N. Guiliani).

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

different authors suggested that the QS system type AI-1 could regulate biofilm formation in *A. ferrooxidans* (Farah et al., 2005; Rivas et al., 2005; Valenzuela et al., 2006; Valenzuela et al., 2007).

This work attempts to examine if the quorum sensing type AI-1 system identified in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 is a widespread phenomenon in *A. ferrooxidans* species and other biomining bacteria. Knowledge of the molecular mechanisms that regulate biofilm formation in biomining bacteria such as *A. ferrooxidans* is limited. Therefore, the involvement of the AHL-signaling molecules in the attachment of the type strain *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to mineral surfaces was examined. Since marker exchange mutagenesis for the construction of QS mutants in *A. ferrooxidans* is still very difficult to carry out, we decided to use different synthetic AHLs and AHL-analogues that have been evaluated as potential inhibitors and/or activators of QS in other microorganisms (Castang et al., 2004; Geske et al., 2005; Frezza et al., 2006).

2. Materials and methods

2.1. Bacteria

The following strains of biomining bacteria obtained from culture collections were used: (i) six strains of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 type strain, ATCC 19859, ATCC 1927, ATCC 33020, DSMZ 583, DSMZ 9464; (ii) three strains of *Acidithiobacillus thiooxidans* DSMZ 504, DSMZ 9463, DSMZ 11478; two strains of *Leptospirillum ferrooxidans* DSMZ 2391, DSMZ 2705.

2.2. Growth media and culture conditions

A. ferrooxidans strains were grown in ferrous iron-containing modified 9K medium at pH 1.5 as described previously, and growth on elemental sulfur was done at pH 2.5 with 5% (wt/v) sulfur prills (Amaro et al., 1991). Growth of *A. ferrooxidans* strains in thiosulfate was done at pH 4.6 in DSMZ medium 71 containing 20 mM thiosulfate as described before (Ramírez et al., 2004). *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* strains were grown on their corresponding DSMZ medium.

2.3. Southern analysis

Genomic DNAs were obtained by using the Wizard Genomic DNA Purification Kit for Gram-negative bacteria, as described by Promega. 5 µg of purified genomic DNA was digested by EcoRI and HindIII restriction enzymes (New England Biolabs) at 37 °C during 4 h. After separation of the restriction enzyme-digested DNA fragments by electrophoresis, they were denatured and transferred to a positively charged nylon membrane (Immobilon-NY+; Millipore) by the semi-dry capillary method (Sambrook and Russel, 1989). ³²P labelled-*afel* probe was obtained by using the NEBlot kit (New England Biolabs) according to the manufacturer's recommendations. Prehybridizations and hybridizations were accomplished as described by Sambrook and Russel (1989). ³²P-signal detection was carried out by using the PhosphorImager (Molecular Imager FX; Biorad).

2.4. AHL-signaling molecules determination

Extracts for analytical thin-layer chromatography (TLC) and LC-MS-MS were prepared from 600-ml cultures. Bacteria were removed by centrifugation and the supernatant was extracted twice with equal volumes of dichloromethane (DCM) as described previously (Farah et al., 2005). Extracts were then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and evaporated to dryness.

For TLC plate analysis, dried samples were dissolved in 30–60 µl of HPLC-grade ethyl acetate. Samples (20–40 µl) were spotted onto C₁₈ reversed-phase TLC plates (Merck) along with a set of standards and developed with methanol/water (60:40; vol/vol). After development,

the TLC plates were air-dried and AHL-signaling molecules were detected by using as a bioreporter *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) as described previously (Shaw et al., 1997). Briefly, 250 µl of an overnight culture of *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) AHL reporter strain grown in 25-ml LB medium with gentamicin 25 µg/ml was inoculated in AB minimal glucose medium (ABm) and grown during 8 h at 30 °C with shaking. The culture was then mixed with an equal volume of 1.5% TOP agar containing 80 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal), and the preparation was spread over the surface of developed TLC plates. Overlaid TLC plates were incubated overnight at 30 °C in a closed plastic container. Production of AHL is visualized by the development of a blue color.

For LC-MS-MS analysis, residues were dissolved in 0.5 ml of HPLC-grade acetonitrile and analyzed by using reverse-phase liquid chromatography coupled with positive-ion electrospray ionization and ion trap mass spectrometry (LC-MS-MS) (Morin et al., 2003). In the case of 3-hydroxy-AHLs, their identification was done by comparison with synthetic 3-hydroxy-AHLs based on three criteria: MS-MS fragmentation product ions ([M+H-H₂O]⁺ and *m/z* 102), their relative intensities and HPLC retention times.

2.5. Attachment assay

This assay was carried out only with the type strain of *A. ferrooxidans*, ATCC 23270. It is based on the reduction of the number of planktonic cells in the solution due to the attachment of the bacteria to a mineral sulfide substratum (Gehrke et al., 1998; Harneit et al., 2006). Pyrite (FeS₂) (Suior mine in Baia Mare, Romania) was the substratum used for the attachment assay. Ground FeS₂ was wet sieved to a grain size of 50–100 µm (Test sieves, Retsch, Germany). To remove ferric iron, the FeS₂ was boiled in 6 N HCl with stirring for 1 h. Then, the HCl was removed by washing extensively with distilled H₂O. Next, sulfur compounds were extracted from the FeS₂ by washing twice with acetone. Finally, FeS₂ aliquots were put under vacuum and gassed with nitrogen and sterilized at 115 °C for 48 h (Schippers and Sand, 1999). For the attachment assay, 5 × 10⁹ cells were incubated with 20% (w/v) FeS₂ in a final volume of 50-ml mineral salt solution in 100-ml Erlenmeyer flask. *A. ferrooxidans* ATCC 23270 grown in FeSO₄ medium was harvested in the late exponential growth phase. Harvesting was performed by cross flow filtration (Hemoflow F60S, Fresenius, Germany) or centrifugation for 20 min at 6000 ×g, at 10 °C and the cells thus obtained were resuspended in 50 ml of mineral salts solution. Then, cell concentration was determined using a Thoma counting chamber (depth 0.02 mm, smallest square area 0.0025 mm²). Subsequently, cell concentration was adjusted at 1 × 10⁸ cells per ml. Next, this cell suspension was distributed among 100-ml Erlenmeyer flasks. Bacteria harvested by centrifugation were supplemented with 0.2 g of ferric iron l⁻¹ and kept overnight at 17 °C to regenerate their EPS. Afterwards, AHLs or AHL-analogues were added and the mix was incubated for 1 h at 30 °C, at 180 rpm. Subsequently, 10 g of FeS₂ was added to each Erlenmeyer flask containing the assay mixture and agitated on a benchtop shaker (Type TR, Infors HT, Switzerland) at 120 rpm and room temperature for 8 h. Samples (1 ml) of the culture supernatant were taken at specific time intervals and the cell concentration was determined using a Thoma counting chamber. Cell counting was done with a light microscope (Zeiss) in phase contrast mode with 400-fold magnification.

3. Results

3.1. Quorum sensing type AI-1 system and biomining bacteria

In previous experiments, we reported that *A. ferrooxidans* type strain possesses a functional QS type AI-1 system and is able to produce nine different kinds of AHL-signaling molecules (Farah et al., 2005). To examine if the QS type AI-1 system is a widespread phenomenon in biomining bacteria, we analyzed if other strains of *A.*

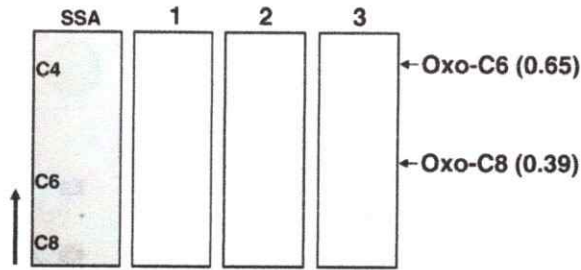


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of the AHL-signaling molecules purified from spent culture supernatant of *A. thiooxidans* strains DSMZ 504 (1), DSMZ 9463 (2) DSMZ 11478 (3). Detected molecules are indicated by arrows and respective Rf values are noted. SSA, Standard of synthetic AHLs composed of C4-AHL, C6-AHL and C8-AHL. The direction of solvent migration is marked with a vertical arrow.

ferrooxidans and other members of the biomining community, such as *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans*, are capable of producing AHL-signaling molecules. Dichloromethane extracts of spent culture supernatants were subjected to C_{18} reversed-phase TLC and tested for their ability to activate the *A. tumefaciens* reporter strain, as described in Materials and methods. This experiment revealed that all the tested *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains produce AHL-signaling molecules while no reporter activity was detected in the *L. ferrooxidans* extracts suggesting that DSMZ 2391 and DSMZ 2705 strains of this bacterial species which belongs to *Leptospirillum* sp. type I, do not produce detectable amount of AHL-signaling molecules. However, a bioinformatic analysis of the complete and partial genome sequences of microorganisms present in an AMD biofilm (Tyson et al., 2004) allowed us to identify a QS type AI-1 locus for *Leptospirillum* sp. type III, as previously reported (Valenzuela et al., 2007). This locus is composed of two convergent genes, *lrrR* and *lrrI* (for *Leptospirillum* sp. type three), which code for putative proteins that are 50% and 59% similar to R and I proteins from *Geobacter uraniumreducens* Rf4. A third ORF was identified in the *lrrR* intergenic region and it coded for a protein with 42% similarity to a transposase from *Bacillus halodurans* C-125.

The identified AHL-signaling molecules obtained for the three *A. thiooxidans* strains are shown in Fig. 1. The characteristic tailing spot (Shaw et al., 1997) and the estimated Rf values allowed us to determine that all the *A. thiooxidans* strains synthesize 3-oxo-C8-AHL (Fig. 1, lanes 1–3). Moreover, the DSMZ 11478 strain also produced 3-oxo-C6-AHL (Fig. 1, lane 3). As the same relative supernatant quantities were spotted onto the TLC plates, in our experimental conditions, the strain DSMZ 11478 appeared to overproduce oxo-C6-AHL and oxo-C8-AHL compared with the

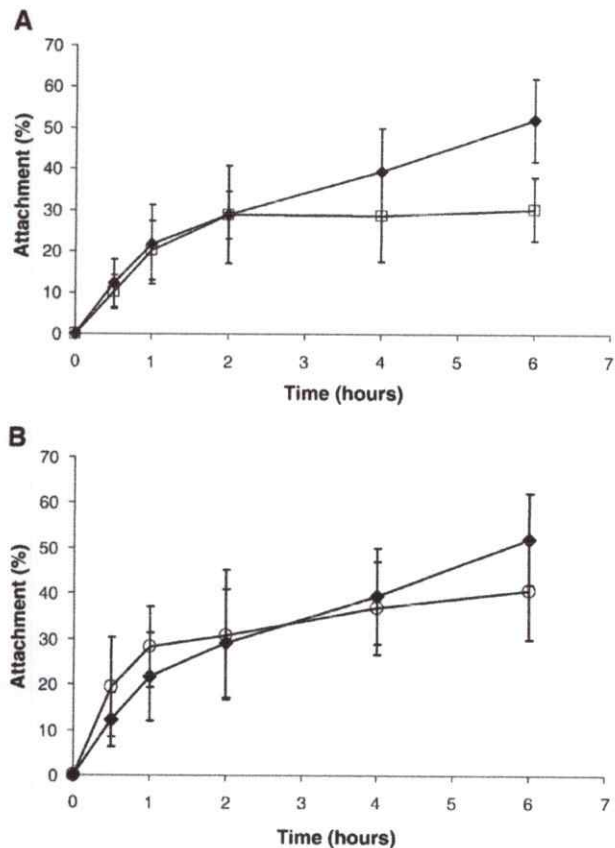


Fig. 3. Effects of an AHL mixture and an AHL-analogue on the attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite. A) AHL mixture (\square) composed of hydroxyl-AHLs (C10, C12, C14, C16) and oxo-AHLs (C10, C12, C14, C16); B) AHL-analogue, 4-phenyl-3-oxo-HSL (\circ); (\bullet), control without AHLs. Each result represents an average of six experiments. The bars show the standard deviation values.

other two strains. Since no *A. thiooxidans* genome sequence is currently available in the data base, it is actually impossible to know what kind of AHLs synthase family(ies) is(are) in charge of the production of oxo-C6-AHL and oxo-C8-AHL.

Regarding *A. ferrooxidans* strains, additional studies were performed to characterize more precisely the AHL-signaling molecules of the different strains. Besides, we compared the genomic organization of QS loci from

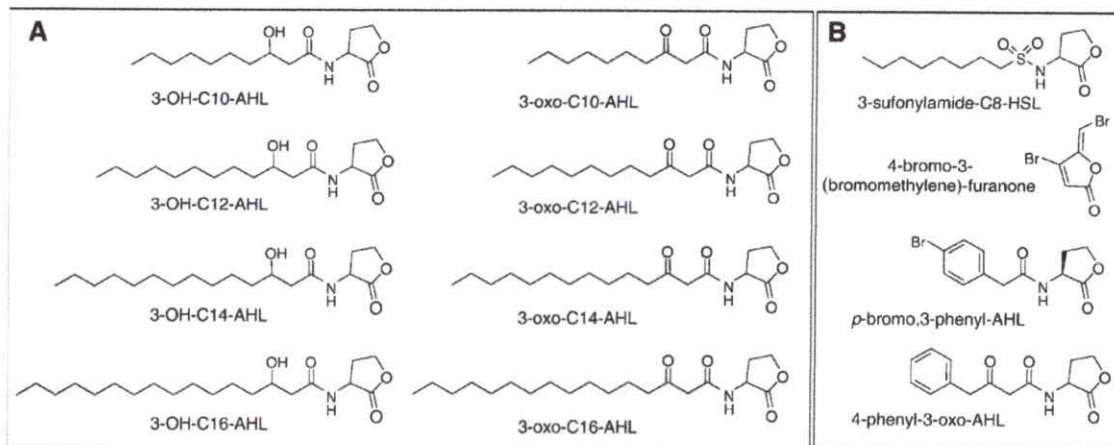


Fig. 2. Structures of AHLs (A) and AHL-analogues (B) used in this work.

three geographically and phylogenetically different *A. ferrooxidans* strains. LC-MS-MS revealed that all the *A. ferrooxidans* strains produced hydroxy-AHLs with an acyl-chain length ranging from C8 to C16 and in addition, strains ATCC 19859 and DSMZ 583 also synthesized C12-AHL and C14-AHL (data not shown). On the other hand, by using an *afel* labelled-probe, Southern blot analysis of genomic DNA digested by EcoRI and BamHI restriction enzymes revealed that the *afel* gene encoding for an AHL synthase was present in strains ATCC 19859, ATCC 33020 and DSMZ 9464 (data not shown). Therefore, in these strains *AfeI* protein should be also responsible for the synthesis of some AHL molecules. However, as in the case in the *A. ferrooxidans* type strain, the presence of an AHL synthase belonging to the HdtS family cannot be excluded (Farah et al., 2005; Rivas et al., 2007). Despite being isolated from different continents and in different kinds of mines and having different positions in an *A. ferrooxidans* phylogenetic tree (Karavaiko et al., 2003), the size similarities between the different EcoRI (1.3 kb) and HindIII (12 kb) positive restriction fragments revealed that the QS locus genomic organization of the *A. ferrooxidans* strains DSMZ 9464, ATCC 19859 and ATCC 33020 is similar to the type strain. These strongly suggest that the QS Type AI-1 locus was a widespread and conserved phenomenon in *A. ferrooxidans* species.

3.2. Quorum sensing type AI-1 system and mineral attachment

As the QS type AI-1 system appears to be a widespread phenomenon in *A. ferrooxidans* species and, at least, 7 of nine AHLs identified in the *A. ferrooxidans* type strain were characterized in other *A. ferrooxidans* collection strains (this work), all the attachment experiments were performed with the *A. ferrooxidans* type strain. To study the role of QS type AI-1 system in cell attachment to a mineral, we assessed the effects of synthetic AHL and AHL-analogues shown in Fig. 2. *A. ferrooxidans* cells were harvested by centrifugation, a condition in which a partial loss of EPS is induced. For the replenishment of their EPS, cells were left overnight in a mineral salt solution supplemented with ferric iron. In this way, a homogeneous bacterial population was obtained, allowing us to observe clearly the possible effects of AHLs and AHL-analogues.

Indeed, an AHL mixture, composed by hydroxyl-AHLs (C10, C12, C14, C16) and oxo-AHLs (C10, C12, C14, C16), inhibited cell attachment to pyrite by 42% (Fig. 3A). Six hours after the incubation with the AHL mixture, only 30% (30.4 ± 7.6) of the bacterial population was attached compared with 52% (52.2 ± 10.1) of attachment for the control bacterial population (not treated) (Fig. 3A). Similar attachment values (50%) were reported for the strain *A. ferrooxidans* 23270 (Barreto et al., 2005). However, the rate and extent of attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite vary depending on the strain (Ghauri et al., 2007) as well as with the batch of pyrite used (unpublished results). So far, we evaluated individually two molecules of the mixture: hydroxy-C16-AHL and the Oxo-C16-AHL; in our experimental conditions, none of these two compounds affected the attachment.

In addition, we analyzed several AHL-analogues. After 6 h of induction, a preliminary result revealed that the 4-phenyl-3-oxo-HSL derivative produced a decrease on the attachment level (22%; from 52.2 ± 10.1 to 40.7 ± 10.8) (Fig. 3B) while some of the AHL-analogues evaluated induced an increase on the attachment levels (Table 1). Variations in control data with the previous experiment (Fig. 3) were due to the use of different pyrite batches.

Table 1
Effect of different AHL-analogues on attachment of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to pyrite

AHL-analogues	Attachment (%)
Control without AHL-analogues	39.4 ± 10.1
3-sulfonylamid-C8-AHL	47.1 ± 11
4-bromo-3-(bromomethylene)-furanone	49.9 ± 3.5
p-bromo-3-phenyl-HSL	55.4 ± 9.7

4. Discussion

Multiple microorganisms coexist in the environment as communities, competing for or sharing resources and often associated as biofilms. Cell-cell communication through AHL-signaling between different bacterial species inside a mixed biofilm has been reported (Riedel et al., 2001). On the other hand, different works revealed that mixed cultures composed by *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* increase the yield of pyrite oxidation and, on the other hand, that EPS plays a pivotal role in this bioleaching process (Schippers and Sand, 1999; Gehrke et al., 2001; Harneit et al., 2006; Sand and Gehrke, 2006; Akcil et al., 2007). In many Gram-negative bacteria, EPS production and biofilm formation are regulated by QS type AI-1 (Lynch et al., 2002; Marketon et al., 2003).

Two relevant questions can be addressed for the bioleaching process: i) Does cell-cell communication occur in a mixed biofilm composed by *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans*? ii) Are the AHL-signaling molecules involved in the efficiency of mineral colonization by bacterial cells?

To answer the first question, the production of AHL-signaling molecules by different *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* strains was analyzed. The results obtained revealed that all tested *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains produce AHL-signaling molecules while both *L. ferrooxidans* strains do not. However, the presence of minor amounts of AHL-signaling molecules cannot be ruled out. On the other hand, it may be possible that even though *L. ferrooxidans* does not synthesize its own AHLs, it could detect exogenous AHLs synthesized by other microbial species belonging to its ecological niche through the expression of a *sdiA*-like gene, as is the case for *Escherichia* and *Salmonella* spp. (Michael et al., 2001). In *Escherichia* and *Salmonella* spp., the SdiA protein responds with the highest sensitivity to AHLs that have a keto modification at the third carbon and an acyl-chain length of 6 or 8 (Michael et al., 2001). Therefore, if a SdiA-like protein was present in *L. ferrooxidans* strains, these microorganisms could detect, at least, oxo-C6-AHLs and oxo-C8-AHLs produced by *A. thiooxidans*. All these data allowed us to hypothesize that an AHL communication could be effective inside bioleaching planktonic and/or biofilm communities. This cell-cell communication could certainly occur between i) different *A. ferrooxidans* strains, ii) different *A. thiooxidans* strains, and iii) *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* strains. In addition, to date it appears that *L. ferrooxidans* cannot talk through AHL-signaling molecules but there is no data to avoid thinking that it could hear the *A. ferrooxidans*/*A. thiooxidans* conversation.

The understanding of the molecular mechanisms involved in bacterial-mineral attachment and biofilm formation could be relevant to design biological strategies to improve bioleaching timing and efficiency. Thus, to address the second question, we tested the effect of AHL-analogues on the attachment of *A. ferrooxidans* cells to pyrite. Our preliminary results showed a small but significant tendency of the AHL mixture to inhibit attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite. However, these tendencies are preliminary results and further experiments will be required to identify which molecules and at what specific concentrations they affect adherence of this bacterium to pyrite. In addition, some AHL-analogues increased attachment of *A. ferrooxidans* to pyrite whereas others inhibited its attachment. The present data suggest that the AHL-signaling molecules and probably *AfeR* protein from *A. ferrooxidans* – therefore the QS type AI-1 system – may be involved in its attachment to pyrite.

In conclusion, these results strongly suggest that QS interferences could be an appropriate strategy to improve or to prevent the pyrite (mineral) colonization by pure and/or mixed cultures and therefore to affect the timing and efficiency of the bioleaching process. Therefore, cost analysis and studies with different strains and with bacterial communities composed by *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* and *L. ferrooxidans* will be of great importance.

Acknowledgments

For LC–MS–MS facilities, we acknowledge D. Haras and D. Morin from the Laboratoire de Biologie et Chimie Marine (EA 3884), Université de Bretagne-Sud, Lorient, France. We thank Dr. Violaine Bonnefoy for critical reading of the manuscript. This work was supported by FONDECYT 1040676, ECOS/CONICYT C05 B04, and ICM grant P 05-001-F. L.M. Ruiz was supported by a scholarship from DAAD.

References

- Akci, A., Ciftci, H., Deveci, H., 2007. Role and contribution of pure and mixed cultures of mesophiles in bioleaching of a pyritic chalcocopyrite concentrate. *Mineral Engineering* 20, 310–318.
- Amaro, A.M., Seeger, M., Arredondo, R., Moreno, M., Jerez, C.A., 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173, 910–915.
- Barreto, M., Gehrke, T., Harnett, K., Sand, W., Jedlicki, E., Holmes, D., 2005. Unexpected insights into biofilm formation by *Acidithiobacillus ferrooxidans* revealed by genome analysis and experimental conditions. In: Harrison, S.T.L., Rawlings, D.E., Petersen, J. (Eds.), *Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy Symposium*, Cape Town, South Africa, pp. 817–825.
- Castang, S., Chantegrel, B., Deshayes, C., Dolmazon, R., Gouet, P., Haser, R., Reverchon, S., Nasser, W., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Doutheau, A., 2004. *N*-sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5145–5149.
- Farah, C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A., Guilliani, N., 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7033–7040.
- Frezza, M., Castang, S., Estephane, J., Soufere, L., Deshayes, C., Chantegrel, B., Nasser, W., Queneau, Y., Reverchon, S., Doutheau, A., 2006. Synthesis and biological evaluation of homoserine lactone derived ureas as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 4781–4791.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D., Sand, W., 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2743–2747.
- Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W., 2001. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*—a model for structure–function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water Sci. Technol.* 43, 159–167.
- Geske, G.D., Wezeman, R.J., Siegel, A.P., Blackwell, H.E., 2005. Small molecule inhibitors of bacterial quorum sensing and biofilm formation. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12762–12763.
- Ghauri, A., Okbe, N., Johnson, D.B., 2007. Attachment of acidophilic bacteria to solid surfaces: the significance of species and strain variations. *Hydrometallurgy* 85, 72–80.
- Harnett, K., Gökse, A., Kock, D., Klock, J., Gehrke, T., Sand, W., 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 83, 245–254.
- Karavaiko, G.I., Turova, T.P., Kondrat'eva, T.F., Lysenko, A.M., Kolganova, T.V., Ageeva, S.N., Muntyan, L.N., Pivovarova, T.A., 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 113–119.
- Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E., Williams, P., 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ. Microbiol.* 4, 18–28.
- Marketon, M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A., Gonzalez, J.E., 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 185, 325–331.
- Michael, B., Smith, J.N., Swift, S., Heffron, F., Ahmer, B.M., 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J. Bacteriol.* 183, 5733–5742.
- Morin, D., Grasland, B., Vallee-Rehel, K., Dufau, C., Haras, D., 2003. On-line high-performance liquid chromatography–mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr., A* 1002, 79–92.
- Ramirez, P., Guilliani, N., Valenzuela, L., Beard, S., Jerez, C.A., 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4491–4498.
- Riedel, K., Hentzer, M., Geisenberger, O., Huber, B., Steidle, A., Wu, H., Høiby, N., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L., 2001. *N*-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology* 147, 3249–3262.
- Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D.S., Jedlicki, E., 2005. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* 38, 283–297.
- Rivas, M., Seeger, M., Jedlicki, E., Holmes, D.S., 2007. Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3225–3231.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 1989. *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sand, W., Gehrke, T., 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* 157, 49–56.
- Schippers, A., Sand, W., 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 319–321.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan Jr., J.E., Rinehart, K.L., Farrand, S.K., 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6036–6041.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., Banfield, J.F., 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428, 37–43.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guilliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Jerez, C.A., 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 24, 197–211.
- Valenzuela, S., Banderas, A., Jerez, C.A., Guilliani, N., 2007. Chapter 13. In: Donati, E.R., Sand, W. (Eds.), *Microbial Processing of Metal Sulfides*. Springer, Netherlands, pp. 293–306.
- Waters, C.M., Bassler, B.L., 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 319–346.