

UCH-FC  
Biotecnología  
M385  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO



**“Análisis de la resistencia a cobre de *Acidithiobacillus ferrooxidans*  
ATCC 53993 mediante proteómica cuantitativa ICPL y qRT-PCR”**

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

**CRISTÓBAL MARTÍNEZ BUSSENIUS**

**NOVIEMBRE 2015  
Santiago – Chile  
ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE**



**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Cristóbal Martínez Busenius**.

**“ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA A COBRE DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 MEDIANTE PROTEOMICA CUANTITATIVA ICPL y qRT-PCR”**

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

Dr. Carlos A. Jerez Guevara  
**Director Seminario de Título**

**Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. Julieta Orlando  
**Presidente Comisión**

Dr. Francisco Chávez  
**Evaluador**

FACULTAD DE CIENCIAS  
BIBLIOTECA  
CENTRAL  
U. DE CHILE

*A mi mamá y papá con mucho cariño..*

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría partir agradeciendo a mi mamá por toda la comprensión y confianza en mí. Gracias por tu apoyo incondicional y dejarme realizar mi gran pasión, el deporte, sin importar que interfiriera de forma temporal en mis estudios.

A la Nati, una de las personas más importantes en mi vida, gracias por tu paciencia, apoyo y energía, estoy muy feliz que compartieras esta etapa conmigo.

A todos mis amigos y familiares que siempre confiaron en mí y de alguna forma ayudaron en este proceso.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, a Matías, Sebastián, Rodrigo, Diegos, Alejandro, Javi, Coni, Alejandra, Nia y Maria Jose, gracias por los buenos momentos compartidos y la buena onda. Por último quiero agradecerle a Claudio, que además de enseñarme muchísimo en lo que respecta a la ciencia me ha permitido conocer a una gran persona, amigo y compañero. Agradecido de todos los consejos y conversaciones que tuvimos a lo largo de este proceso.

Finalmente al profesor Carlos Jerez, por aceptarme en su laboratorio y por tener la paciencia y comprensión de mis fugases y repentinos viajes al extranjero. Gracias por su sencillez, humor y por compartir abiertamente sus conocimientos.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
LISTAS DE ABREVIATURAS .....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biolixiviación .....	1
1.2 Función biológica del cobre y toxicidad .....	2
1.3 Mecanismos de resistencia a cobre en bacterias .....	3
1.3.1 Eflujo de cobre mediante el sistema CusCFBA.....	3
1.3.2 Eflujo de cobre a través del sistema Cue .....	5
1.3.3 Mecanismo de resistencia a cobre de <i>Pseudomonas syringae</i> mediante el sistema CopABCD <sub>Ps</sub> .....	6
1.3.4 Mecanismos de homeostasis de cobre en <i>Enterococcus hirae</i> .....	8
1.3.5 Papel de los polifosfatos (PoliP) en la resistencia a metales .....	9
1.3.6 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y mecanismos de resistencia a cobre descritos .....	10
1.4 Objetivo general.....	13
1.5 Objetivos específicos.....	13
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
2.1 Cepas y condiciones de cultivos.....	14
2.2 Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de cobre.....	14
2.3 Técnicas de biología molecular .....	15
2.3.1 Extracción del DNA genómico.....	15
2.3.2 Cuantificación del DNA.....	15
2.3.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	16
2.3.4 Diseño de partidores para las reacciones de PCR y qRT-PCR .....	16
2.3.5 Reacciones de PCR.....	17
2.3.6 Extracción de RNA total .....	17
2.3.7 Transcripción inversa.....	19
2.3.8 Reacciones de qRT-PCR.....	19
2.3.9 Cuantificación de transcritos por qRT-PCR.....	20
2.4 Métodos para el análisis de proteínas .....	21
2.4.1 Preparación de extracto total de proteínas para análisis por ICPL.....	21
2.4.2 Cuantificación de proteínas .....	22
2.4.3 Preparación de las muestras de proteínas para ser analizadas por ICPL.....	22
2.4.4 Digestión proteica y marcaje para el ICPL.....	22
2.4.5 Identificación de proteínas y análisis cuantitativo.....	23
2.5 Métodos bioinformáticos .....	23
2.5.1 Análisis de secuencia y alineamientos genéticos.....	23

<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Cambios cuantitativos en el proteoma total de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 crecidos en hierro y en presencia de 40 mM de cobre. ....	25
3.2 Expresión de los genes que codifican para algunas proteínas de interés inducidas por la presencia de cobre. ....	32
3.3 Análisis de secuencia y alineamientos genéticos de la proteína hipotética Lferr_2749.....	37
3.4 Cambios del pH del medio extracelular durante el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en Fe <sup>2+</sup> . ....	39
<b>4. DISCUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
4.1 Metabolismo y transporte de iones inorgánicos.....	41
4.1.1 Aumento de la síntesis de sistemas de flujo del tipo RND.....	41
4.1.2 Aumento de proteínas relacionadas con la captación de hierro.....	45
4.2 Metabolismo y transporte de carbohidratos y aminoácidos.....	47
4.2.1 Aumento en la síntesis de glutamato en presencia de cobre.....	48
4.3 Producción y conversión de energía.....	51
4.3.1 Cambios en los niveles de proteínas que participan en la oxidación de hierro.....	51
4.4 Procesos celulares y señalización.....	56
4.4.1 Mecanismos de transducción de señales.....	56
4.4.2 Biosíntesis de envoltura / membrana / pared celular.....	57
4.4.3 Modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas.....	60
4.5 Proteínas no caracterizadas.....	63
4.5.1 Proteínas solo con función general predicha.....	63
4.5.2 Proteínas con función desconocida.....	64
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>76</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados globales de las proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> crecidas en hierro y cuantificados por ICPL .....	25
<b>Tabla 2A.</b> Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 crecidas en hierro en presencia de 40 mM CuSO <sub>4</sub> .....	27
<b>Tabla 2B.</b> Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 crecidas en hierro en presencia de 40 mM CuSO <sub>4</sub> .....	29
<b>Tabla 3.</b> Lista de proteínas homólogas de Lferr_2749 .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sistema de Eflujo de cobre CusCFBA .....	4
<b>Figura 2.</b> Eflujo de cobre a través del sistema Cue .....	6
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de resistencia a cobre de <i>P. syringae</i> .....	7
<b>Figura 4.</b> Modelo de la homeostasis de cobre en <i>E. hirae</i> .....	9
<b>Figura 5.</b> Análisis de proteínas que cambian significativamente la expresión en presencia de CuSO <sub>4</sub> .....	26
<b>Figura 6.</b> Análisis global de las proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> 53993 que experimentaron cambios en presencia de cobre. ....	31
<b>Figura 7.</b> Expresión relativa de genes que codifican a sistemas de eflujo del tipo RND (CusA1 y CusC1) y chaperona de cobre (CusF2) fuera de la IG de <i>A. ferrooxidans</i> 53993 ...	33
<b>Figura 8.</b> Expresión relativa de genes que codifican al sistema de eflujo del tipo RND (CusA3) y chaperona de cobre (CusF3) en la IG de <i>A. ferrooxidans</i> 53993 .....	34
<b>Figura 9.</b> Expresión relativa del gen que codifica para la proteína de choque térmico HtpG de <i>A. ferrooxidans</i> 53993 .....	35
<b>Figura 10.</b> Expresión relativa de genes que codifican parte del operón rus en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993 .....	36
<b>Figura 11.</b> Alineamiento múltiple entre Lferr_2049 (AcoP), proteínas homólogas y chaperonas de cobre más caracterizadas.....	38
<b>Figura 12.</b> Medición del pH extracelular de <i>A. ferrooxidans</i> a diferentes concentraciones de cobre .....	40
<b>Figura 13.</b> Curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> adaptada a altas concentraciones de cobre .....	40
<b>Figura 14.</b> Esquema de las vías glicolítica, pentosa fosfato y fijación de carbono en <i>A. ferrooxidans</i> .....	48
<b>Figura 15.</b> Esquema de las vías C <sub>5</sub> (porfirinas) y metabolismo de glutatión en <i>A. ferrooxidans</i> .....	52
<b>Figura 16.</b> Sistema de eflujo RND y modelo de oxidación de Fe <sup>+2</sup> en <i>A. ferrooxidans</i> .....	55

## LISTAS DE ABREVIATURAS

<b>ATP:</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATCC:</b>	Colección de Cultivo de Tipo Americano
<b>BLAST:</b>	Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local
<b>CT:</b>	Ciclo de PCR en el cual se sobrepasa el nivel umbral de fluorescencia
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTT:</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPS:</b>	Exopolisacáridos
<b>FPM:</b>	Fuerza protón motriz
<b>HPLC:</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>ICPL:</b>	Análisis proteómico (Isotope-coded protein label)
<b>NADH:</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>ORF:</b>	Marco abierto de lectura
<b>Pi:</b>	Fosfato inorgánico
<b>Pit:</b>	Transportador de fosfato inorgánico
<b>PolIP:</b>	Polifosfatos inorgánicos
<b>PPK:</b>	Polifosfato quinasa
<b>PPX:</b>	Exopolifosfatasa
<b>PMSF:</b>	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ROS:</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico
<b>RT-PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>RND:</b>	Resistencia, Nodulación, División celular
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>TAE:</b>	Tris-Acetato de sodio-EDTA

## RESUMEN

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria extremófila de gran importancia industrial debido a su participación en la recuperación de metales tales como cobre, oro y uranio mediante biolixiviación. Es capaz de resistir altas concentraciones de cobre y otros metales, característica fundamental para los procesos de biominería en donde las concentraciones de cobre son muy altas.

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 posee determinantes de resistencia a cobre canónicos (bombas de eflujo, chaperonas que unen cobre, etc.) y otras estrategias para manejar el daño producido por este metal (aumento en la síntesis de histidina, aumento de una disulfuro isomerasa, represión de canales iónicos, etc.).

La cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 es capaz de resistir concentraciones mucho mayores de cobre que la cepa ATCC 23270. Se determinó que *A. ferrooxidans* ATCC 53993 posee en su genoma una región exclusiva de alrededor de 160 kb clasificada como isla genómica (IG), la cual está ausente en la cepa ATCC 23270. Esta IG contiene genes que codifican para determinantes de cobre adicionales a los encontrados en la cepa ATCC 23270. Se ha propuesto que estos genes le otorgarían a ATCC 53993 una mayor capacidad para resistir cobre que la cepa a ATCC 23270. Sin embargo, no existen estudios proteómicos en presencia de cobre en la cepa ATCC 53993 que apoyen esto.

Con el objetivo de identificar nuevos determinantes o estrategias de resistencia a cobre en la cepa ATCC 53993, se evaluó la expresión de las proteínas totales de esta bacteria crecida en presencia de cobre a través de proteómica cuantitativa ICPL (isotope-coded

protein labeling). En este estudio se identificaron 523 proteínas de las cuales 49 cambiaron significativamente sus niveles en presencia del metal. Dentro de estas proteínas, se encontró una alta sobreexpresión de los sistemas de eflujo del tipo RND y de chaperonas de cobre CusF exclusivos de la isla genómica de esta cepa. Además, se observaron varias estrategias metabólicas que podrían ayudar a controlar los efectos del metal. Entre éstas se destacan el aumento de la vía de oxidación de hierro y de proteínas que participan en la síntesis de glutamato. También se detectó el aumento de una proteína de la familia de chaperonas HtpG.

Finalmente, se identificó una nueva proteína de unión a cobre que podría ser un nuevo determinante de resistencia a cobre en *A. ferrooxidans*.

Los resultados obtenidos indican que *A. ferrooxidans* 53993 usaría no solo estrategias canónicas de resistencia a cobre presentes en su isla genómica, sino que también, estrategias metabólicas que permiten mantener una correcta homeostasis del metal.

## SUMMARY

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is an extremophilic bacterium of great industrial importance due to its participation in the recovery of metals such as copper, gold and uranium through bioleaching. It is capable to resist elevated concentrations of copper and other metals, usually present in biomining processes.

It has been reported that the strain *A. ferrooxidans* ATCC 23270 has canonic resistance determinants to copper (efflux pumps, copper binding chaperones, etc.) and other strategies to manage the damage produced by this metal (increase in histidine synthesis, increase of a disulphate isomerase, repression of ion channels, etc.).

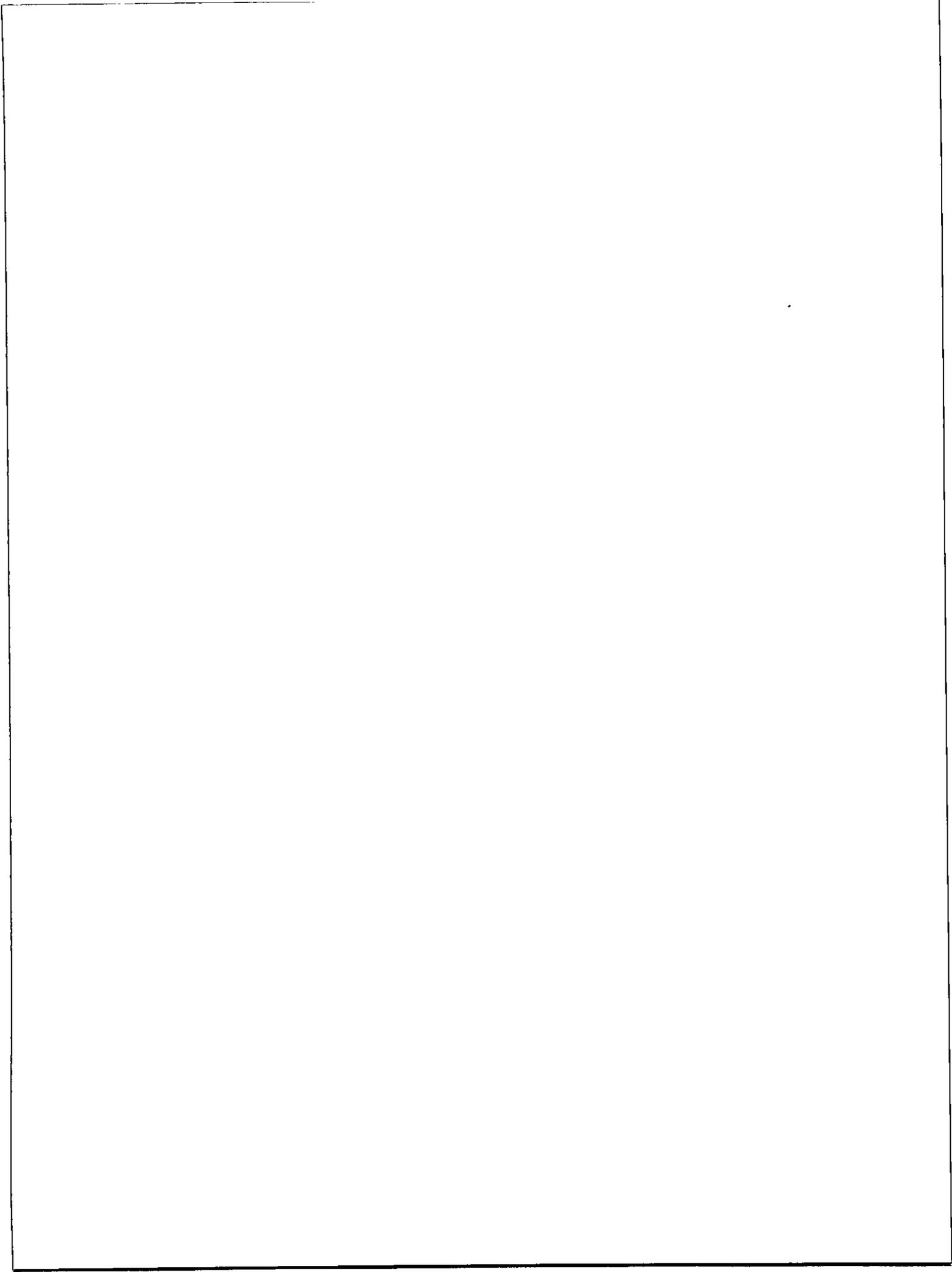
*A. ferrooxidans* strain ATCC 53993 is capable of resisting much higher copper concentrations than the strain ATCC 23270. It was described that *A. ferrooxidans* ATCC 53993 has in its genome an exclusive region of about 160 kb classified as a genomic island (GI), which is absent in the strain ATCC 23270. This GI contains genes codifying additional copper determinants than the ones found in the strain ATCC 23270. It has been proposed that these genes would grant a greater capacity to resist copper than the strain ATCC 23270. However, there are no proteomic studies in presence of copper in the strain ATCC 53993 that support this.

In order to identify new possible determinants or strategies for the resistance of copper of the strain ATCC 53993, total protein levels in presence of copper were assessed through a quantitative proteomic ICPL analysis (isotope-coded protein labeling). In this study, 523 proteins were identified, 49 of which changed significantly their levels in presence of the metal. Among these proteins, we find a high

overexpression of the RND type efflux systems and CusF copper chaperones, exclusive of the genomic island of this strain. In addition, several metabolic strategies were observed that could help control the effects of the metal. Among these, the increase in the iron oxidation pathway as well as proteins that participate in the synthesis of glutamate stand out. An increase of a protein from the HtpG chaperones family was identified as well.

Finally, a new binding copper protein was identified, which could participate as a new determinant in copper resistance in *A. ferrooxidans*.

The results found indicate that *A. ferrooxidans* 53993 would not only use canonical copper resistance elements present in its genomic island, but also metabolic strategies that allow it to maintain a correct homeostasis as well.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biolixiviación

La biolixiviación es un proceso que permite la extracción de metales pesados a partir de los minerales insolubles que los contienen, gracias a la acción de microorganismos capaces de oxidar dichos compuestos (Olson y col., 2003; Jerez., 2011). La biolixiviación tiene algunas ventajas sobre los procedimientos tradicionales de minería, ya que es un proceso que tiene un bajo costo operacional, permite usar minerales de baja ley y no genera emisiones gaseosas peligrosas como el dióxido de azufre, lo que la convierte en un proceso más amigable con el medio ambiente (Rawlings., 2002; Johnson., 2013). Esta técnica se utiliza principalmente para la extracción de metales como cobre, oro y uranio, entre otros (Rohwerder y col., 2003; Jerez., 2012).

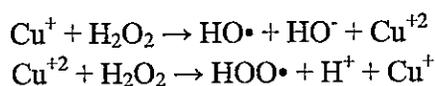
En Chile, este proceso ha tomado mucha importancia ya que permite el tratamiento de los recursos y reservas crecientes de minerales con baja ley de cobre, que no pueden ser económicamente procesados por los métodos tradicionales. De hecho, se estima que en nuestro país se generan alrededor de 600.000 toneladas de cobre al año mediante esta tecnología, lo que corresponde a más del 10% de la producción total de cobre en Chile (COCHILCO., 2010).

En el proceso de biolixiviación, la extracción de cobre desde los minerales se lleva a cabo gracias a la oxidación de sulfuros metálicos, lo cual genera tanto la disminución del pH en el medio, producto de la generación de ácido sulfúrico, como la liberación de altas concentraciones de cobre, condiciones que pueden llegar a ser muy tóxicas incluso para los microorganismos biomineros (Orell y col., 2010). Debido a esto, los

microorganismos que participan en este proceso deben ser capaces de resistir altas concentraciones de cobre. Probablemente, este sea uno de los factores limitantes de la biolixiviación. Por lo tanto, comprender estos tipos de mecanismos es de gran importancia para el desarrollo y optimización de este proceso.

## 1.2 Función biológica del cobre y toxicidad

El cobre ha sido aceptado por mucho tiempo como un oligoelemento esencial, necesario para la supervivencia de todos los tipos celulares conocidos. Este requerimiento se basa en la característica de este elemento, capaz de adoptar distintos estados redox, ya sea en la forma oxidada  $\text{Cu}^{+2}$  o en la forma reducida  $\text{Cu}^+$ . En consecuencia, los iones de cobre sirven como cofactores de importantes proteínas, como por ejemplo, la superóxido dismutasa, la plastocianina o los citocromos de diversos tipos (Peña y col., 1999; Arguello y col., 2013) que participan en procesos vitales como lo son la respiración y la fotosíntesis (Puig y Thiele., 2002). Sin embargo, y en contraparte a este requerimiento, a concentraciones superiores a las fisiológicas, el cobre puede ser extremadamente perjudicial para la célula, ya que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) por una reacción de tipo Fenton:



Así, los radicales libres generados mediante esta reacción pueden dañar las membranas celulares, provocar la peroxidación de lípidos, oxidar proteínas y generar daños en los ácidos nucleicos, perturbando las funciones celulares (Bruins y col., 2000; Solioz y Stoyanov., 2003). Además de este mecanismo de daño, el cobre puede desplazar otros

metales funcionales desde motivos estructurales o catalíticos de muchas proteínas celulares, generando alteraciones en su función (Predki y Sarkar., 1992). Por otra parte y debido a la gran afinidad entre el cobre y los grupos tioles, este metal puede también dañar los centros Fe-S de algunas proteínas (Dupont y col., 2011). Debido a todo los daños que puede producir el cobre, es de vital importancia mantener su concentración fuera de los rangos de toxicidad. Para ello, los organismos han desarrollado mecanismos de tolerancia que tienen como objetivo mantener su correcta homeostasis.

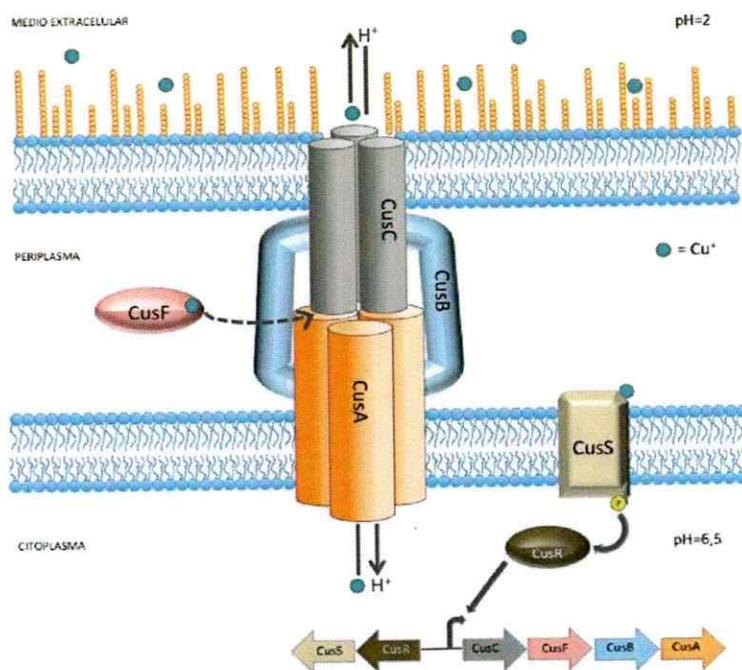
### **1.3 Mecanismos de resistencia a cobre en bacterias**

Las bacterias, en general, poseen mecanismos de resistencia a cobre que involucran el secuestro del metal, ya sea en el exterior celular o en el citoplasma por medio de proteínas que unen el cobre; o bien poseen mecanismos que involucran el eflujo activo del metal mediante transportadores de membrana desde el citoplasma hasta el medio extracelular. Los modelos bacterianos mejor caracterizados son los de las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas syringae* y el de la bacteria Gram-positiva *Enterococcus hirae*.

#### **1.3.1 Eflujo de cobre mediante el sistema CusCFBA**

El sistema Cus es un sistema de eflujo de cobre descrito en *E. coli* que participa en la homeostasis del cobre. Este sistema está codificado a nivel cromosomal en el operón cusCFBA el cual codifica a CusA, una proteína RND de membrana interna que corresponde a un antiporte protón-sustrato; CusB, una proteína de fusión de membrana periplasmática (Saier y col., 1994); CusC, un componente de la membrana externa de la

bacteria (Dinh y col., 1994) y CusF, una chaperona de cobre periplásmica. Se ha propuesto que en el sistema CusCBA, CusC interactuaría con la proteína CusA y CusB formando un canal que permitiría conectar el citoplasma con la membrana externa. La función de este complejo multiproteico sería capturar  $\text{Cu}^+$  desde el citoplasma y exportar el metal hacia el exterior, previniendo así su aparición en el periplasma. Se ha propuesto también que CusF podría entregar el cobre desde el periplasma al complejo CusCBA facilitando la detoxificación de cobre del periplasma (Franke y col., 2003; Arguello y col., 2013) (Figura 1). Además existe un sistema de dos componentes *cusRS* que codifica para un regulador transcripcional (CusR) y una histidina kinasa (CusS) que es capaz de captar la presencia de cobre en el periplasma y activar la transcripción del operón *cusCFBA*.

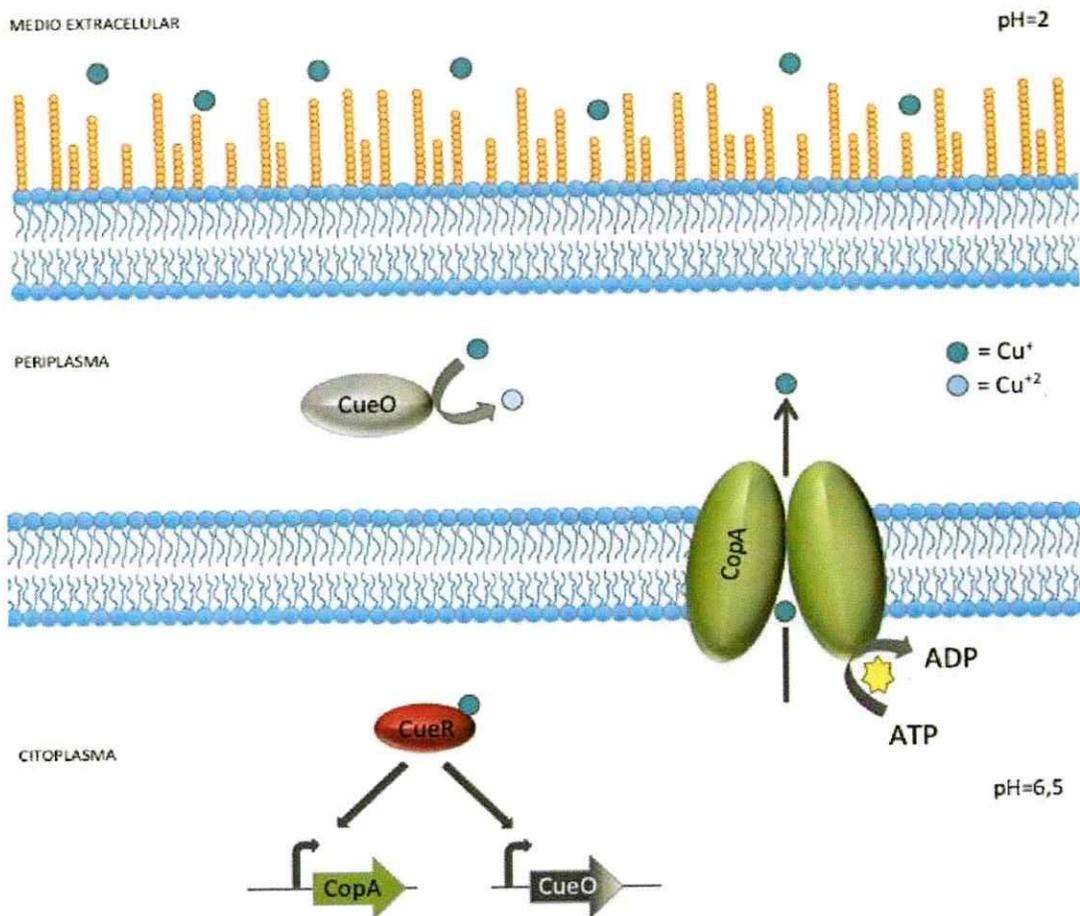


**FIGURA 1. Sistema de eflujo de cobre CusCFBA.** El operón *cusCFBA* codifica al sistema del tipo RND que transporta cobre desde el periplasma y/o citoplasma a través de la membrana externa hacia el espacio extracelular. La expresión de este complejo se regula por un sistema de 2 componentes codificados por el operón *cusRS*.

### 1.3.2 Eflujo de cobre a través del sistema Cue

El sistema Cue (Figura 2), está compuesto por dos proteínas. La primera, CopA es una proteína de membrana correspondiente a una ATPasa de tipo P que transporta el metal desde el citoplasma hasta el periplasma de la bacteria, siendo esto esencial para mantener la homeostasis de cobre citoplasmático (Rensing y Grass., 2002). Dicha ATPasa utiliza la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para el transporte del metal (Axelsen y Palmgren., 1998). Se ha determinado que los aminoácidos capaces de unir metales en estas ATPasas se encuentran ubicados en sus hélices de membrana que constituyen las llamadas TM-MBDs, responsables de la translocación del ión dependiente de ATP (Arguello y col., 2007). La segunda proteína del sistema, CueO, corresponde a una multi-oxidasa de cobre que cataliza la oxidación del ión  $\text{Cu}^+$ , la especie más tóxica del cobre, hasta la forma menos tóxica  $\text{Cu}^{2+}$  (Singh y col., 2004). Se ha demostrado que CueO está implicada en la resistencia a cobre, ya que protege a las enzimas periplasmáticas del daño inducido por el metal. Esta protección puede estar dada por la capacidad de unir el metal y/o por la disminución de  $\text{Cu}^+$  (Rensing y Grass., 2002).

Se ha determinado que la expresión transcripcional de CopA y CueO estaría regulada por CueR, una proteína perteneciente a la familia de los reguladores transcripcionales MerR. La presencia de cobre activa a dicho regulador, generando la sobreexpresión de estas proteínas (Changela y cols., 2003; Espariz y col., 2007).

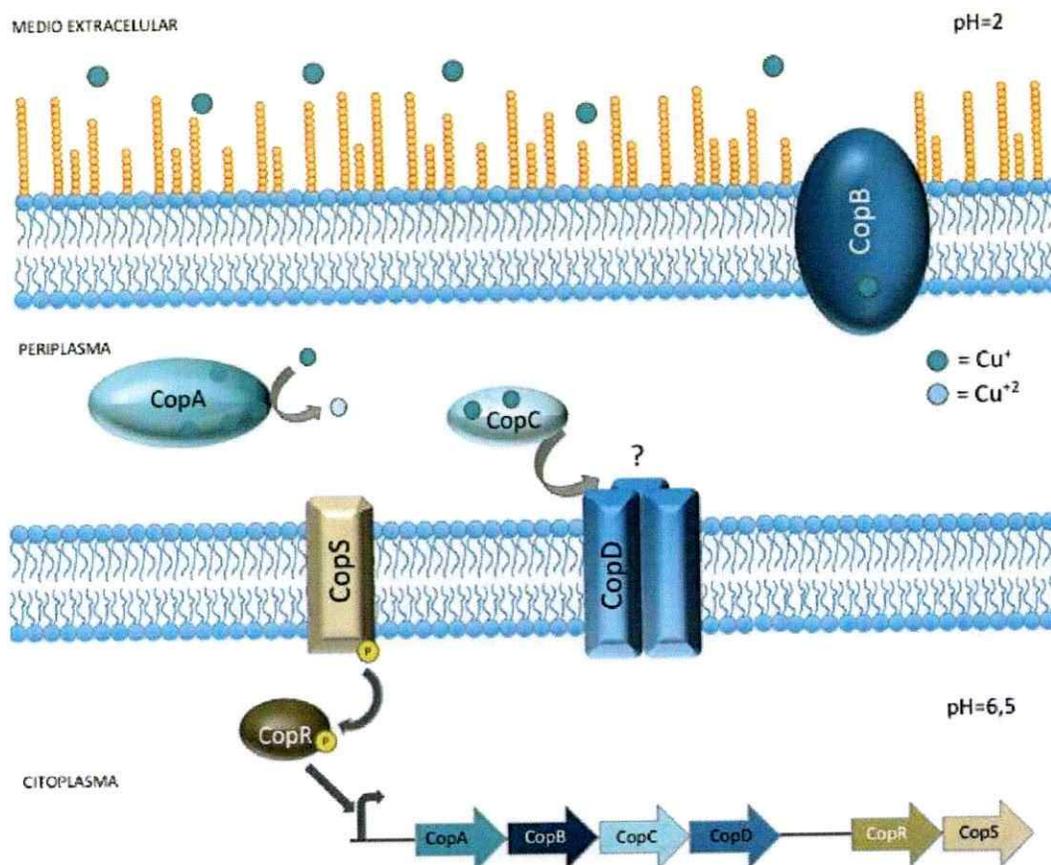


**Figura 2. Eflujo de cobre a través del sistema Cue.** El regulador transcripcional CueR controla la transcripción directa de CopA, una ATPasa tipo P translocadora de cobre y CueO, oxidasa de multicobre periplasmática responsable de la oxidación de Cu(I) a Cu(II) (especie menos tóxica).

### 1.3.3 Mecanismo de resistencia a cobre de *Pseudomonas syringae* mediante el sistema CopABCD<sub>Ps</sub>.

Otro tipo de mecanismo de resistencia a cobre, es el que se ha descrito en la bacteria Gram negativa *P. syringae*, basado principalmente en el secuestro del metal. Este sistema, a diferencia de los mencionados anteriormente, está codificado a nivel plasmidial y está compuesto por cuatro proteínas codificadas por el operón *copABCD<sub>Ps</sub>*, que es inducible por cobre y regulado por las proteínas codificadas por el operón *CopRS* (Figura 3).

La proteína  $CopA_{Ps}$ , corresponde a una oxidasa de multicobre periplasmática capaz de unir 11 átomos de cobre;  $CopB_{Ps}$  corresponde a una proteína integral de membrana externa, mientras que  $CopC_{Ps}$  representa una chaperona de cobre periplasmática que une dos átomos de cobre (Aresano y col., 2003; Puig y col., 2002). Estas tres proteínas se han relacionado directamente con la resistencia a cobre dada su capacidad de unir el metal, disminuyendo de esta forma su concentración libre. Además, se ha propuesto que  $CopC_{Ps}$  podría transferir el cobre desde  $CopA_{Ps}$  al transportador integrado de membrana interna  $CopD_{Ps}$ , formando un complejo con  $CopC_{Ps}$  (Cha y Cooksey., 1993).

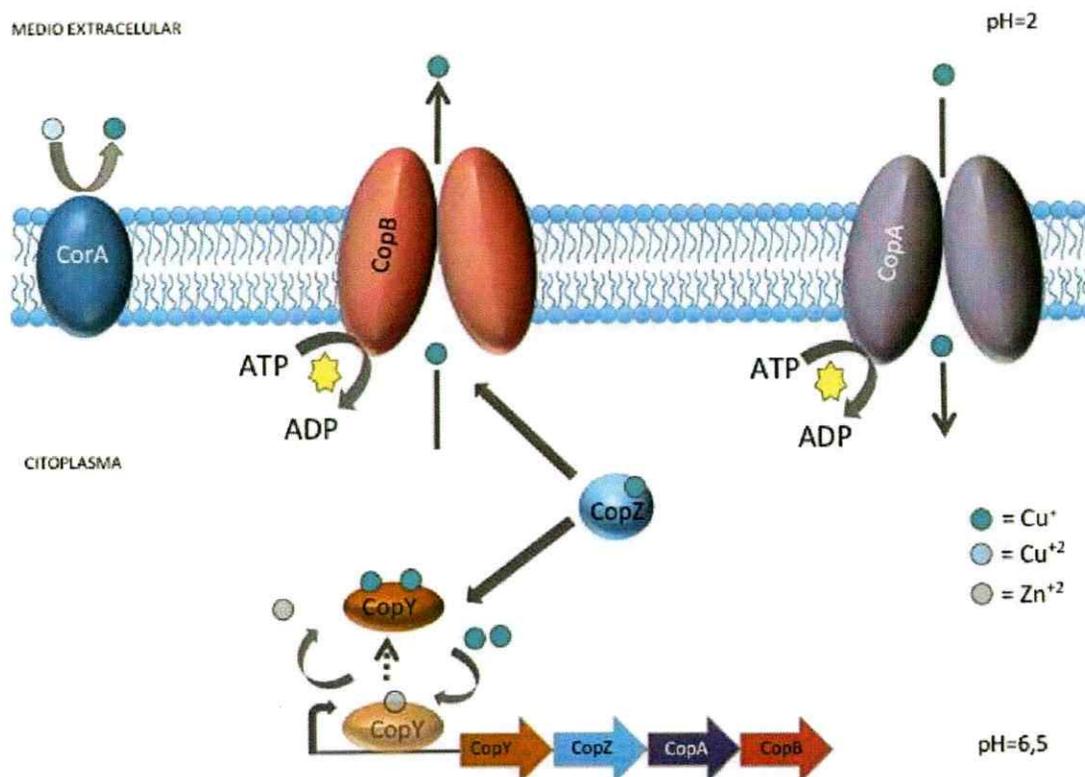


**Figura 3. Mecanismo de resistencia a cobre de *P. syringae*.** Las proteínas  $CopA_{Ps}$ ,  $CopC_{Ps}$  y  $CopB_{Ps}$  son proteínas que unen cobre y que participarían en la homeostasis del metal mediante su secuestro.  $CopC$  puede transferir el cobre unido al transportador de membrana  $CopD_{Ps}$ . El operón  $CopRS_{Ps}$  se encargaría de regular la expresión de estas proteínas.

#### 1.3.4 Mecanismos de homeostasis de cobre en *Enterococcus hirae*

El mecanismo de resistencia descrito para esta bacteria Gram positiva está compuesto principalmente por cuatro proteínas: CopA<sub>Eh</sub>, una ATPasa de influjo de cobre; CopZ<sub>Eh</sub>, una chaperona de cobre citoplasmática capaz de unir cobre mediante las cisteínas del sitio MXCXXC, muy conservado; CopB<sub>Eh</sub>, una ATPasa de eflujo y CopY<sub>Eh</sub>, un represor transcripcional, el cual tiene unido un átomo de zinc que reprime al operón *copYZAB* (Solioz y Stoyanov., 2003) (Figura. 4).

Se ha propuesto que el Cu<sup>+</sup> generado por la reductasa de cobre CorA<sub>Eh</sub>, puede ser utilizado por la ATPasa de influjo CopA para ingresar el cobre a la célula. Este cobre ingresado podría ser captado por la chaperona citoplasmática de cobre CopZ, la cual es capaz de entregarle el Cu<sup>+</sup> al represor CopY, que al intercambiar el zinc por cobre provoca un cambio conformacional, liberándose de su promotor y permitiendo la transcripción del operón *copYZAB*. En el caso de que las concentraciones de cobre sean muy altas, CopZ también puede ceder el metal a la ATPasa de eflujo CopB para eliminar el exceso de cobre (Solioz y Stoyanov., 2003).



**Figura 4. Modelo de la homeostasis de cobre en *E. hirae*.** La reductasa extracelular CorA genera Cu<sup>+</sup> que puede ser utilizado por la ATPasa de flujo CopA para ingresar cobre a la célula. El cobre que ingresa es captado por la metalochaperona CopZ, la cual es capaz de entregarle el Cu<sup>+</sup> al represor CopY para que éste libere el zinc, salga de su promotor y permita la transcripción del operón copYZAB. En caso de estar en presencia de un exceso de cobre, CopZ puede cederle el metal a la ATPasa de flujo CopB para eliminar el exceso de cobre.

### 1.3.5 Papel de los polifosfatos (PoliP) en la resistencia a metales

Los polifosfatos (poliP) son polímeros lineales que consisten de residuos de ortofosfatos (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía. El metabolismo de poliP es comúnmente regulado en bacterias por dos enzimas: PPK1 y PPX.

Hay varias evidencias que proponen la relación de los poliP en la resistencia a metales pesados. Una de estas evidencias, son las propiedades químicas de los poliP, ya que debido a su alta densidad de cargas negativas y la flexibilidad de su enlace, pueden

actuar como quelantes de iones metálicos (Kornberg y col., 1999). Otra evidencia, es la gran cantidad de poliP que acumulan algunas bacterias tales como *Klebsiella aerogenes*, *Stichococcus bacillaris*, *Sulfolobus metallicus*, *A. ferrooxidans*, entre otros, que resisten altas concentraciones de metales pesados (Aiking y col., 1984; Zhang y Majidi., 1994; Alvarez y Jerez., 2004; Remonsellez y col., 2006). Además, estudios realizados en *E. coli* han propuesto que la degradación de los poliP, catalizada por la PPX, permitiría que el fosfato inorgánico liberado de esta reacción se asocie con metales pesados formando un complejo Cu-fosfato, que eventualmente puede ser expulsado de la célula por el sistema Pit que se ubica en la membrana plasmática de este microorganismo (Van Veen y col., 1994; Keasling., 1997).

#### **1.3.6 *Acidithiobacillus ferrooxidans* y mecanismos de resistencia a cobre descritos.**

*A. ferrooxidans*, es una  $\gamma$ -proteobacteria acidófila capaz de utilizar el ion ferroso y una variedad de compuestos reducidos de azufre como fuentes de energía (Chi y col., 2007). Es una de las bacterias más estudiadas dentro del consorcio de microorganismos empleados en biolixiviación (Jerez., 2012; Vera y col., 2013) principalmente desde que se conoce la secuencia del genoma tanto de la cepa ATCC 23270 como de la cepa ATCC 53993. Ambas cepas de *A. ferrooxidans* se han estudiado debido a su gran capacidad de resistir cobre. Además, éstas pueden resistir concentraciones de cobres muy diferentes. Por un lado, la cepa ATCC 23270 es capaz de crecer hasta una concentración aproximada de 40 mM de  $\text{CuSO}_4$ , mientras que la cepa ATCC 53993 puede crecer a concentraciones mayores de 100 mM del mismo compuesto.

En nuestro laboratorio se realizó una búsqueda de los posibles determinantes de resistencia a cobre en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y se comprobó que éstos aumentan su expresión genética cuando esta bacteria crece en presencia del metal. Asimismo, se demostró que la expresión heteróloga de algunos de estos determinantes aumentan la resistencia al cobre de cepas de *E. coli* sensibles a este metal (Navarro y col., 2009). Dentro de estos determinantes de resistencia a cobre propuestos se encuentran proteínas encargadas del eflujo del metal, que consisten principalmente en tres P-ATPasas de cobre y un sistema del tipo RND (tipo CusCFBA). Por otro lado, se determinó un sistema de secuestro del cobre a través de chaperonas del metal tipo CusF y CopC (Navarro y col., 2009). Además, en nuestro laboratorio, se analizó mediante proteómica cuantitativa ICPL, la expresión de algunas proteínas que podrían estar involucradas en la resistencia a cobre cuando se crece *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en presencia de 40 mM de cobre. En este estudio, se observó la sobreexpresión de proteínas de los sistema CusCFBA, una gran cantidad de proteínas involucradas en la síntesis de cisteína e histidina y un aumento en la síntesis de una posible disulfuro isomerasa periplasmática. Conjuntamente, se vio altamente sobreexpresada una chaperona citoplasmática del tipo CopZ que podría estar implicada en la resistencia a cobre (Almárcegui y col., 2014). Se observó también la disminución de algunas porinas y de algunos transportadores de iones, los que posiblemente están involucrados en el ingreso del cobre.

Por otra parte, existe evidencia de que los poliP podrían estar involucrados en la resistencia a cobre en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En relación a esto, se demostró que en presencia de cobre existe una disminución de los niveles intracelulares de poliP, junto

con un aumento de la actividad de PPX y del eflujo de  $P_i$  al medio extracelular (Álvarez y Jerez., 2004; Remonsellez y col., 2006).

Teniendo en cuenta los estudios realizados en la cepa ATCC 23270 y la diferencia en la resistencia a cobre con la cepa ATCC 53993, se realizó en nuestro laboratorio una comparación del genoma de estas dos cepas mostrando desigualdades que podrían ser parte de la diferencia de resistencia a cobre de dichas cepas. Se concluyó que la cepa ATCC 53993 contiene todos los genes de resistencia a cobre presentes en la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, cuyos ORFs tienen un 100% de identidad entre ambas secuencias de DNA. Sin embargo, lo que las hace diferentes es la presencia de ORFs putativos adicionales en la cepa ATCC 53993 que están relacionados con la resistencia a metales. Estos genes se encuentran incluidos en una región de DNA o isla genómica que está ausente en el genoma de la cepa ATCC 23270 que codifican para determinantes de resistencia a cobre como lo son: ATPasa tipo-P, sistema CusCBA y chaperonas periplasmáticas. Estas proteínas resultaron ser funcionales cuando se expresaron heterológicamente en una cepa de *E. coli* sensible al cobre, aumentando así su resistencia al metal. Estos resultados sugieren fuertemente que las diferencias en la resistencia a cobre en las dos cepas de *A. ferrooxidans* pueden estar determinadas por pequeñas diferencias en sus genomas (Orellana y Jerez., 2011)

Dada la gran diferencia de concentraciones de metal que pueden soportar estas dos cepas de *A. ferrooxidans* y la pequeña diferencia que existe en su genoma, resulta interesante poder estudiar mediante un análisis proteómico y transcriptómico, las posibles proteínas, mecanismos o adaptaciones que podrían estar relacionados con la mayor resistencia de esta cepa al metal.

#### 1.4 Objetivo general

Determinar el efecto de la presencia de cobre sobre el proteoma de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y analizar la expresión transcripcional de algunos genes que resulten de interés.

#### 1.5 Objetivos específicos

1. Determinar mediante proteómica cuantitativa ICPL la variación en los niveles de proteínas de un extracto total de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 crecida en presencia o ausencia de cobre, usando hierro como fuente energética.
2. Cuantificar mediante qRT-PCR la expresión de genes que resulten relevantes en el análisis de la proteómica cuantitativa.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas y condiciones de cultivos

Se utilizó la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 para todos los experimentos de este Seminario de Título. Las bacterias se crecieron en un medio de cultivo con ión ferroso como fuente de energía y se cultivaron a 30°C con agitación rotatoria de 150 rpm. El medio de cultivo corresponde a una modificación del medio 9K ajustado a pH 1,45, el cual contiene (g/l) 0,4 de  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,04 de  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$  y 33,3 de  $\text{FeSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (Amaro y col., 1991).

El crecimiento bacteriano se determinó por el recuento del número de células mediante un microscopio óptico Olympus BX50 y utilizando una cámara de conteo Petroff-Hausser.

### 2.2 Crecimiento de células de *A. ferrooxidans* sucesivamente adaptadas a cobre

Para obtener cultivos sucesivamente adaptados a cobre, se partió con un inóculo de células que nunca habían estado en contacto con cobre y se realizaron subcultivos sucesivos en los que la concentración de  $\text{CuSO}_4$  se fue aumentando. Una vez alcanzada la concentración deseada, se realizaron tres subcultivos sucesivos en la misma concentración. Se ocuparon medios con concentraciones finales de 40, 100 y 300 mM de  $\text{CuSO}_4$ . En todos los casos se utilizó una solución stock 1 M de  $\text{CuSO}_4$  filtrada (Millex GV 0,22  $\mu\text{m}$ , Durapore) ajustada a pH 1,45.

Las células se crecieron hasta llegar a la fase exponencial tardía de crecimiento (aproximadamente a las 72 h), donde se colectaron para su utilización inmediata en los diferentes experimentos.

## **2.3 Técnicas de biología molecular**

### **2.3.1 Extracción del DNA genómico.**

Las células de *A. ferrooxidans* provenientes de un cultivo de 600 ml crecido hasta la fase exponencial tardía se colectaron por centrifugación a 5000 x g por 15 min y se lavaron dos veces con 750 µl de una solución de agua ácida (pH = 1,5) y dos veces con 750 µl de una solución de citrato de sodio (10 mM pH = 7). Estos lavados tienen como finalidad extraer el Fe<sup>3+</sup> y el medio remanente de las células. Luego, para extraer el DNA, se utilizó el “Wizard® Genome DNA purification kit” (Promega), según las recomendaciones para bacterias Gram-negativas, el cual se basa en la lisis celular seguida de una digestión enzimática del RNA, una posterior precipitación del DNA genómico con isopropanol y una solubilización con agua.

### **2.3.2 Cuantificación del DNA**

La cuantificación del DNA genómico se realizó por la medición de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) en un equipo espectrofotómetro para multi-volúmenes Epoch (Biotek). Para la cuantificación de DNA genómico se utilizaron 2 µl de una dilución 1:5 del DNA genómico extraído. Una  $A_{260}$  igual a 1 corresponde a una solución de DNA de 50 µg/ml. La pureza se determinó obteniendo la razón de  $A_{260}/A_{280}$ . Se utilizó una preparación de

DNA con una razón  $A_{260}/A_{280} > 1,8$ , considerado como una medida de baja cantidad de proteínas.

### 2.3.3 Electroforesis en geles de agarosa

Para comprobar la calidad e integridad de los ácidos nucleicos y el tamaño de los fragmentos de DNA amplificados por PCR, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 1X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA), utilizando GelRed Nucleic Acid Gel Stain como método de tinción. Todas las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25 % de bromofenol, 50 % glicerol, EDTA 1 mM, 10 mM Tris-HCl (pH =7,6) y se separaron a 100 V por 25 min. Los geles con las muestras ya separadas se visualizaron por la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta de 320 nm.

### 2.3.4 Diseño de partidores para las reacciones de PCR y qRT-PCR

Para la amplificación de los fragmentos de cada uno de los genes en este estudio, se diseñaron partidores utilizando la secuencia anotada del genoma de *A. ferrooxidans* cepa ATCC 53993. El diseño se realizó utilizando el programa Geneious, que utiliza la herramienta WEB Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y se sintetizaron por la empresa Integrated DNA Technologies ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). Se escogieron partidores con un largo entre 18 a 30 nucleótidos, con un contenido guanina-citocina de al menos 50%, con estructuras secundarias débiles y que permitieran obtener un amplificado entre 100 a 250 pb para las reacciones de qRT-PCR.

### 2.3.5 Reacciones de PCR

Cada reacción de PCR se montó en un volumen final de 50  $\mu$ l el cual contiene 5  $\mu$ l de buffer 10X (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> y pH 8,3), 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l de cada pareja de partidores en concentración 10  $\mu$ M, DNA genómico como molde (<1 ng), 0,25  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (New England Biolabs) y H<sub>2</sub>O hasta completar los 50  $\mu$ l. Para la amplificación se utilizó un programa que consta de 5 min a 95 °C para la desnaturalización inicial, 30 ciclos con 30 s a 94 °C, 30 s a 55-60°C (5° menos que la T<sub>m</sub> de la pareja de partidores), 0,3 a 2,0 min de extensión a 68°C (1 minuto/kb) y finalmente una etapa de 10 min a 68°C. En este trabajo se realizaron reacciones de PCR para comprobar la inexistencia de contaminación con DNA en la síntesis de DNAc. Para esto se amplificó un fragmento del gen 16S, que corresponde a la molécula de RNA de la subunidad ribosomal 30s. Como molde se usó el DNAc diluido 1:20 veces con y sin transcriptasa reversa (ver sección 2.3.9).

### 2.3.6 Extracción de RNA total

Para la extracción del RNA total de *A. ferrooxidans* se utilizó una versión modificada del método de TRIzol (Invitrogen). Este reactivo es una solución de fenol ácido e isotiocianato de guanidinio. El fenol ácido permite la partición del RNA en la fase acuosa y el isotiocianato de guanidinio permite la desnaturalización de proteínas como las RNasas. Para la extracción de RNA se crecieron cultivos de 600 ml hasta su fase exponencial tardía y se colectaron las células por centrifugación a 5000 rpm por 15 min a 4°C. Posteriormente, el pellet obtenido se lavó dos veces con agua ácida (pH = 1,5) y luego dos veces con citrato de sodio (10 mM pH = 7,0). Se usó entre 10 a 20 mg de peso

húmedo de células y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de una solución de lisis celular (acetato de sodio 0,02M pH = 5,5; SDS 0,5%; EDTA 1 mM), incubándose a 70°C por 5 min. A cada resuspensión celular se le agregó 1 ml de solución de TRIzol (Invitrogen) y se mezcló por inversión para luego incubar por 5 min a 70°C. Inmediatamente se agregaron 200  $\mu$ l de cloroformo y se homogeneizó con vortex. Seguidamente se centrifugó a 10000 x g por 10 min a 4°C y se recuperó la fase acuosa (sobrenadante) que contiene el RNA. De acuerdo a la cantidad de fase acuosa recuperada, se precipitó el RNA con isopropanol al 100% en una relación de 1:1. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min y luego se centrifugó a 4°C a 13000 x g por 10 min. El pellet obtenido se secó y se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Para eliminar la posible contaminación por DNA, el RNA se trató con 4U (2  $\mu$ l) de DNasa libre de RNasas "TURBO DNA-free" (Ambion) por 60 min a 37°C. Se usó un volumen final de 100  $\mu$ l, de los cuales 10  $\mu$ l corresponden a RNA (concentración máxima de 2000 ng/ $\mu$ l), 10  $\mu$ l "Buffer DNA-free" y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final. Se agregaron 10  $\mu$ l de buffer "DNase inactivation" y se incubó a temperatura ambiente por 15 min para luego centrifugar a 10000 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa (100  $\mu$ l aprox.) y se precipitó el RNA con 2,5 volúmenes de etanol 100% y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M durante toda la noche. Para ayudar a la precipitación, se centrifugó por 13000 x rpm por 30 min a 4°C. El pellet obtenido se lavó dos veces con 700  $\mu$ l de etanol 70% para finalmente resuspender el RNA libre de DNA en 20  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. Para comprobar la integridad del RNA obtenido se realizaron electroforesis en geles de agarosa antes y después del tratamiento con DNAsas. Para determinar la concentración del RNA se utilizaron 2  $\mu$ l de la suspensión y se midió la

$A_{260}$  en un equipo espectrofotómetro de multi-volumenes Epoch (Biotek). Se utilizó la relación  $1 \text{ DO}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/mL}$  para cuantificar el RNA presente en la muestra. Se estimó la pureza del RNA por la razón  $A_{260}/A_{280}$ . Se utilizó una preparación de RNA con una razón  $A_{260}/A_{280} > 1,8$ .

### 2.3.7 Transcripción inversa

Para la obtención del cDNA en cada condición de estudio se realizó una transcripción inversa del RNA extraído. Se ocuparon  $0,8 \mu\text{g}$  del RNA y  $0,5 \mu\text{g}$  de hexadesoxinucleótidos al azar (Random hexamer primer, Promega). Se incubó una mezcla de  $5 \mu\text{l}$  que contenía el RNA y los partidores a  $70^\circ\text{C}$  por 5 min para la desnaturalización de las estructuras secundarias del RNA y facilitar así la hibridización de los partidores. Posteriormente, se incubó en hielo por 5 min donde se le agregó  $15 \mu\text{l}$  de una mezcla de amortiguador "ImProm-II" 5x (Promega), dNTPs  $0,5 \text{ mM}$  cada uno,  $3 \text{ mM}$  de  $\text{MgCl}_2$ , y 1 U de la transcriptasa reversa (TR) "ImProm-II" (Promega). La reacción de síntesis incluyó una incubación inicial por 10 min a  $25^\circ\text{C}$  para inducir la unión de los partidores y la síntesis se realizó por 1 h a  $42^\circ\text{C}$ . Para finalizar la reacción, se procedió a la desnaturalización de la transcriptasa reversa incubando por 15 min a  $70^\circ\text{C}$ .

### 2.3.8 Reacciones de qRT-PCR

La cuantificación de la transcripción de los diferentes genes de *A. ferrooxidans* se realizó mediante la técnica de qRT-PCR. Estos experimentos se desarrollaron en el equipo Corbett Rotor Gene 6000 (Corbett Research®) y las reacciones se hicieron en

tubos del tipo “Strip tube” de 0,1 ml (Corbett Research®) en un volumen final de 25  $\mu$ l para cada reacción. Para las mediciones de los genes de interés se usó 1  $\mu$ M final de cada partidor, 1  $\mu$ l de DNAc previamente obtenido (ver sección 2.3.8), diluido en 1:20 en el caso de los genes de estudio y en 1:200 para el caso del gen de referencia 16S y 12,5  $\mu$ l de “master mix” QuantiFast SYBR Green (Quiagen®). Las condiciones de amplificación fueron de 10 min de desnaturación y activación enzimática a 95°C, seguido de 30 ciclos de 10 s a 95°C (desnaturalización) y 30 s a 60°C (apareamiento y extensión). La especificidad de las amplificaciones se comprobó por análisis de curvas de fusión realizadas con el mismo equipo.

### 2.3.9 Cuantificación de transcritos por qRT-PCR

Para el análisis de la transcripción de los diferentes genes a estudiar se utilizó el método de cuantificación relativa, el cual se basa en la razón de los transcritos de una muestra de estudio versus una muestra control. En este caso se cuantificó la cantidad de transcritos de una muestra crecida en presencia de cobre contra una muestra crecida sin cobre. Este método determina los cambios en los niveles de mRNA de un gen respecto de los niveles de otro gen, cuyos niveles permanecen constantes en la condición experimental que se está estudiando. Se construyeron curvas a partir de cinco diluciones seriadas de DNA genómico de *A. ferrooxidans* cuyo rango fue desde 10 ng/ $\mu$ l a 1 pg/ $\mu$ l. Al graficar el valor de CT, ciclo en el cual la amplificación comienza a ser exponencial, versus el logaritmo de la concentración de DNA, se obtiene una recta con pendiente negativa (m), con la cual podemos determinar la eficiencia (E) de la reacción para cada pareja de partidores. Se consideró que una eficiencia óptima se encuentra en rectas con pendientes



que oscilan entre -3,743 y -3,322, lo que significa una eficiencia de un 85-100%, respectivamente. Conociendo este valor (E) y el CT de nuestras muestras, podemos utilizar la siguiente fórmula para determinar la expresión relativa de un gen en una determinada situación experimental (Pfaffl., 2001):

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E+1)^{\Delta\text{CT gen de estudio (condición control- condición experimental)}}}{(E+1)^{\Delta\text{CT gen referencia (condición control- condición experimental)}}$$

Se desarrollaron 3 réplicas biológicas, con preparaciones independientes de RNA y de DNAc. Como gen de referencia se utilizó el gen 16S. Se escogió este gen de referencia debido a que su expresión no se ve afectada por la presencia de cobre.

## **2.4 Métodos para el análisis de proteínas**

### **2.4.1 Preparación de extracto total de proteínas para análisis por ICPL**

*A. ferrooxidans* ATCC 53993 se creció hasta la fase exponencial tardía en medios de cultivo líquido con hierro en presencia o ausencia de CuSO<sub>4</sub>. Las células se obtuvieron por centrifugación (5000 rpm por 15 min a 4 °C) y se lavaron 3 veces con agua ácida (pH 1,5), seguido por el lavado con citrato de sodio (pH=7) con el fin de remover el exceso de hierro y al mismo tiempo neutralizar el pH antes de la ruptura celular mediante sonicación.

Para la preparación de los extractos proteicos, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución amortiguadora de sonicación (50 mM Tris-HCl pH 8,15, 1 mM EDTA y 100 µg/ml PMSF) a una razón de 10 µl de amortiguador por 1 mg de peso húmedo de células. La lisis se realizó mediante un programa de sonicación en hielo,

durante 15 pulsos de 15 segundos cada uno. Se utilizó el equipo sonicador Ultrasonic Homogenizer 4710 serie, Coler Parmer®. Consecutivamente, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 min y se descartó el precipitado (debris celular). Finalmente, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 mL y se utilizó como extracto proteico para realizar los análisis de proteómica.

#### **2.4.2 Cuantificación de proteínas**

Los extractos de proteínas totales se cuantificaron según el método de Bradford usando el sistema comercial Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce®).

#### **2.4.3 Preparación de las muestras de proteínas para ser analizadas por ICPL**

Para la preparación de las muestras, se tomaron 50 µg de extracto de proteínas totales, provenientes de 3 cultivos independientes y se mezclaron en un tubo de 1,5 mL para dar un total de 150 µg de proteína. Estas mezclas proteicas se liofilizaron por 48 h a -40°C. Las muestras se guardaron a -20°C hasta el momento de ser despachadas al Centro Nacional de Biotecnología en España, para realizar los análisis de proteómica mediante la técnica cuantitativa ICPL (Isotope-coded protein label).

#### **2.4.4 Digestión proteica y marcaje para el ICPL**

Se optimizó el protocolo del reactivo de ICPL para marcar 100 µg de muestra individual por experimento. De esta manera, cada muestra (100 µg de extractos proteicos totales) se disolvió en 8 M urea y 25 mM bicarbonato de amonio, y se redujo y alquiló con iodoacetamida. La concentración de urea se disminuyó a 2 M urea con 25 mM bicarbonato de amonio y la muestra se digirió con tripsina (Roche Diagnostics GmbH)

en una razón de 25:1 durante la noche a 37 °C. El marcaje de las muestras con las versiones liviana y pesada del reactivo de ICPL (Serva electrophoresis) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **2.4.5 Identificación de proteínas y análisis cuantitativo**

Los datos obtenidos por MS y MS/MS desde las fracciones de HPLC individuales se combinaron usando el “Analysis Combiner tool” y posteriormente se procesaron como un experimento aislado usando DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics). Para la identificación proteica, el espectro MS/MS (en la forma de archivos MASCOT genéricos) se analizó contra la base de datos “forward-reversed” de UniprotKB de *A. ferrooxidans* cepa ATCC 53993 (<http://www.uniprot.org>). Las secuencias se hicieron utilizando el programa DBToolkit v4.1.5. La búsqueda con la base de datos se realizó usando una versión licenciada de Mascot v.2.2.04 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Matrix Science).

### **2.5 Métodos bioinformáticos**

#### **2.5.1 Análisis de secuencia y alineamientos genéticos**

Para analizar los genes de *A. ferrooxidans*, se utilizaron herramientas bioinformáticas tales como el software Geneious, un programa que recopila distintas herramientas bioinformáticas que permiten evaluar los contextos genómicos de los genes deseados, realizar alineamientos de secuencias y diseño de partidores. Este programa cuenta con una base de datos de secuencias aisladas y genomas completos de diferentes microorganismos, lo que permite la comparación y estudio de diferentes proteínas

(<http://www.geneious.com/>). Se utilizó también la herramienta online BLAST, que permitió inferir relaciones funcionales a través de la comparación de homologías de secuencias nucleotídicas entre diversos organismos y el porcentaje de identidad existente entre los distintos genes y proteínas encontradas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) es otra herramienta en línea que se utilizó para acceder a información completa sobre las secuencias de proteínas de interés y poder utilizarlas en el programa ClustalW Aligment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para hacer alineamientos múltiples de las secuencias aminoacídicas. Además, para la clasificación de las categorías funcionales de las proteínas analizadas por ICPL se utilizó la herramienta informática COGnitor que permite asignar un COG (Clusters of Orthologous Groups) con base en la secuencia aminoacídica de una proteína. Finalmente, se utilizaron los programas CELLO v.2.5 y PSORTb v.3 para predecir la ubicación subcelular de proteínas a partir de su secuencia de aminoácidos.

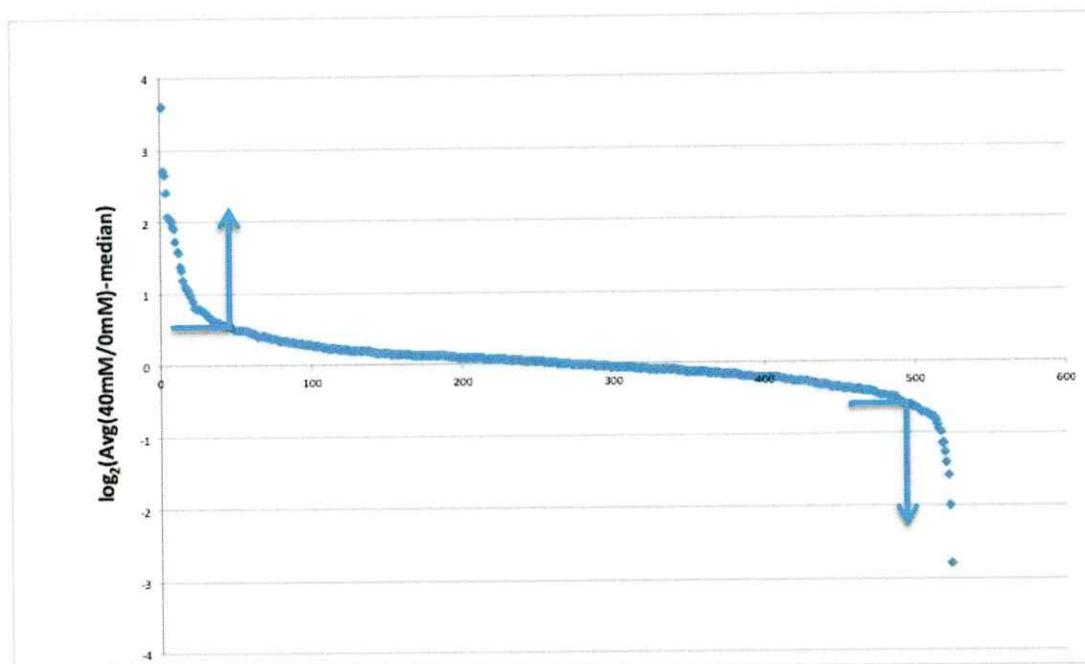
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Cambios cuantitativos en el proteoma total de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 crecidos en hierro y en presencia de 40 mM de cobre.

Se analizaron muestras provenientes de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 crecidos en hierro a 0 o 40 mM de CuSO<sub>4</sub> mediante proteómica cuantitativa ICPL. Se observaron proteínas que cambian sus niveles en presencia de cobre comparadas con la condición control, en ausencia de cobre (Tabla 1). En resumen, se encontraron 49 proteínas que experimentaron cambios (33 aumentaron y 16 disminuyeron). Se consideraron que cambiaron significativamente las proteínas cuyo log<sub>2</sub> del factor de cambio (0 mM Cu/40mM Cu)-mediana fue superior a 0,5 o inferior a -0,65 y de las cuales se identificaron al menos 2 péptidos. El criterio utilizado para la selección de los rangos de corte se determinó por un análisis en el cual se graficó la razón log<sub>2</sub> (Avg(0mM Cu/40mM Cu)-mediana) versus la posición que ocupa la proteína. Los resultados de este análisis mostraron que a partir de los valores 0,5 y -0,65 se observaba una desviación (punto de inflexión) de los datos respecto al eje central en donde se agruparon la mayoría de las proteínas (Figura 5).

Tabla 1. Resultados globales de las proteínas de *A. ferrooxidans* crecidos en hierro y cuantificados por ICPL.

Categoría	Número
Proteínas identificadas	523
Proteínas que cambiaron significativamente	49
Proteínas que aumentaron	33
Proteínas que disminuyeron	16



**Figura 5. Análisis de proteínas que cambian significativamente la expresión en presencia de  $\text{CuSO}_4$ .** Los puntos de inflexión de la curva (indicados con una flecha azul), se utilizaron como rango de corte para determinar aquellas proteínas que cambiaron significativamente sus niveles en presencia de  $\text{CuSO}_4$ .

Para un mejor análisis y estudio de las proteínas que cambiaron sus niveles, éstas se agruparon según sus categorías funcionales. Con este objetivo cada uno de los ORFs identificados se categorizó según la anotación disponible del genoma de *A. ferrooxidans* 53993, usando la clasificación entregada por la base de datos COG (Clusters of Orthologous Groups) (Tablas 2 y 2B). Aquellas proteínas cuyos ORFs no tenían un COG asociado se clasificaron utilizando el programa COGnitor.

Tabla 2A. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en *A. ferrooxidans* ATCC 53993 crecidos en hierro en presencia de 40 mM CuSO<sub>4</sub>.

Categorías Funcionales	Nombre/ función	Log <sub>2</sub> (Avg(40mM/0mM) -mediana)	Gen	Nº de péptidos
<b>METABOLISMO</b>				
Metabolismo y transporte de Iones Inorgánicos	-Bomba de eflujo de metales pesados, familia Czca	1,58	<i>CusA2</i>	6
	-Receptor dependiente de TonB	1,36		6
	-Proteína de membrana externa de eflujo	2,02	<i>CusC2</i>	5
	-Proteína de membrana externa de eflujo	2,04	<i>CusC1</i>	4
	-Transportador, Eflujo de metales pesados, Subunidad MFP	1,76	<i>CusB1</i>	3
	-Transportador, Eflujo de metales pesados, Subunidad MFP	1,93	<i>CusB3</i>	6
	Metabolismo y transporte de aminoácidos	-Glutamato sintasa (ferredoxina)	1,06	<i>gltB</i>
-Dihidrodipicolinato sintasa		0,98		6
Metabolismo y transporte de carbohidratos	-Inositol-fosfato fosfatasa	2,06		2
	-Fosfoglicerato mutasa 1	1,04	<i>gpml-2</i>	2
	-Proteína de la familia ROK	3,58		2
Metabolismo y transporte de lípidos	-Enoil-[proteína transportadora de acil] reductasa (NADH)	0,58	<i>fabI</i>	13
Producción y conversión de energía	-NADH quinona óxido reductasa subunidad D	1,56	<i>nouD</i>	2
	-NADH quinona óxido reductasa, cadena G	1,31	<i>nucG</i>	6
	-Citocromo c clase I	0,78	<i>Cyc1</i>	19
	-Citocromo c oxidasa subunidad II	0,75	<i>CoxB</i>	35
	-Citocromo c	0,66	<i>Cyc2</i>	18
	-Hidrogeno: quinona óxido reductasa	0,67		12
	-Rusticianina	0,56	<i>Rus</i>	93
	-Citocromo c oxidasa subunidad I	0,54	<i>CoxA</i>	32

Tabla 2A. Continuación.

Categorías Funcionales	Nombre/ función	log(Avg <sub>2</sub> (40mM/0mM)- mediana)	Gen	Nº de péptidos
<b>PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACION</b>				
Mecanismo de transducción de señales	-Sigma54, regulador transcripcional, dos componentes, familia Fis específica	1,13	Lferr_2568	4
Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular	-Fosfolipasa C	0,59		8
	-Proteína bifuncional RfaE	0,51	RfaE	3
Modificaciones post transduccionales, recambio proteico y chaperonas moleculares	-Proteína putativa no caracterizada	2,75	CusF3	3
	-Proteína putativa no caracterizada	2,64	CusF2	3
	-Proteína banda 7	1,94		2
	-Proteína de la familia ResB	1,17	ResB	14
	-Proteína chaperona HtpG	0,87		27
	-Proteína biogénesis citocromo CcsB	0,49	ResC	1
<b>ALMACENAMIENTO DE INFORMACION Y PROCESAMIENTO</b>				
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	-Proteína ribosomal 30S S13	0,53		12
<b>PROTEINAS NO CARACTERIZADAS</b>				
Solo función General predicha	-Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa dependiente de FAD	0,52		53
Función desconocida	-Proteína putativa no caracterizada	2,46	Lferr_1368	1
	-Proteína putativa no caracterizada	0,63	Lferr_2749	19

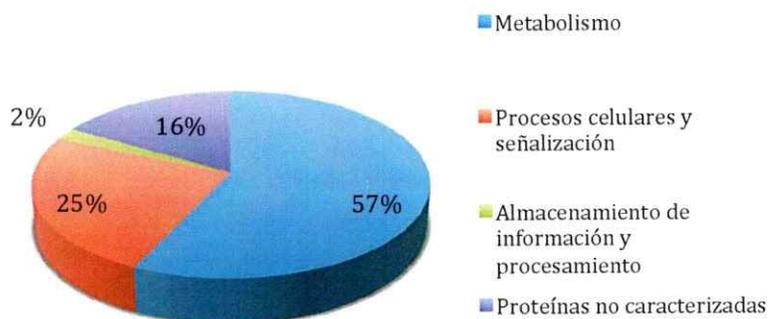
Tabla 2B. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en *A. ferrooxidans* ATCC 53993 crecidos en hierro en presencia de 40 mM CuSO<sub>4</sub>.

Categorías Funcionales	Nombre/ función	Log <sub>2</sub> (Avg(40mM/0mM) -mediana)	Gen	Nº de péptidos
<b>METABOLISMO</b>				
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	-Proteína de dominio Rodanasa	-0,77	Lferr_1706	2
	-Familia de proteínas de unión a soluto extracelular	-1,63		2
	-Proteína de membrana externa de eflujo	-2,01		2
Metabolismo y transporte de carbohidratos	-Región central Transcetolasa	-0,72	cbbS-1	46
	-Cetosa-aldolasa bifosfato de clase II	-0,72		6
	-Carboxilasa ribulosa-bifosfato	-0,69		5
Metabolismo y transporte de lípidos	-Beta-cetoacil sintasa	-1,14		7
Producción y conversión de energía	-Piruvato deshidrogenasa	-0,72		6
	-NADH/ ubiquinona/ plastoquinona (complejo I)	-0,76		6
<b>PROCESOS CELULARES Y SEÑALIZACION</b>				
Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular	-Glicosil transferasa grupo 1	-1,14	rfaD	3
	-ADP-L-glicerol-D-manno-heptosa-6-epimerasa	-1,26		2
<b>PROTEINAS NO CARACTERIZADAS</b>				
Solo función General predicha	-Alquilo hidroperoxidasa como la familia AhpC	-0,83	ahpD	4
Función desconocida	-Proteína UPF0753	-0,65	Lferr_0478 Lferr_2073	63
	-Proteína putativa no caracterizada	-0,67		11
	-Proteína putativa no caracterizada	-1,44		1
	-Pirroloquinolina quinona	-2,82		6

Se observó que la categoría funcional con el mayor número de cambios en presencia de 40 mM CuSO<sub>4</sub> corresponde al metabolismo, considerando tanto aumentos como disminuciones en los niveles de proteínas. Esta categoría representa un 57% de las proteínas totales que cambiaron sus niveles. La siguiente categoría funcional más representada fue la de procesos celulares y señalización (25%) y finalmente procesamiento y almacenaje de la información (2%). Además de esto, hubo un grupo importante de proteínas cuya función se desconoce. Dentro de esta categoría encontramos un 16% del total de proteínas (Figura 6A).

Un desglose de las categorías funcionales ya mencionadas nos permitió establecer que dentro del metabolismo las funciones que experimentaron mayor cantidad de cambios fueron producción de energía y conversión, junto con el metabolismo y transporte de iones inorgánicos. Las proteínas que experimentaron cambios (aumentan o disminuyen) en sus niveles dentro de las categorías ya mencionadas representan un 22,4% y un 16,3% respectivamente.

### Categorías funcionales (Fe 40mM Cu)



Categoría Funcional	N° de proteínas	proteínas +	proteínas -	%
<b>Metabolismo</b>				
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	8	6	2	16,3
Metabolismo y transporte de aminoácidos	2	2	0	4,1
Metabolismo y transporte de carbohidratos	5	3	2	10,2
Metabolismo y transporte de lípidos	2	1	1	4,1
Producción de energía y conversión	11	8	3	22,4
<b>Procesos celulares y señalización</b>				
Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas	6	6	0	12,2
Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular	5	2	3	10,2
Mecanismo de transducción de señales	1	1	0	2,0
<b>Almacenamiento de información y procesamiento</b>				
Transcripción	1	1	0	2,0
<b>Proteínas no caracterizadas</b>				
Solo con función general predicha	1	1	0	2,0
Función desconocida	7	2	5	14,3
<b>TOTAL</b>	<b>49</b>	<b>33</b>	<b>16</b>	<b>100,0</b>

Figura 6. Análisis global de las proteínas de *A. ferrooxidans* 53993 que experimentaron cambios en presencia de cobre. A, distribución de las proteínas según categorías funcionales. B, desglose del porcentaje de distribución.

Otras proteínas que experimentaron cambios en sus niveles son las agrupadas en la categoría de metabolismo de carbohidratos que representan un 10,2%; aquellas que están relacionadas con el metabolismo y transporte de aminoácidos, un 4,1%; y aquellas relacionadas con el metabolismo de lípidos, un 4,1%. El resto de las categorías funcionales dentro del metabolismo no experimentaron cambios. Finalmente, dentro de la categoría funcional, almacenamiento y procesamiento de la información, se observó

que tan solo una proteína dentro de esta categoría, representando sólo un 2% de las proteínas totales que cambiaron (Figura 6B).

La subcategoría metabolismo y transporte de iones inorgánicos resulta de gran interés, ya que la mayoría de los mecanismos de resistencia a altas concentraciones de cobre, identificados en otros microorganismos, se llevan a cabo por proteínas clasificadas dentro de esta categoría. De hecho, el 60% de las proteínas que sufrieron cambios en esta subcategoría del metabolismo, son proteínas que pertenecen al sistema de eflujo del tipo CusCFBA. Estos sistemas, como se describió anteriormente, están involucrados en la resistencia a cobre. Además, la mayoría de estos sistemas son parte de la isla genómica exclusiva de la cepa *A. ferrooxidans* 53993. Estos resultados apoyarían la hipótesis propuesta en nuestro laboratorio, según la cual se propone que la mayor capacidad de resistencia a este metal de *A. ferrooxidans* 53993 se relaciona con el mayor número de genes relacionados con la resistencia a cobre.

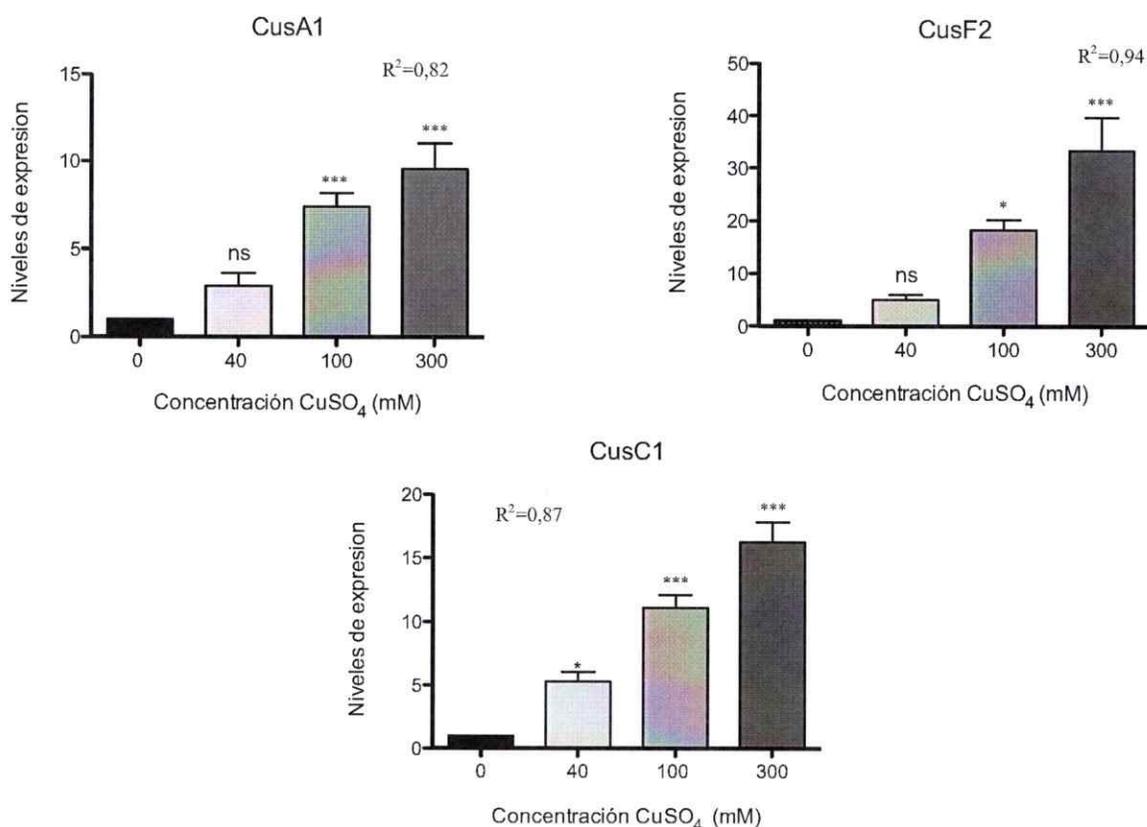
Dentro del metabolismo energético observamos un aumento de las proteínas que están relacionadas con la oxidación del hierro. Esta vía resulta de gran importancia para este microorganismo ya que así es como obtiene su poder reductor. Además, en nuestro laboratorio se ha propuesto un posible determinante de resistencia a cobre que es parte de esta vía.

### **3.2 Expresión de los genes que codifican para algunas proteínas de interés inducidas por la presencia de cobre.**

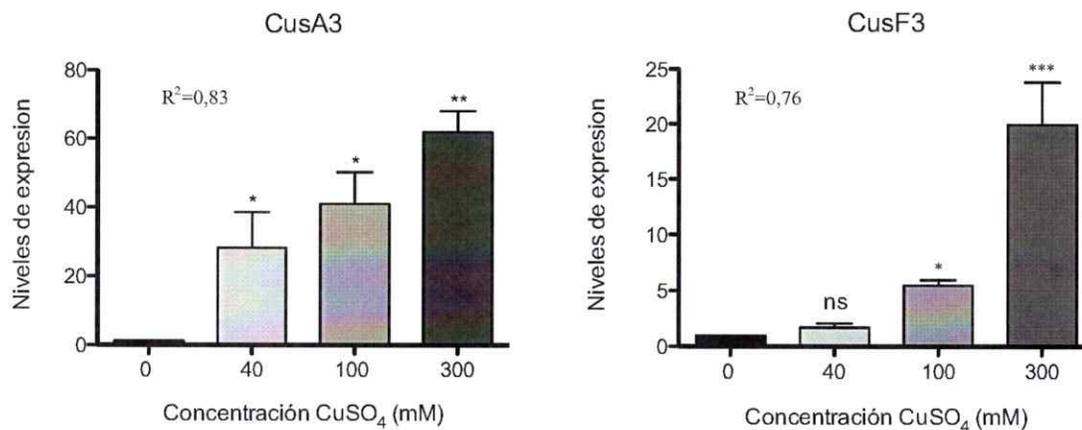
Para medir los cambios en la expresión génica y determinar si la inducción de la expresión se observa a mayores concentraciones de cobre, se desarrollaron experimentos de PCR en tiempo real a diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  (40, 100, 300 mM) para

algunas proteínas de la Tabla 2 que se expresaron de manera diferencial en presencia de 40 mM de cobre.

Los resultados muestran una fuerte sobreexpresión, proporcional a la concentración de  $\text{CuSO}_4$ , de los genes que codifican al sistema de transporte del tipo RND CusCBA y chaperona CusF presentes tanto en la isla genómica de *A. ferrooxidans*, como los codificados fuera de ésta (Figura 7 y 8).

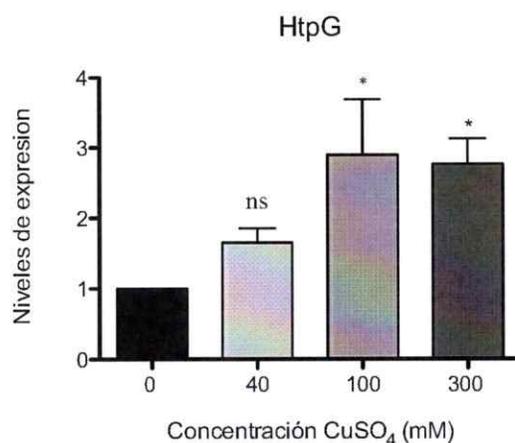


**Figura 7. Expresión relativa de genes que codifican para sistemas de eflujo del tipo RND (CusA1 y CusC1) y chaperona de cobre (CusF2) fuera de la IG de *A. ferrooxidans* 53993.** La expresión se midió en relación al control del experimento que corresponde a células crecidas en ausencia de cobre. Los datos se normalizaron usando los valores de expresión del gen rRNA16S. Los valores se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas y las barras de error muestran la desviación estándar. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con un post test de Dunnett para cada concentración vs el control (sin cobre). Los símbolos; \*\*\* indica  $p \leq 0,001$ , \*\* indica  $p \leq 0,01$ , \* indica  $p \leq 0,05$  y ns indica  $p > 0,05$ .



**Figura 8.** Expresión relativa de genes que codifican al sistema de eflujo del tipo RND (CusA3) y chaperona de cobre (CusF3) en la IG de *A. ferrooxidans* 53993. La expresión se midió como se indica en la Figura 7.

Otra de las proteínas que aumentó de manera diferencial en presencia de 40 mM de cobre fue la chaperona HtpG (Heat shock protein), relacionada con distintos tipos de estrés. Tal como se observa en la Figura 9, el análisis mediante qRT-PCR determinó que los niveles transcripcionales del gen que codifica esta chaperona aumentaron en las tres condiciones ensayadas.



**Figura 9.** Expresión relativa del gen que codifica para la proteína de choque térmico HtpG de *A. ferrooxidans* 53993. La expresión se midió como se indica en la Figura 7.

Además, los resultados muestran una sobreexpresión tanto proteica (Tabla 2) como transcripcional en 40 mM de CuSO<sub>4</sub> del operón *rus* (Figura 10) que participa en la oxidación del hierro. Nuestro laboratorio propuso una posible función para la proteína rusticianina (Rus) en la resistencia a cobre en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Navarro., 2009). Adicionalmente, una de las proteínas de este operón, anotada como hipotética (Lferr\_2749), presenta un dominio de unión a cobre muy conservado. Este dominio se ha caracterizado en otras proteínas de unión a cobre tales como CopC, relacionada con la resistencia a cobre en *P. syringae*.

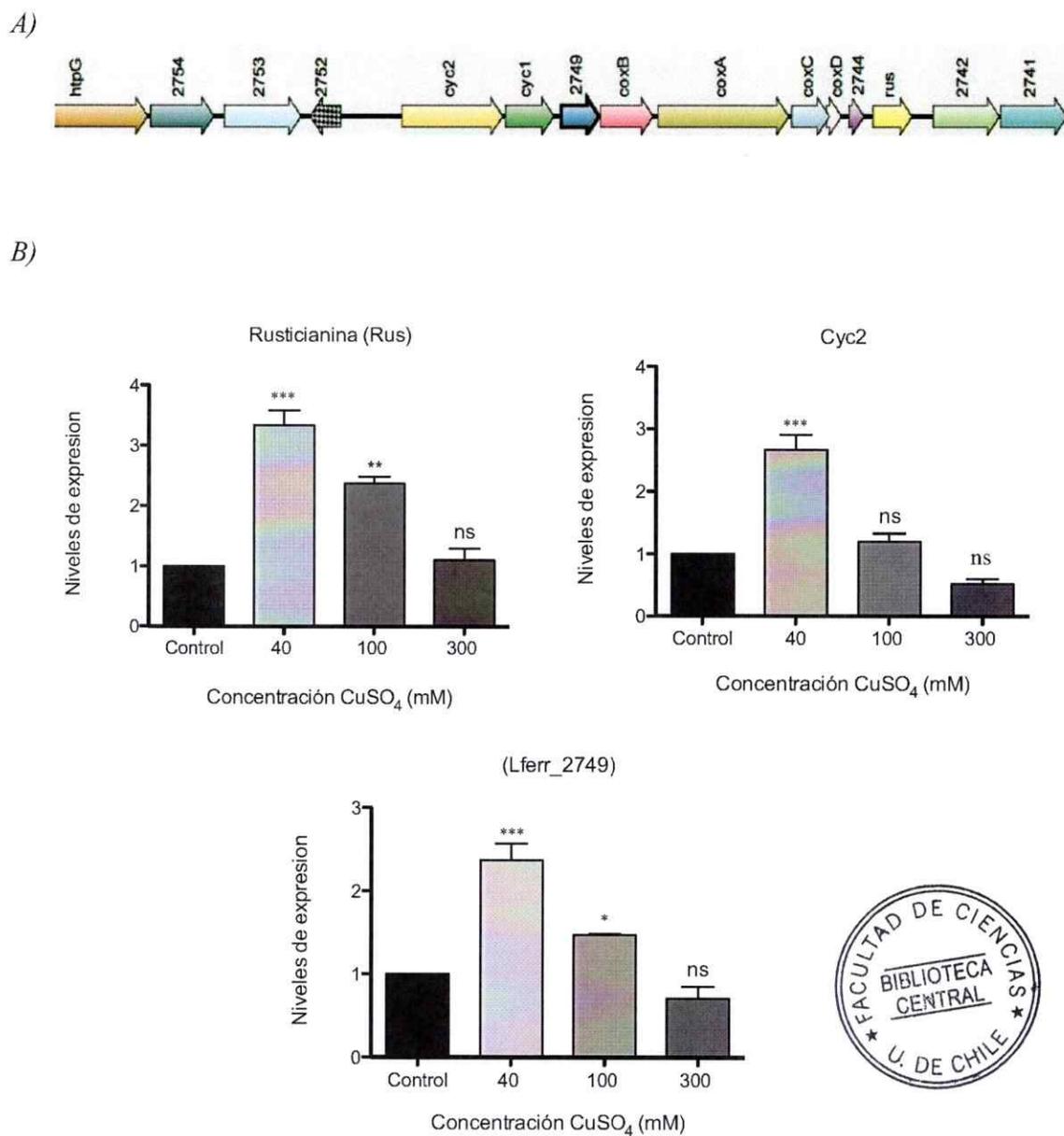


Figura 10. Expresión relativa de genes que codifican parte del operón *rus* en *A. ferrooxidans* ATCC 53993. A, contexto genómico del operón *rus*. B, Expresión relativa de genes que son parte del operón. La expresión se midió como se indica en la Figura 7.

### 3.3 Análisis de secuencia y alineamientos genéticos de la proteína hipotética Lferr\_2749

Para inferir en una primera instancia la posible funcionalidad de la proteína Lferr\_2749 (denominada recientemente AcoP (Roger y col., 2014) se utilizó el programa bioinformático BLASTp, identificando varias proteínas con alto grado de identidad (> 30%) a Lferr\_2749 (Tabla 3). La gran mayoría de éstas se encuentran anotadas como “Proteína hipotética” o como “Multi-oxidasa de cobre”. Gran parte de las proteínas identificadas presentan un dominio muy conservado tipo cupredoxina. Este dominio consiste en un barril  $\beta$  con un largo lazo entre las primeras y las últimas hojas  $\beta$  que cubren la parte superior del barril. Esta familia de proteínas generalmente posee un único átomo de cobre, coordinado por dos residuos de histidina y un residuo de cisteína.

Tabla 3. Lista de proteínas homólogas de Lferr\_2749.

Organismo	Descripción	Cobertura	Identidad
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Proteína hipotética	100%	100%
<i>Acidithiobacillus ferrivorans</i>	Proteína hipotética	100%	88%
<i>Thiobacillus prosperus</i>	Proteína hipotética	97%	45%
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	Proteína hipotética	95%	32%
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	Proteína hipotética	71%	35%
<i>Halorubrum saccharovororum</i>	Multi-oxidasa de cobre tipo 3	62%	32%
<i>Candidatus Halobonum</i>	Multi-oxidasa de cobre	62%	32%
<i>Halogeometricum borinquense</i>	Multi-oxidasa de cobre	62%	31%

Con el objetivo de identificar los aminoácidos conservados en esta proteína, se realizó un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de AcoP contra proteínas con alto grado de identidad (primeras 3 proteínas de la Tabla 3) y proteínas ya caracterizadas de

la misma familia cupredoxina (CopA<sub>Ps</sub>, CopC<sub>Ps</sub> y Rus). Como se observa en la Figura 11, se identificaron varios residuos conservados, especialmente los aminoácidos del sitio de unión a cobre.

La predicción de la ubicación subcelular mediante los programas CELLO v.2.5 y PSORTb v.3 indican que AcoP es probablemente una proteína de periplasma. Con base en estos antecedentes (identidad y motivos de unión a cobre) y la inducción diferencial en presencia de cobre, se podría sugerir que esta proteína tiene alguna relación con la resistencia a cobre, quizás como una chaperona de unión a cobre o como una multi-oxidasa de cobre (Tabla 3).

```

CopA      -----LI-----
CopC      FSGAKLVMTAMPGMEH--SPMGVKTAVSGGGDPKTMIIITPASPLTAGTYKVDWRAVSSDTH
Rus       LE-----IPAGATVDVTFINTNKGFGHSF-----
Sulfobacillus FHNMSL---T---RFHELQIGRHVSTQNTVFGTEN-----ANGFLEDFWQDM
Thiobacillus LFNANH---AQPQONHOWNMGRNLATSSSTGFAQHR-----QPDGWDQNFAGV
ferrivorans IDNRSQ---SAPPIAHQFSIGRILVSRNNGFPKSQL-----ALAVGWKENFFDGV
AcoP      IDNRSQ---SAPPIAHQFSIGRTLVS RDNGFPKSQL-----AIAVGWKNFFDGV

CopA      -VLKKSVA---RIVFD---RKDPSPCLDQIVFPDFGVHANLPMCEEYVVE-ITPEQAGE
CopC      PITGS-----VTFK-----VK-----
Rus       DITKKGPPYAV-----MPVID-PIVAGTGFSPVPKDGKFGYTDFTWHPTAGT
Sulfobacillus PVTLS-NPYLIDNFVIAQAKPTYEGPVSDFMVTPGFPSPTLKPGGHIDISFTVPDKPGI
Thiobacillus TIDTK-S-----GSEK-----VQKDFSVSLTPGQHFTFKFTVPNKPKG
ferrivorans PITSG-----GQTA-----PIPAFSVSLNGGQKYTF SFVVPNKPKG
AcoP      PITSG-----GQTG-----PVPAFSVSLNGGQKYTF SFVVPNKPKG

CopA      FSFACGM-----NMMHGKMIVE-----
CopC      -----
Rus       YYYVCOI--PGEAATGMFGKIVK-----
Sulfobacillus WNYGCFVQAAMEWRFCMOGTLNIIRA---
Thiobacillus WTYACFLQNGQHYLSGMHGTVDVVPANAG
ferrivorans WEWGCFLQTGQHF MNMGHGNIDILPAQGS
AcoP      WEYGCFLQTGQHF MNMGH GILDILPA---

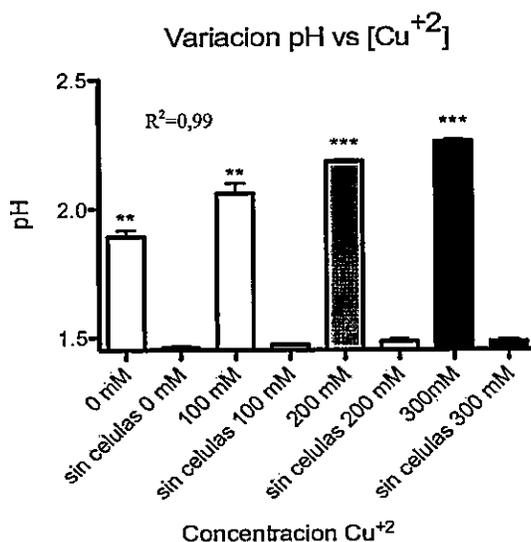
```

Figura 11. Alineamiento múltiple entre Lferr\_2049 (AcoP), proteínas homólogas y chaperonas de cobre más caracterizadas. Los rectángulos rojos indican los aminoácidos que son parte del sitio de unión a cobre.

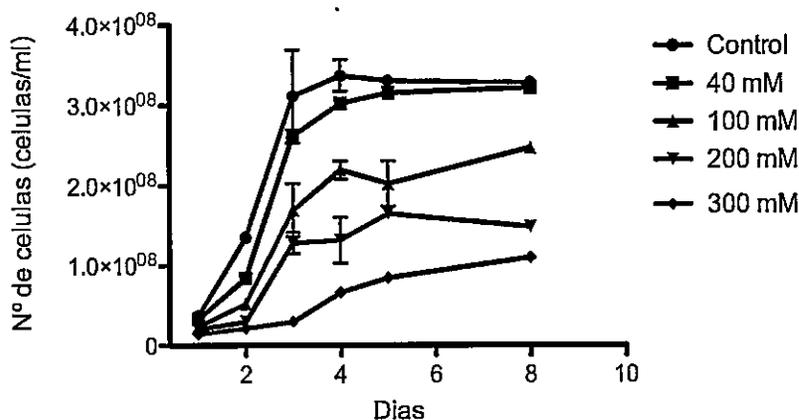
### 3.4 Cambios del pH del medio extracelular durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en $\text{Fe}^{+2}$ .

El sistema CusCBA de eflujo de cobre (perteneciente a la familia de las proteínas RND), utiliza el gradiente de protones para el eflujo del metal desde el citoplasma hasta el medio extracelular. Teniendo en cuenta lo anterior y considerando que el eflujo de un átomo de cobre por el sistema CusCBA requiere el ingreso a la célula de un protón, se esperaría que el pH del medio extracelular aumentara cuando la célula crece en presencia del metal y este sistema se sobreexpresa.

Los resultados muestran que existe un aumento del pH del medio directamente proporcional a la concentración de cobre (Figura 12). Por otra parte, también se observó que el aumento de la concentración de cobre está relacionado con el crecimiento de esta bacteria ya que a medida que se aumenta la concentración de este metal se observa un crecimiento menor en comparación con el control sin cobre (Figura 13).



**Figura 12.** Medición del pH extracelular de *A. ferrooxidans* a diferentes concentraciones de cobre. Para la medición se creció un cultivo de 300 ml de *A. ferrooxidans* hasta la fase estacionaria, se colectó el sobrenadante por centrifugación a  $3.000 \times g$  durante 15 min y se midió el pH. Los valores se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas y las barras de error muestran la desviación estándar. Se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía con un post test de Dunnett donde se comparó cada condición con y sin células. Los símbolos; \*\*\* indica  $p \leq 0,001$ , \*\* indica  $p \leq 0,01$ , \* indica  $p \leq 0,05$  y ns indica  $p > 0,05$ .



**Figura 13.** Curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* adaptada a altas concentraciones de cobre. El crecimiento se realizó en presencia de  $Fe^{+2}$  como fuente de energía y a distintas concentraciones de cobre. Se partió con un inóculo de  $2 \times 10^7$  (células/ml) y el conteo celular se realizó cada 24 h. Los valores se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas y las barras de error muestran la desviación estándar.

## 4. DISCUSIÓN

A través de un estudio proteómico y transcriptómico se identificaron varias proteínas que cambian sus niveles de expresión cuando *A. ferrooxidans* ATCC 53993 crece en ión ferroso y en presencia de 40 mM de cobre. Estas proteínas presentan una extensa diversidad de funciones, sugiriendo que este microorganismo utilizaría una amplia variedad de estrategias para mantener la homeostasis del cobre y prevenir el daño celular que éste provoca. Además, estas proteínas podrían ser una clara y óptima adaptación del microorganismo a su metabolismo y medio ambiente.

Dada la diversidad de las proteínas que presentan una expresión diferencial en presencia de cobre, la descripción y análisis de los resultados se han organizado de acuerdo a las diferentes categorías funcionales en las cuales fueron agrupadas.

### 4.1 Metabolismo y transporte de iones inorgánicos.

#### 4.1.1 Aumento de la síntesis de sistemas de eflujo del tipo RND.

*A. ferrooxidans* crece en ambientes altamente ácidos, típicamente a un pH externo inferior a 3, y es capaz de crecer en ión ferroso y en una variedad de compuestos reducidos de azufre como fuentes de energía. Probablemente las adaptaciones metabólicas y fenotípicas de este microorganismo se han originado y evolucionado en estas condiciones. Por esta razón, los mecanismos de resistencia a metales de esta bacteria podrían tener una estrecha relación a las condiciones de pH y metabolismo

energético que utiliza, con el objetivo de optimizar y aprovechar las condiciones en las cuales se desarrolla.

Teniendo en cuenta que *A. ferrooxidans* sobrevive a un pH externo ácido y su pH citoplasmático es típicamente hasta 5 unidades por sobre el pH externo, el gradiente que se genera de pH a través de la membrana citoplasmática es muy elevado. Esto contribuye en gran medida a la fuerza protón motriz (FPM) que comprende el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) y la diferencia de pH transmembrana ( $\Delta\text{pH}$ ). Esta FPM generalmente está relacionada con el metabolismo energético y con la generación de ATP (Ferguson y Ingledew., 2008). Además, muchas proteínas de membrana que actúan como transportadores secundarios activos también obtienen la energía necesaria para la eliminación del sustrato directamente a partir del gradiente de protones. Dentro de estas proteínas encontramos a las bombas de eflujo clasificadas en la familia de transportadores de tipo RND, que como se ha comentado anteriormente, están involucradas en el transporte de metales (Pidcock., 2006). Este tipo de transportador, que se ha relacionado con la resistencia a cobre en *Escherichia coli*, corresponde al ya mencionado translocador de cobre CusCFBA (Magnani y Solioz., 2007). Teniendo en cuenta que este sistema es un antiporter que utiliza el gradiente de protones para el eflujo de cobre, el gran  $\Delta\text{pH}$  en *A. ferrooxidans* hace pensar que este transporte podría ser el más eficiente y favorecido energéticamente y, por lo tanto, utilizado preferentemente en este microorganismo como mecanismo de detoxificación en presencia de una sustancia tóxica. Sin embargo, un punto importante en este contexto es la potencial acidificación del citoplasma que se puede producir con una actividad excesiva de este tipo de transportador. Esta mayor acidificación puede ser disminuida por el metabolismo

energético de la bacteria (oxidación de ión ferroso con oxígeno molecular como aceptor de electrones que consume protones) (Figura 16). Sin embargo, si esta compensación no logra disminuir el exceso de protones que ingresan al citoplasma, se produciría una disminución más rápida de la fuerza protón motriz y por lo tanto podría afectar, entre otros procesos, la generación de ATP (vía ATPasa), la generación de poder reductor, la capacidad de destoxificación y probablemente tener alguna consecuencia en el crecimiento bacteriano.

Nuestros resultados mediante proteómica cuantitativa ICPL demostraron que tres sistemas de eflujo de tipo RND se sobreexpresaron fuertemente (dentro de las 10 proteínas que más aumentaron de las 523 identificadas) cuando *A. ferrooxidans* ATCC 53993 se adapta a crecer en 40 mM de cobre. Adicionalmente, a través de experimentos de qRT-PCR, se detectó un incremento a nivel transcripcional de estos sistemas proporcional a la concentración de cobre (Figuras 7 y 8).

En nuestro laboratorio se ha demostrado que estos sistemas confieren una mayor resistencia a cobre en cepas de *E. coli* que expresan estos sistemas de *A. ferrooxidans*, lo que sugiere que los componentes son funcionales y podrían ser parte de importantes sistemas de resistencia al cobre en esta bacteria (Navarro y col., 2009; Orellana y Jerez., 2011).

Dentro de los tres sistemas de tipo RND que se vieron fuertemente sobreexpresados, uno es parte de la isla genómica exclusiva de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Este sistema aumentó casi 5 veces su expresión proteica en 40 mM de cobre y más de 60 veces su nivel transcripcional a 300 mM del mismo metal. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta en nuestro laboratorio, la cual propone que la expresión de genes

adicionales relacionados con la resistencia a cobre presentes en esta isla genómica le otorgan a esta cepa una mayor resistencia al metal (Orellana., 2011) comparada con la cepa ATCC 23270, carente de este elemento genético.

En relación a la posible acidificación del citoplasma por estos sistemas, nuestros resultados mostraron un incremento del pH del medio extracelular a medida que se aumentaba la concentración de cobre (Figura 12). Este incremento de pH podría estar relacionado, como se mencionó anteriormente, con la actividad excesiva de estos transportadores (eflujo de cobre e ingreso de protones a la célula), los cuales acidifican el citoplasma y eventualmente podrían superar la capacidad de mantener el pH citoplasmático cercano a la neutralidad. Esta acidificación podría deteriorar tanto proteínas como DNA y provocar una disminución en la FPM importante para el metabolismo energético de este microorganismo (Baker-Austin y Dopson., 2007), lo que puede tener una relación directa con el crecimiento que presenta *A. ferrooxidans* 53993 a concentraciones mayores de cobre (Figura 13).

Por otra parte, no se vieron cambios a nivel proteómico de otras proteínas que se han relacionado con la resistencia a cobre en *A. ferrooxidans*, cómo son las ATPasas de cobre. Este comportamiento se puede deber a que el mecanismo llevado a cabo por las bombas del tipo RND son de menor costo energético comparado con el mecanismo de eflujo de cobre llevado a cabo por otros transportadores, que utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP.

#### 4.1.2 Aumento de proteínas relacionadas con la captación de hierro

El hierro es un factor de crecimiento esencial para prácticamente todas las bacterias, puesto que forma parte de algunas proteínas como las catalasas, peroxidasas, oxidasas y citocromos. Participa también en la síntesis de pirimidinas, aminoácidos, en el ciclo de los ácidos carboxílicos y en la cadena transportadora de electrones. Además, es un cofactor importante por su potencial redox (Braun y Killmann., 1999; Ratledge y Dover., 2000). Debido a la importancia de este elemento, los microorganismos han desarrollado sistemas especializados para la captación de hierro. Uno de estos mecanismos implica la síntesis y liberación de moléculas de bajo peso molecular, llamadas sideróforos, con una alta afinidad por hierro ( $Fe^{+3}$ ). Una vez que estos sideróforos captan el hierro, son reconocidos por unos transportadores de la membrana bacteriana (llamados transportadores dependientes de TonB), y en la mayoría de los casos, penetran al interior de la célula donde liberan la molécula de hierro. Estos transportadores muestran alta afinidad y especificidad por los sideróforos y utilizan la energía derivada de la fuerza protón motriz a través de la membrana interna para el transporte de ellos (Noinaj y col., 2010). Para la transducción de esta fuente de energía, los transportadores deben interactuar con un complejo de proteínas de membrana interna que consiste en TonB, ExbB, y ExbD, las cuales transfieren la energía desde la membrana interna hasta el receptor ubicado en la membrana externa (Postle., 2007).

Debido a que una concentración alta de hierro puede ser tóxica, es importante contar con un mecanismo que mantengan los niveles de hierro en concentraciones normales. En relación a esto, se ha descrito en *E. coli* la proteína Fur (Ferric Uptake Regulator), un represor transcripcional que reconoce una secuencia de DNA, conocida como caja Fur,

presente en la región operadora de los genes que pertenecen a la captación de hierro y se une a ella bloqueando la transcripción de dichos genes. Este reconocimiento tiene lugar cuando la proteína Fur forma un complejo con  $Fe^{+2}$ , por lo cual las transcripciones de estos genes se bloquean. Por otro lado, cuando el hierro es escaso, la proteína Fur no está unida al DNA y esto lleva a la expresión de los genes relacionados con el transporte de hierro y metabolismo (Nicholas y col., 2010). Se ha demostrado la existencia de una proteína Fur (Lferr\_0458) en *A. ferrooxidans* que efectivamente regula genes relacionados con la captación del hierro en esta bacteria (Quatrini y col., 2005)

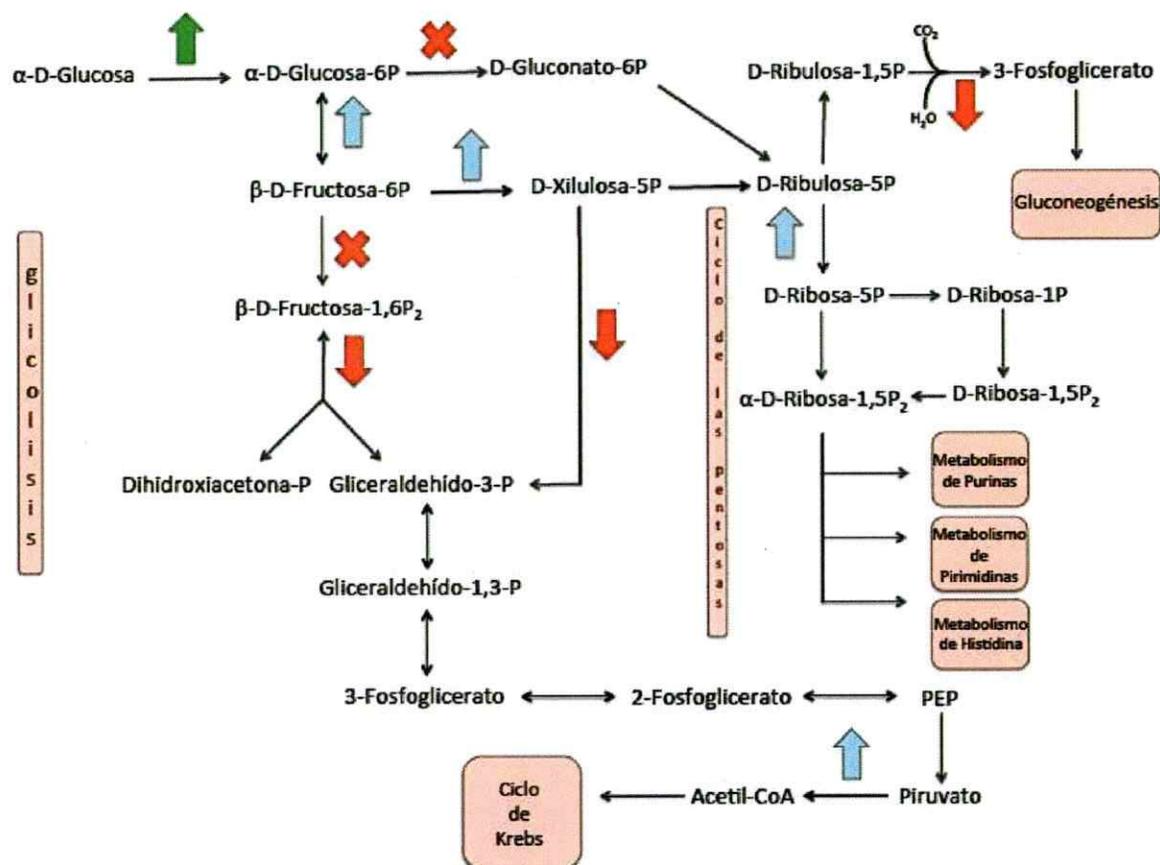
De acuerdo a estos antecedentes, nuestros resultados en la proteómica cuantitativa muestran un receptor dependiente de TonB (Tabla 2) que se sobreexpresa en presencia de cobre. El aumento de este receptor podría deberse a un déficit de hierro en el citoplasma por un mayor requerimiento del metal. Este requerimiento podría estar dado por el aumento de proteínas que necesiten para su maduración la inserción de grupos prostéticos que contienen hierro. Este es el caso de dos citocromos C (Cyc1 y Cyc2) y dos subunidades de la citocromo oxidasa aa3 (CoxA y CoxB) que tienen como grupo prostético el grupo hemo, el cual presenta en su centro átomos de  $Fe^{+2}$ . Estas tres proteínas se vieron sobreexpresadas en la proteómica cuantitativa ICPL juntos a dos proteínas (ResB y ResC) que están involucradas en la inserción del grupo hemo (Tabla 2) en los citocromos C (Ahuja y col., 2009). Teniendo en cuenta que los citocromos son parte fundamental del metabolismo energético de *A. ferrooxidans*, la sobreexpresión de estos y otros componentes del metabolismo podrían relacionarse con un mayor requerimiento de energía para manejar el estrés celular que causa el cobre. Además; la

sobreexpresión de estas proteínas que tiene como cofactor una molécula de porfirina, podría jugar un rol importante en la homeostasis del hierro (Andrews y col., 2003).

#### **4.2 Metabolismo y transporte de carbohidratos y aminoácidos**

Relacionado con el transporte de carbohidratos y metabolismo, encontramos niveles elevados de una posible hexoquinasa (Tabla 2) en células crecidas en hierro y en presencia de cobre. Esta enzima cataliza la reacción que forma glucosa-6-fosfato a partir de glucosa. La fosforilación de este azúcar (activación) permite la entrada de esta molécula a dos vías metabólicas importantes, tal como lo son la vía glicolítica y de las pentosas fosfato.

En nuestros datos proteómicos no se identificó la fosfofructoquinasa-1, la cual cataliza la formación de fructosa-1,6-bifosfato a partir de fructosa-6-fosfato, además se observó la disminución de una fructosa-bifosfato-aldolasa (Tabla 2A) que genera dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato a partir de fructosa-1,6-bifosfato. Esto nos sugiere que la vía glicolítica estaría desfavorecida en presencia de cobre (Figura 14). Por otra parte, se observó el aumento de enzimas que catalizan la conversión de fructosa-6-fosfato en intermediarios que son parte de la vía de las pentosas fosfato, sin embargo estos aumentos no son significativos (Figura 14). Además, la disminución de una transquetolasa, enzima que conecta la vía de las pentosas con la vía glicolítica, y de la ribulosa difosfato carboxilasa, que participa en el paso de ribulosa-1,5-fosfato a glicerato-3-fosfato, sugiere que la vía de las pentosa fosfato se ve más favorecida sobre la vía glicolítica en presencia de cobre (Figura 14).



**Figura 14. Esquema de las vías glicolítica, pentosa fosfato y fijación de carbono en *A. ferrooxidans*.** Las flechas verdes y rojas indican las enzimas que aumentaron y disminuyeron significativamente sus niveles en presencia de cobre respectivamente. Las cruces muestran las enzimas que no se identificaron en los resultados proteómicos.

Nota: Las flechas azules señalan las enzimas que se identificaron y aumentaron en presencia de cobre pero que no se encuentran dentro de las proteínas que aumentan significativamente. Por lo que tienen solo un valor informativo en las diferentes rutas metabólicas.

#### 4.2.1 Aumento en la síntesis de glutamato en presencia de cobre

Respecto al metabolismo de aminoácidos observamos el aumento de los niveles de la glutamato sintasa, enzima que cataliza la reacción de síntesis de glutamato a partir de glutamina y 2-oxoglutarato. El aumento en la biosíntesis de glutamato podría tener diferentes destinos. Por un lado el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato y el

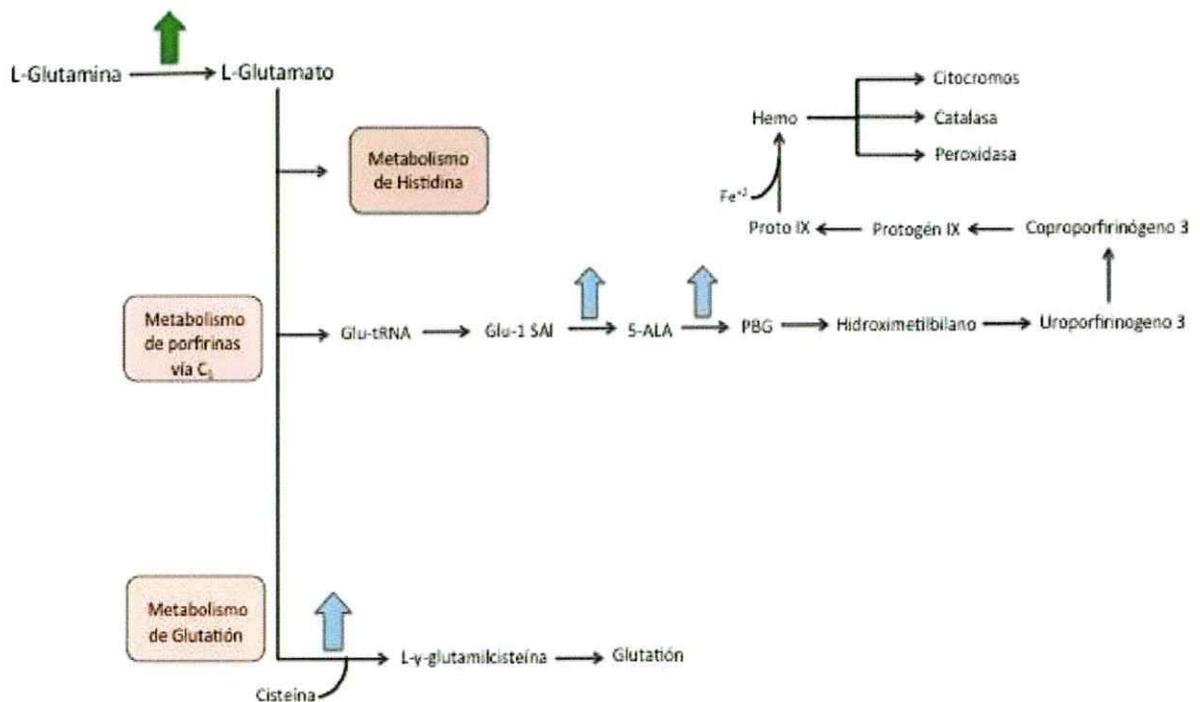
grupo amino de la cisteína forman  $\gamma$ -glutamilcisteína por la glutamato cisteína ligasa, que finalmente forma glutatión por la glutatión sintetasa (Figura 15). El glutatión es un antioxidante que se encuentra tanto en eucariotas como procariotas y protege a la célula de especies reactivas de oxígeno (ROS), como los radicales libres y el peróxido, cuando su ambiente reductor está desequilibrado. Un aumento en los niveles de glutatión podría relacionarse directamente al estrés oxidativo que ocurre en la célula a causa del cobre (Orell y col., 2010). Nuestros resultados proteómicos muestran un pequeño aumento de alguna de estas enzimas mencionadas anteriormente que están involucradas en la formación de glutatión a partir de glutamato (Figura 15). Sin embargo, este aumento no es significativo ni cercano al aumento reportado para la cepa ATCC 23270 en las mismas condiciones (Almárcegui y col., 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes podríamos especular que las condiciones de estrés oxidativo en esta cepa son menores y, por lo tanto, la vía de formación de glutatión no se ve tan favorecida.

Por otra parte, el glutamato puede ir a la formación del Glu-tRNA formado por la Glu-tRNA sintetasa (GluRS). Este Glu-tRNA es un sustrato que se utiliza para la biosíntesis de proteínas y la formación de tetrapirroles por la vía C<sub>5</sub> (Figura 15). En esta ruta, Glu-tRNA se transforma en ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), el precursor universal de tetrapirroles (presentes en el grupo hemo) por la acción de la Glu-tRNA reductasa (GluTR) y por la glutamato semialdehído aminotransferasa (GSAM). Nuestros resultados proteómicos muestran un aumento (no significativo) de estas enzimas, las cuales podrían estar relacionadas directamente con el contenido de hemo celular. Se ha determinado que *A. ferrooxidans* produce un número extremadamente alto de los componentes de la cadena respiratoria por célula (Levicán y col., 2007). El nivel de

estos componentes de la cadena respiratoria, incluyendo los citocromos y, por tanto de hemo, depende en gran medida de las condiciones de crecimiento y Glu-tRNA (Katz y col., 2010). Teniendo en cuenta que nuestros resultados proteómicos muestran un aumento significativo de estos componentes (citocromos), podemos sugerir que esta vía se ve favorecida en presencia de cobre y por lo tanto se podría relacionar con el mayor requerimiento respiratorio.

Es importante mencionar que el aumento en los niveles de hemo a partir de Glu-tRNA podría afectar la biodisponibilidad de este sustrato para la síntesis de proteínas. Sin embargo, la presencia en *A. ferrooxidans* de dos GluRS podría ser una estrategia evolutiva para garantizar el requerimiento adecuado de sustrato hacia la vía C<sub>5</sub> sin afectar la biosíntesis de proteínas.

Finalmente, otra posible función que podría tener el aumento de glutamato es la capacidad de actuar como un amortiguador de pH en el citoplasma. De hecho la descarboxilación de glutamato y arginina en *E. coli* está implicada en la regulación de pH (buffer celular) por los protones que consumen en el proceso que luego son transportados fuera de la célula (Castanie-Cornet y col., 1999).



**Figura 15. Esquema de las vías C<sub>5</sub> (porfirinas) y metabolismo de glutatión en *A. ferrooxidans*.** Las flechas verdes indican las enzimas que aumentaron significativamente sus niveles en presencia de cobre. Nota: Las flechas azules señalan las enzimas que se identificaron y aumentaron en presencia de cobre pero que no se encuentran dentro de las proteínas que aumentan significativamente. Por lo que tienen solo un valor informativo en las diferentes rutas metabólicas.

### 4.3 Producción y conversión de energía

#### 4.3.1 Cambios en los niveles de proteínas que participan en la oxidación de hierro

El  $\text{Fe}^{+2}$  puede ser oxidado fácilmente a  $\text{Fe}^{+3}$  bajo ciertas condiciones y de esta manera puede servir como dador de electrones. Sin embargo, la pareja  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  tiene un potencial redox muy electropositivo (+770 mV a pH 2). Debido a esto, los electrones provenientes de la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  por *A. ferrooxidans* pueden tener dos rutas diferentes que pueden o no acoplarse favorablemente con este potencial (Quatrini y col., 2009). En la primera ruta, conocida como ruta “Energéticamente favorable” (downhill),

están involucradas proteínas codificadas por el operón *rus* (Figura 10), el cual contiene genes que codifican para un citocromo c de membrana externa (*cyc2*), una proteína de función desconocida (*Lferr\_2749*), una proteína de cobre azul periplasmática, llamada rusticianina (*rus*), un citocromo del tipo  $c_4$  periplasmático (*cyc1*) y un citocromo oxidasa del tipo  $aa_3$  (*coxBACD*) (Yarzabal y col., 2004). La segunda ruta, conocida también como ruta “Energéticamente desfavorable”, incluye un complejo citocromo  $bc_1$  (complejo III, ubiquinol-citocromo c reductasa), un pool de quinonas y un complejo NADH deshidrogenasa I. Los genes que codifican al complejo  $bc_1$  han demostrado ser parte de un operón, denominado operón *petI*, que codifica para un citocromo  $c_4$  (*cycA1*), una deshidrogenasa de cadena corta (*sdrA1*) de función desconocida, un citocromo b (*petA1*), una proteína de Rieske de hierro-azufre (*petB1*) y un citocromo c1 (*petC1*). Adyacente al operón *petI*, existen tres genes (*resBC* y un gen hipotético), que como se ha comentado anteriormente, serían chaperonas implicadas en la inserción de los grupos hemos en los citocromos c y por lo tanto importantes para su maduración (Ahuja y col., 2009).

Se ha propuesto que *Cyc2*, ubicada en la membrana externa, acepta los electrones directamente del Fe (II), por lo que llevaría a cabo el primer paso en la oxidación del hierro (Yarzabal y col., 2002). En el modelo propuesto de la oxidación de hierro, se estableció que los electrones provenientes de la oxidación de Fe (II) por *Cyc2* se dirigen hacia la rusticianina. En este punto, parte de los electrones pueden dirigirse hacia la ruta “favorable” a través de *Cyc1* hacia la citocromo oxidasa  $aa_3$  que finalmente reducen oxígeno a agua, o hacia la ruta “desfavorable”, donde *CycA1* recibe los electrones de la



rusticianina y se los cede al complejo  $bc_1$  y ubiquinonas que se los entrega finalmente a la NADH deshidrogenasa I para generar poder reductor (Valdés y col., 2008) (Figura 16).

Nuestros resultados proteómicos muestran un aumento significativo de casi todas las proteínas codificadas por el operón *rus* (Tabla 2), que como comentamos anteriormente, estaría involucrado en la reducción de oxígeno a agua consumiendo protones en el proceso. Teniendo en cuenta que esta vía tiene como una de sus funciones neutralizar los protones que ingresan por la ATP sintetasa, una sobreexpresión de esta vía podría ayudar a contrarrestar la entrada extra de protones por los sistemas de eflujo del tipo RND y de esta forma controlar la acidificación citoplasmática. Por otra parte, encontramos que a 300 mM de cobre existe una disminución en la expresión génica del operón *rus* (Figura 10) y un aumento considerable de la expresión génica de los sistemas RND (Figura 7 y 8). Siguiendo con la misma lógica, un aumento en la entrada de protones por los sistemas RND y una disminución del operón *rus* provocaría una mayor acidificación citoplasmática, la cual podría estar relacionada con el menor crecimiento de este microorganismo (Figura 13). Apoyando esta idea, encontramos que efectivamente en 300 mM de cobre existe una mayor cantidad de Fe (II) en el medio extracelular en comparación a células crecidas sin cobre o en presencia de 40 mM del metal (Figura A1). Esto nos indica que la oxidación de hierro es menor a 300 mM de cobre, sugiriendo que en esta condición la “respiración” podría verse afectada. Por otra parte, se ha propuesto en nuestro laboratorio que la rusticianina además de tener un papel energético podría representar un importante determinante de resistencia a cobre, tanto por sus altos niveles de expresión en células de *A. ferrooxidans* crecidas en

distintos sustratos energéticos en presencia de cobre, como por su capacidad de unir cobre en el espacio periplasmático (Navarro., 2009). En relación a estos antecedentes, una sobreexpresión del operón *rzs* podría tener un doble papel en la resistencia a cobre; por un lado estaría ayudando a contrarrestar la posible acidificación del citoplasma debido a la actividad excesiva de los transportadores RND y, por otro lado, proteínas codificadas en él estarían capturando el cobre reduciendo así su toxicidad (Figura 16).

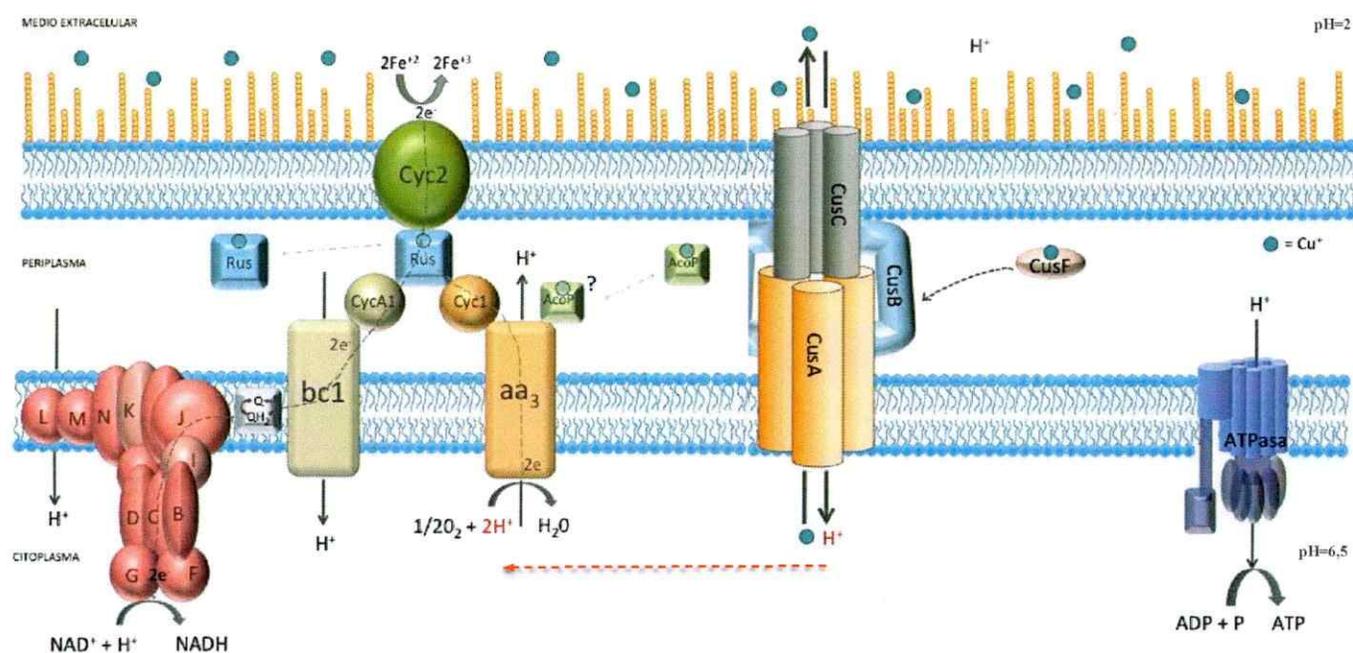


Figura 16. Sistema de eflujo RND y modelo de oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  en *A. ferrooxidans*. Se muestra en rojo la entrada de protones por los sistemas RND y la probable neutralización de estos protones por la vía favorable del modelo de oxidación del hierro. Tal como se puede observar en este modelo, los electrones provenientes de la oxidación de hierro se dirigen hacia la rusticianina (Rus). En este punto, los electrones pueden dirigirse a las dos diferentes rutas (ruta desfavorable en crema y ruta

#### 4.4 Procesos celulares y señalización

##### 4.4.1 Mecanismos de transducción de señales

La iniciación de la transcripción es un paso crítico para la regulación de la expresión génica y es controlado por un amplio número de factores transcripcionales. El factor sigma 54 alternativo ( $\sigma_{54}$ ) juega una función crucial en la activación de la respuesta frente a un gran número de señales externas. Para ello,  $\sigma_{54}$  se une reversiblemente a la RNA polimerasa y permite el reconocimiento de elementos específicos del promotor del gen que va ser transcrito (Hechard y col., 2001). De acuerdo a las características de este factor, se ha determinado que la expresión génica dependiente de  $\sigma_{54}$  corresponde a respuestas rápidas y específicas a los cambios ambientales (Kazmierczak y col., 2005). Además, cumple una importante función en la virulencia de varias bacterias siendo requerido para la biosíntesis flagelar, adherencia y formación de biopelículas (Wolfe y col., 2004; Zhao y col., 2010). Por otra parte, se ha descrito que el factor  $\sigma_{32}$  y  $\sigma_{54}$  regulan la expresión de la chaperona molecular HtpG de *E. coli* en condiciones de stress térmico (Heitzer y col., 1992), ácido (Heyde y Portalier., 1990) y en carencia de nitrógeno (Kabir y col., 2004).

De acuerdo a los antecedentes mencionados previamente, el aumento proteómico del regulador transcripcional de la familia Fis (Lferr\_2568), que luego de su activación permite un cambio conformacional en  $\sigma_{54}$  para iniciar la transcripción (Vidangos y cols., 2014), podría estar relacionado con aumento en la expresión de genes regulados por  $\sigma_{54}$  que ayuden a reparar el daño o stress que genera la presencia de cobre. En este contexto, el aumento de la chaperona molecular HtpG en presencia de cobre en nuestros

resultados nos sugiere que esta proteína podría estar regulada frente a la exposición a cobre por este factor, pudiendo ayudar al correcto plegamiento y estabilización de proteínas frente al daño por la exposición al metal.

#### **4.4.2 Biosíntesis de envoltura / membrana / pared celular**

##### **Aumento de la síntesis de peptidoglicano**

En la pared celular de las bacterias hay una capa rígida responsable de la resistencia de ésta. En las bacterias Gram-negativas esta capa rígida se localiza dentro del periplasma entre la membrana interna y externa. Esta estructura rígida se denomina capa de peptidoglicano o mureína y está compuesta por dos derivados de azúcares, la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico que están unidos por enlaces  $\beta$ 1-4, y un pequeño grupo de aminoácidos.

La biosíntesis de peptidoglicano es un proceso complejo que involucra alrededor de 20 reacciones que tienen lugar en el citoplasma y en el lado interior y exterior (reacciones de polimerización) de la membrana citoplasmática. Las enzimas que participan en la biosíntesis de la N-acetilglucosamina son las denominadas proteínas Gln y las que participan en la síntesis de N-acetilmurámico se denominan proteínas Mur (Vollmer y col., 2010). Además, existen otras proteínas como las glicosiltransferasas, que participan en la polimerización del peptidoglicano.

Se ha documentado que el peptidoglicano y otras proteínas de superficie pueden secuestrar metales para prevenir sus efectos tóxicos. Esto ocurre principalmente cuando las bacterias están formando una biopelícula (Harrison y col., 2007).

Nuestros resultados proteómicos muestran una sobreexpresión (no significativo) de MurA y una peptidoglicano glicotransferasa, implicadas en la biosíntesis del peptidoglicano. A pesar de que este aumento no es estadísticamente significativo, si lo es en la cepa 23270. Teniendo en cuenta este antecedente, es probable que en la cepa 53993 exista otra barrera física que impida el ingreso del metal tal como el lipopolisacárido.

### **Aumento de la síntesis del lipopolisacárido**

Además del peptidoglicano las bacterias Gram-negativas poseen en su pared una capa adicional que está compuesta del lipopolisacárido. De hecho, esta capa representa una segunda capa lipídica que no consta solo de fosfolípidos, sino que también de polisacáridos y proteínas.

La estructura del lipopolisacárido consta de un núcleo, el polisacárido O y el lípido A. En general el núcleo del lipopolisacárido está compuesto por cetodesoxioctonato (KDO), heptosas, glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina. El polisacárido O está unido al núcleo y consta generalmente de azúcares de seis carbonos así como una o más dideoxiazúcares poco frecuentes. La parte lipídica del lipopolisacárido, el lípido A, no es un lípido de glicerol, si no que los ácidos grasos se unen por una unión amino éster a un disacárido compuesto por N-acetilglucosamina-fosfato. Se ha reportado que el lipopolisacárido de *A. ferrooxidans* presenta una estructura típica de las bacterias Gram-negativas. De hecho contiene KDO, heptosas, glucosa, N-acetilglucosamina y ácidos grasos usuales de las bacterias Gram-negativas (Hirt y Vestal., 1975).

Si bien la capacidad de unión a metal de organismos Gram-positivos es generado en gran parte por la capa de peptidoglicano (Doyle y col., 1980), es poco probable que la

misma capa proporcione la misma capacidad de unión en un organismo Gram-negativo, ya que el peptidoglicano de bacterias Gram-negativas es mucho más delgado que el peptidoglicano de las bacterias Gram-positivas. De acuerdo a esto y teniendo en consideración que el lipopolisacárido es una estructura altamente aniónica capaz de unir cationes metálicos por fuerzas electrostáticas sin consumo de energía celular (Rodríguez y Quesada., 2006), se ha propuesto al lipopolisacárido como el principal sitio de unión a metal en las bacterias Gram-negativas (Langley y Beveridge., 1999)

Nuestros resultados proteómicos muestran dos proteínas implicadas en la síntesis de lipopolisacárido que aumentaron en presencia de cobre. Una de estas proteínas, denominada proteína RfaE bifuncional, está implicada en la síntesis de D-glicero-D-mano-heptosa 1-fosfato, y en la transferencia de ADP para formar ADP-D-glicero-D-mano-heptosa precursor del núcleo interno del lipopolisacárido (Valvano y col., 2000).

Otra proteína sobreexpresada (no significativamente), anotada como proteína de biosíntesis del lipopolisacárido (Lferr\_2574), presenta un dominio Wzz. Se ha demostrado que esta proteína está implicada en la polimerización del antígeno-O y por lo tanto determina el largo de éste (Franco y col., 1998). Resulta interesante el contexto genético de esta proteína ya que aledaño a este gen existen varios genes que codifican para proteínas que están relacionadas con la síntesis y exportación de polisacárido, que también fueron identificadas en la proteómica. De acuerdo a estos antecedentes y resultados, el aumento de estas proteínas en presencia de cobre podrían ayudar a aumentar la primera barrera de protección de *A. ferrooxidans* frente al metal.



#### 4.4.3 Modificación postranduccional, recambio de proteínas y chaperonas

##### Chaperonas periplasmáticas CusF

Como se comentó anteriormente, CusF es una proteína periplasmática que forma parte del sistema CusCFBA. Esta proteína posee un dominio compuesto de 5 hebras en barril beta en un pliegue OB, el cual fue caracterizado por primera vez en la chaperona CusF de *E. coli*. Se ha descrito en la literatura que el sitio de unión a cobre de esta proteína está conformado por 3 aminoácidos muy conservados: H36, M47 y M49 (Loftin y col., 2005). Tal como se comentó anteriormente, se ha determinado que CusF mediaría la transferencia de cobre al complejo de eflujo CusCBA facilitando la destoxicación del periplasma (Rensing y Grass., 2002; Franke y col., 2003; Arguello y col., 2013). Además, se ha reportado recientemente que el cobre es llevado al espacio periplasmático por la ATPasa de membrana interna CopA la cual le entregaría el cobre a CusF mediante una transferencia directa entre ambas proteínas (Padilla-Benavides y col., 2014).

Se ha determinado que *A. ferrooxidans* 53993 presenta cuatro chaperonas de cobre CusF, dos codificadas en el genoma de esta bacteria (CusF1 y CusF2) y que se encuentran también en la cepa ATCC 23270 (Navarro y col., 2009), y otras dos presentes exclusivamente en la isla de la cepa ATCC 53993 (CusF3 y CusF4). Cabe señalar que la organización génica de algunas de estas chaperonas difiere de la observada en *E. coli*, donde los cuatro genes del sistema CusCFBA serían parte de un operón (Franke y col., 2003).

Se ha demostrado que las CusF y el sistema Cus del genoma e isla genómica de *A. ferrooxidans* son funcionales y por lo tanto serían componentes relevantes en la detoxificación del metal (Navarro y col., 2009; Orellana y Jerez., 2011).

Nuestros resultados proteómicos nos indican una fuerte sobreexpresión de las chaperonas CusF3 y CusF2. Si analizamos la Tabla 2, podemos observar que ambas chaperonas se encuentran dentro de las 3 proteínas que más se sobreexpresan en presencia de 40 mM de cobre (más de 6 veces). Además, los resultados transcriptómicos indican que a concentraciones mayores de cobre la expresión transcripcional de estas chaperonas aumenta más de 20 veces. Estos resultados sugieren una importante participación de estas proteínas en la resistencia a cobre. Asimismo, la expresión de la chaperona de cobre CusF3 exclusiva de la isla genómica de la cepa ATCC 53993 podría estar relacionada con la mayor resistencia de cobre de esta cepa, apoyando la hipótesis de nuestro laboratorio, la cual propone que esta isla genómica le otorgaría una mayor resistencia al metal (Orellana y Jerez., 2011).

#### **Aumento de la Chaperona HtpG**

Las proteínas de choque térmico (HSPs) son un grupo importante de chaperonas moleculares que pertenecen a una familia de proteínas cuyos miembros pueden establecer complejos de transición con varias proteínas. La familia de chaperonas Hsp90 (HtpG en *E. coli*) constituye hasta el 1-2% del total de las proteínas citosólicas en células eucariontes y su abundancia puede aumentar aproximadamente dos veces bajo condiciones de estrés (Whitesell y Lindquist, 2005). Estas chaperonas son proteínas diméricas que presentan tres dominios importantes (dominio N-terminal de unión a

ATP, una región media y un dominio C-terminal implicado en la dimerización). En eucariontes la Hsp90 se caracterizan por la interacción específica en etapas tardías del plegado de un conjunto de proteínas que participan en vías de regulación o de señalización, tales como factores de transcripción y proteínas quinasas (Buchner., 1999). Las chaperonas Hsp90 también están involucradas en la reactivación de proteínas desnaturalizadas o inactivadas en condiciones de estrés ambiental (Nathan y col., 1997), por lo que el término proteínas de choque térmico es de alguna manera bastante acotada, ya que se refiere sólo a una de las condiciones bajo las cuales esta proteína podría ser inducida. Tal como se comentó anteriormente, la función esencial de las proteínas Hsp90 es evitar interacciones inapropiadas dentro y entre las proteínas celulares y restaurar la estructura nativa en proteínas dañadas por el estrés. Sin embargo, si estas medidas fallan, las chaperonas Hsp90 también pueden facilitar la degradación de las proteínas mal plegadas por la vía ubiquitina-proteasoma (McClellan y col., 2005). Por lo tanto, también pueden participar como proteínas de control de calidad. Además se ha determinado que la que Hsp90 se sobre expresa transcripcionalmente en condiciones de estrés oxidativo y cumple un papel importante en la adaptación a condiciones ambientales donde se generan especies reactivas de oxígeno en cianobacterias (Hossain y Nakamoto., 2003).

De acuerdo a estos antecedentes y nuestros resultados proteómicos (Tabla 2) y transcriptómicos (Figura 9), el aumento en presencia de cobre de una chaperona perteneciente a la familia Hsp90 (anotada como HtpG) nos sugiere que esta proteína podría estar involucrada en mecanismos de reparación y plegado correcto de proteínas

frente al daño generado por la presencia de cobre en *A. ferrooxidans* 53993 crecida en hierro.

Es importante destacar que esta proteína no se observa aumentada en ausencia de cobre y su niveles transcripcionales aumentan a medida que la concentración del metal es mayor. Estos antecedentes nos sugieren que esta proteína puede tener un papel importante frente al daño que produce el cobre.

#### **4.5 Proteínas no caracterizadas**

##### **4.5.1 Proteínas solo con función general predicha**

###### **Disminución de proteínas relacionadas con el estrés oxidativo**

La familia de antioxidantes alquilhidroperoxidases (AhpC and AhpD) son un grupo altamente conservado de enzimas que pueden reducir hidroperóxidos por medio de NADH o NADPH en presencia de tiorredoxina o de donadores de electrones que contengan tioles (Jeong y col., 2000; Lee y col., 2001). Las especies alquil hidroperóxidos son capaces de iniciar y propagar una reacción en cadena de radicales libres que resulta en el daño del DNA y de membranas. La enzima AhpC puede destruir intermediarios hidroperóxidos tóxicos y reparar el daño en moléculas que fueron peroxidadas, cumpliendo una importante función en la destoxicación derivada del estrés oxidativo (Baillon y col., 1999). Debido a que la expresión de estas enzimas se ha relacionado con el estrés oxidativo, puede ser una medida del estrés que existe en la célula.

Nuestros resultados proteómicos muestran una fuerte disminución (Tabla 2A) de una alquilhidroperoxidasa (AhpD) que se ha determinado que actúa como una tiorredoxina para reducir los residuos de cisteína de la AhpC y completar su ciclo catalítico (Bryk y col., 2002). Teniendo en cuenta que se identificaron muy pocas enzimas relacionadas con el estrés oxidativo, podríamos especular que el ambiente de estrés oxidativo de la cepa ATCC 53993 es menor al de la cepa ATCC 23270 en donde se observaron varias proteínas relacionadas con el estrés oxidativo, incluyendo proteínas de la familia AhpC, sobreexpresadas en las mismas condiciones (Almárcegui y col., 2014).

#### **4.5.2 Proteínas con función desconocida**

##### **Aumento de una proteína de unión a cobre de función desconocida**

Las proteínas de unión a cobre han demostrado ser relevantes en procesos biológicos elementales, como la respiración, la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Rydén y Hunt., 1993). Algunas de estas proteínas de unión de cobre presentan un pliegue común, llamado pliegue cupredoxina. Este pliegue, como se comentó anteriormente, se compone de un dominio  $\beta$ -sándwich compuesto de siete a ocho hebras- $\beta$  paralelas y antiparalelas. El papel fisiológico conocido para la mayoría de las proteínas de unión de cobre con un pliegue cupredoxina es mediar la transferencia de electrones y catalizar reacciones redox. Sin embargo, a otras cupredoxinas se les ha asignado otra posible funcionalidad. Este es el caso de CopC de *P. syringae*, que participa en la captación de cobre con el objetivo de mantener la homeostasis del metal (Arnesano y col., 2002) y de CupA de *Streptococcus pneumoniae*, que tiene como función principal quelar el  $\text{Cu}^+$  apenas entra

al citoplasma, un requisito indispensable para la resistencia a cobre de esta bacteria (Fu y col., 2013).

El sitio de unión a cobre de las cupredoxinas ha sido bien caracterizado y se ha determinado tanto su geometría como los aminoácidos que participan en la unión a cobre.

Dentro de los resultados de la proteómica cuantitativa, se vio sobreexpresada una proteína de función desconocida que es parte del operón *rus* (Figura 10A). Un alineamiento de secuencias utilizando como secuencia problema (query) esta proteína, nos reveló la presencia de un dominio cupredoxina y un alto grado de homología con Multi-oxidasas de cobre (Tabla 3). Un alineamiento de secuencias múltiples contra cupredoxinas ya conocidas nos permitió ver que esta proteína conserva los mismos aminoácidos del sitio de unión a cobre descritos para estas proteínas, del tipo HXCX<sub>4</sub>₈HX<sub>4</sub>M (Figura 11). Además, nuestros análisis bioinformáticos nos predijeron que se trata de una proteína periplasmática, tal como se había reportado anteriormente (Chi y col., 2007).

Recientemente se ha caracterizado bioquímica y espectroscópicamente esta proteína (denominada AcoP), revelando que pertenece a la subclase de cupredoxina de color verde. Se determinó que esta proteína une un átomo de cobre. Asimismo, se observó que es muy estable a diferentes pH y temperaturas y además presenta el potencial redox más alto reportado para esta subclase de cupredoxinas (Roger y col., 2014). Por otra parte, la funcionalidad de esta proteína no ha sido del todo revelada, pero se ha demostrado que AcoP interactúa con la citocromo *c* oxidasa y mantiene su óptima actividad a pH fisiológico, por lo que se ha propuesto que puede participar como una chaperona de la

citocromo *c* oxidasa (Castelle y col., 2010). Además, se ha propuesto que AcoP podría estar relacionada con el flujo de electrones entre Cyc2 y Cyc1 actuando como un bypass de la rusticianina (Quatrini y col., 2009). Teniendo en cuenta que la funcionalidad de AcoP no está del todo clara, la posibilidad de tener una función fuera de la que se propone en la ruta de oxidación de hierro no puede ser descartada. En relación a esto, se ha determinado que esta proteína se ve inducida cuando *A. ferrooxidans* se crece en azufre en presencia de cobre (Almárcegui y col., 2014) donde no tendría alguna función propuesta (Figura 16).

Teniendo en cuenta la capacidad de AcoP de unir cobre y su sobreexpresión en presencia del metal en los diferentes sustratos energéticos en los que crece *A. ferrooxidans*, resultaría muy interesante desarrollar posteriores estudios de esta cupredoxina para analizar su potencial relación con la resistencia a cobre, tal como se ha visto en algunos miembros de esta familia de proteínas.

## 5. CONCLUSIONES

- En presencia de cobre los sistemas canónicos de eflujo de cobre CusCFBA de la isla genómica en *A. ferrooxidans* ATCC 53993 aumentaron su expresión. Estos resultados apoyan la hipótesis que propone que la presencia de la isla genómica en esta cepa proporcionaría mayores recursos genéticos para la detoxificación del cobre intracelular.
- El aumento en presencia de cobre del metabolismo de oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  en *A. ferrooxidans* ATCC 53993, ayudaría a controlar la entrada extra de protones provenientes de la alta sobreexpresión de los sistemas de eflujo CusCFBA.
- El aumento en la defensa antioxidante, la reparación de proteínas, las chaperonas de cobre y la síntesis de lipopolisacárido son parte del repertorio de estrategias que utilizaría *A. ferrooxidans* ATCC 53993 para confrontar las altas concentraciones de cobre en su medio ambiente.
- La alta sobreexpresión de AcoP en presencia de cobre, y la capacidad de dicha proteína de unir este metal, sugiere que está podría corresponder a un determinante de resistencia a cobre adicional en *A. ferrooxidans*.

## 6. REFERENCIAS

- Ahuja, U., Kjelgaard, P., Schulz, B. L., Thöny-Meyer, L., Hederstedt, L. (2009). Haem delivery proteins in cytochrome c maturation System II. *Mol. Microbiol.* 73: 1058-1071.
- Aiking, H., Stijnman, A., van Garderen, C., Van Heerikhuizen H., Van 't Riet, J. (1984). Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 374-377
- Almárcegui R. J., Navarro C. A., Paradela A., Albar J. P., von Bernath D. y Jerez CA. (2014). New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: A quantitative proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 13: 946-960.
- Alvarez, S., Jerez, C. A. (2004). Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5177-5182.
- Amaro, A. M., Chamorro D., Seeger M., Arredondo R., Peirano I., Jerez C. A. (1991). Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173: 910-915.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev.* 27: 215-237.
- Arguello, J. M., Eren, E., González-Guerrero, M. (2007). The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals.* 20: 233- 248.
- Arguello, J. M., Raimunda, D., Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3: 73.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Thompsett, A. R. (2002). Solution structure of CopC: a cupredoxin-like protein involved in copper homeostasis. *Structure.* 10: 1337-1347.
- Arnesano, F., Banci, L., Bertini, I., Mangani, S., Thompsett, A. (2003). A redox switch in CopC: an intriguing copper trafficking protein that binds copper(I) and copper(II) at different sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 3814-3819.
- Axelsen, K. B., Palmgren, M. G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84-101.
- Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* 15: 165-171.

- Baillon, M. L., Van Vliet, A. H., Ketley, J. M. (1999). Constantinidou C, Penn CW. An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. J. Bacteriol. 181: 4798-804.
- Bruins, M. R., Kapil, S., Oehme, F. W. (2000). Microbial Resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf. 45: 198-207.
- Braun, V. y Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. TIBS. 24: 104-109.
- Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Nathan, C. (2002). Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. Science. 295: 1073-1077.
- Buchner, J. (1999). Hsp90 and Co. A holding for folding. Trends Biochem. Sci. 24: 136-141.
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., Foster, J. W. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181: 3525-3535.
- Castelle, C., Ilbert, M., Infossi, P., Leroy, G., Giudici-Orticoni, M. T. (2010). An unconventional copper protein required for cytochrome c oxidase respiratory function under extreme acidic conditions. J. Biol. Chem. 285: 21519-21525.
- Cha, J., Cooksey D. A. (1993). Copper hypersensitivity and uptake in *Pseudomonas syringae* containing cloned components of the copper resistance operon. Appl Environ Microbiol. 59: 1671-1674.
- Changela, A., Chen K., Xue, Y., Holschen J., Outten, C., O'Halloran, T. V., Mondragón A. (2003). Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. Science. 301: 1383-1387.
- Chi, A., Valenzuela, L., Beard, S., Mackey, A. J., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Jerez, C. A. (2007). Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis. Mol. Cell. Proteomics. 6: 2239-2251.
- COCHILCO 2010. Biolixiviación: Desarrollo actual y sus expectativas. ([http://www.cochilco.cl/descargas/estudios/tematico/innovacion/estudio\\_biolixiviacion.pdf](http://www.cochilco.cl/descargas/estudios/tematico/innovacion/estudio_biolixiviacion.pdf))
- Espariz, M., Checa, S. K., Audero, M. E, Pontel, L. B, Soncini, F.C. (2007). Dissecting the Salmonella response to copper. Microbiology. 153: 2989-2997.

- Dinh, T., Paulsen, I., T, Saier, M. H. (1994). A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 176: 3825-3831.
- Doyle, R. J., Matthews, T. H., Streips, U. N. (1980). Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *J. Bacteriol.* 143: 471-480.
- Dupont, C. L., Grass, G., Rensing, C. (2011). Copper toxicity and the origin of bacterial resistance new insights and applications. *Metallomics.* 3:1109-1118.
- Ferrer, M., Golyshina, O. V., Beloqui, A., Golyshin, P. N., Timmis, K. N. (2007). The cellular machinery of *Ferroplasma acidiphilum* is iron-protein-dominated. *Nature.* 445: 91-9.
- Ferguson, S. J. y Ingledeu, W.J., (2008). Energetic problems faced by micro-organisms growing or surviving on parsimonious energy sources and at acidic pH: I. *Acidithiobacillus ferrooxidans* as a paradigm. *Biochim. Biophys. Acta.* 1777: 1471.
- Franco, A. V., Liu, D., Reeves, P. R. (1998). The Wzz (Cld) protein in *Escherichia coli*: amino acid sequence variation determines O-antigen chain length specificity. *J. Bacteriol.* 180: 2670-2675.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., Nies, D. (2003). Molecular analysis of the copper transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185: 3804-3812.
- Fu, Y., Tsui, H. C. T., Bruce, K. E., Sham, L. T., Higgins, K. A., Lisher, J. P. Giedroc, D. P. (2013). A new structural paradigm in copper resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Chem. Biol.* 9: 177-183.
- Harrison, J. J, Ceri, H., Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 928-938.
- Heitzer, A., Mason, C. A., Hamer, G. (1992). Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 22:153-69.
- Hechard, Y., Pelletier, C., Cenatiempo., Y, Frere J. (2001). Analysis of sigma (54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EIIMan) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiol.* 147:1575-80.
- Heyde, M., Portalier, R. (1990). Acid shock proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 57: 19-26.
- Hirt, W. E., Vestal, J. R. (1975). Physical and chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* 123: 642-650.

- Hossain, M. M., Nakamoto, H. (2003). Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress. *Curr. Microbiol.* 46: 70-76.
- Jeong, W., Cha, M. K., Kim, I. H. (2000). Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J. Biol. Chem.* 275: 2924-30.
- Jerez, C. A. (2011). Bioremediation and biomining for the industrial recovery of metals. *Comp. Biotech.* 3: 717- 729.
- Jerez, C. A. (2012). The use of extremophilic microorganisms in the industrial Recovery of metals in extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications. 319-334.
- Johnson, D. B. (2013). Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 7768-7776.
- Kabir, M. S., Sagara, T., Oshima, T., Kawagoe, Y., Mori, H., Tsunedomi, R., Yamada, M. (2004). Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 150: 2543-2553.
- Kazmierczak, M. K., Wiedmann, M., Boor, K. J. (2005) Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 527-543.
- Katz, A., Banerjee, R., de Armas, M., Ibba, M., Orellana, O. (2010). Redox status affects the catalytic activity of glutamyl-tRNA synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398: 51-55.
- Keasling, J. D., Hupf, G.A. (1996). Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol* 62:743-746.
- Keasling, J.D. (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 829: 242-249
- Kornberg, A., Rao, N. N., Ault-Riché D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 89-125.
- Langley, S., Beveridge, T. J. (1999). Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 489-498.
- Lee, S. P., Hwang, Y. S., Kim, Y. J., Kwon, K. S., Kim, H. J., Kim, K., Chae, H. Z. (2001). Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J. Biol. Chem.* 276: 29826-29832.

- Levicán, G., Katz, A., de Armas, M., Núñez, H., Orellana, O. (2007). Regulation of a glutamyl-tRNA synthetase by the heme status. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 3135-3140.
- Loftin, I. R., Franke, S., Roberts, S. A., Weichsel, A., Héroux, A., Montfort, W., Rensing, C., McEvoy, M. M. (2005). A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry.* 44: 10533-10540.
- Magnani, D., Solioz, M., (2007). How bacteria handle copper. *Microbiol. Monogr.* 6: 259-85.
- McClellan, A. J., Tam, S., Kaganovich, D., Frydman, J. (2005). Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat. Cell Biol.* 7: 736-741.
- Muir, M. K., Andersen, T. N. (1977). Determination of ferrous iron in copper-process metallurgical solutions by the o-phenanthroline colorimetric method. *Metall Mater Trans B.* 8: 517-518.
- Nathan, D. F., Vos, M. H., Lindquist, S. (1997). In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 12949-12956.
- Navarro, C.A. (2009) Tesis Doctoral: Universidad de Santiago de Chile.
- Navarro, C. A., Orellana, L. H., Mauriaca, C., Jerez, C. A. (2009). Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 6102-6109.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T., and Buchanan, K. (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 43-60.
- Olson, G. J., Brierley, J. A. y Brierley, C. L. (2003). Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 249-257.
- Orell, A., Navarro, C. A., Arancibia, R., Mobarec, J. C., Jerez, C. A. (2010). Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnol. Adv.* 28: 839-848.
- Orellana, L. H., Jerez, C. A. (2011). A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 761-767.

- Orellana, L. H. (2011). Tesis de magister: Estudio de la expresión y funcionalidad de genes relacionados con la resistencia al cobre en una isla genómica de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. Universidad de Chile.
- Padilla-Benavides, T., Thompson, A. M. G., McEvoy, M. M., Argüello, J. M. (2014). Mechanism of ATPase-mediated Cu<sup>+</sup> export and delivery to periplasmic chaperones the interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF. *J. Biol. Chem.* 289: 20492-20501.
- Peña, M. O., Lee, J., Thiele, D. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* 129: 1251-1260.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids. Res.* 29: 2002-2007.
- Postle, K. (2007). TonB System, In Vivo Assays and Characterization. *Meth. Enzymol.* 422: 245-269.
- Piddock L. J (2006). Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:629-36.
- Predki, P. F., Sarkar, B. (1992). Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J. Biol. Chem.* 267: 5842-5846.
- Puig, S., Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 171-180.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Jedlicki, E., Holmes, D. S., Bonnefoy, V. (2009). Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *BMC Genomics.* 10: 394.
- Quatrini, R., Lefimil, C., Holmes, D. S., Jedlicki, E. (2005). The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *A. ferrooxidans*. *Microbiology.* 151.
- Rawlings, D. E. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 65-91.
- Ratledge, C., Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 881-941.
- Remonsellez, F., Orell, A., Jerez, C. A. (2006). Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiol.* 152: 59-66.
- Rensing, C., Grass, G. (2002). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:197-213.

- Rodríguez, C. E., Quesada, A. (2006). Nickel biosorption by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from industrial wastewater. *Braz. J. Microbiol.* 37: 465-467.
- Roger, M., Biaso, F., Castelle, C. J., Bauzan, M., Chaspoul, F., Lojou, E., Ilbert, M. (2014). Spectroscopic characterization of a green copper site in a single-domain cupredoxin. *PLOS ONE.* 9: 98941.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K., Sand, W. (2003). Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 239-248.
- Rydén, L. G., Hunt, L. T. (1993). Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. *J. Mol. Evol.* 36: 41-66.
- Saier, M. H., Tam, R., Reizer, A., Reizer, J. (1994). Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11: 841-847.
- Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C., Montfort, W. R. (2004). Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186: 7815-7817.
- Solioz, M., Stoyanov, J. V. (2003). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Res.* 27: 183-195.
- Valvano, M. A., Marolda, C. L., Bittner, M., Glaskin-Clay, M., Simon, T. L., Klena, J. D. (2000). The rfaE gene from *Escherichia coli* encodes a bifunctional protein involved in biosynthesis of the lipopolysaccharide core precursor ADP-L-glycero-D-mannoheptose. *J. Bacteriol.* 182: 488-497.
- Van Veen H. W., Abee, T., Kortstee, G. J., Konings W. N., Zehnder, A. J. (1994). Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochem.* 33: 1766-1770
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake, R., Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics.* 9: 597.
- Vera, M., Schippers, A., Sand, W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation – part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 7529-7541.

- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro M. A. (2010). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 149-67.
- Whitesell, L., Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 5: 761-772.
- Wolfe, A. J., Millikan, D. S., Campbell, J. M., Visick, K. L. (2004). *Vibrio fischeri* sigma (54) controls motility, biofilm formation, luminescence, and colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2520-2524.
- Yarzabal, A., Brasseur, G., Ratouchniak, J., Lund, K., Lemesle-Meunier, D., DeMoss, J. A., Bonnefoy, V. (2002). The high-molecular-weight cytochrome c Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *J. Bacteriol.* 184: 313-317.
- Yarzabal A., Appia-Ayme C., Ratouchniak J., Bonnefoy V. (2004). Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology.* 150: 2113-2123.
- Zhao, K., Liu M. Z., Burgess, R.R. (2010). Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor, Sigma (54), reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic. Acids Res.* 38: 1273-1283.
- Zhang, W., Majidi, V. (1994). Monitoring the cellular response of *Stichococcus bacillaris* to exposure of several different metals using in vivo <sup>31</sup>P NMR and other spectroscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.* 28: 1577-1581.

## 7. ANEXO

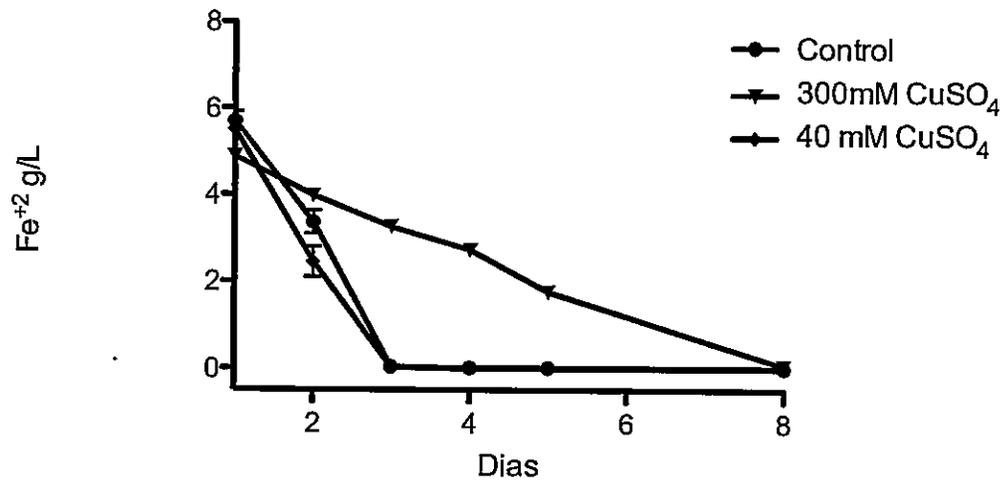


Figura A1. Determinación de Fe<sup>+2</sup> en el sobrenadante de *A. ferrooxidans* mediante el método de la fenantrolina (Muir y Andersen., 1977).