

UCH-FC  
Biotecnología  
066  
CA

UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO



**“Estudio de la expresión de potenciales genes de  
resistencia al cobre en *Acidithiobacillus  
ferrooxidans* ATCC 23270”**

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

**Luis Humberto Orellana Retamal**



Director de Seminario de Título: Dr. Carlos Jerez Guevara

Diciembre 2009

Santiago – Chile



*A Noelia Vásquez*

*y mi familia*



En un Santiago todavía tembloroso, nací el 11 de marzo de 1985. A una hora y un poco mas de Santiago, viví gran parte de mi niñez junto a mi hermana Camila en la tranquila comuna de Calera de Tango. Este sereno ambiente me permitió compartir con la naturaleza de una forma muy cercana. Fue acá donde también realicé mis estudios de enseñanza básica y media en el Colegio Carampangue. En este colegio tuve la oportunidad de conocer a grandes maestros y amigos que guiaron mis incipientes pasos en el mundo. En el año 2003 ingresé a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Este hecho además me permitió conocer más de Santiago, impresionándome su constante bullicio y estrés, pero que alegremente terminaba cuando llegaba finalmente a casa tras atravesar prácticamente todo Santiago. Ingresar a la Universidad también significó una gran experiencia, he tenido la suerte de conocer grandes personas que se han convertido en mis amigos, y al mismo tiempo en una fuente incansable de inspiración.

## Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Carlos Jerez por permitirme desarrollar este seminario de Título en su Laboratorio. Estoy agradecido por la gran motivación y dedicación demostrada durante mi estadía en el laboratorio.

A todos mis compañeros de carrera y en especial a Karina Aguilera, Melissa Carmody, Paulina Fuentes, Daniela Sandoval, Cecilia Mauriaca, Sebastián Febres, Patricio Mandujano, Consuelo Rámila, Emanuel Llaguno, Daniel Opazo, Carlos Flores y Rafaela Arancibia. Todos ellos fueron parte importante tanto del proceso aprendizaje como de muchos momentos agradables dentro y fuera de la Universidad.

A Claudio Navarro, Cecilia Mauriaca, Alvaro Orell, Simon Beard, Fernando Pagliai, Felipe Gordillo, Valentina Abarca, Francisco Chávez, Rodrigo Almárcegui y Andrés Villa, Rafaela Arancibia, Cristóbal Córdova y Camilo Valdivieso. Quiero agradecer por su compañía, simpatía y la gran agudeza demostrada en tantas conversaciones de laboratorio y así como también en otras más personales. En especial quiero agradecer por la buena disposición y amistad con la que me recibieron y me ha permitido compartir con ellos durante este tiempo.

A Juan Araos, quien realiza un silencioso pero importantísimo trabajo que es fundamental para realizar el trabajo diario de laboratorio.

A la Dra. Claudia Stange por recibirme en su laboratorio cuando mi experiencia de trabajo era nula. Además por todo el cariño y dedicación entregada durante ese tiempo.

A mi familia, mi mamá, mi papá, mi hermana, mis primos y tíos, quienes sin comprender bien lo que realmente hago, siempre me han dado todo el apoyo para seguir con mis sueños y anhelos.

A mis abuelos y en especial a mi abuela Noelia Vásquez, de quien considero que su interés y devoción por la ciencia dejo huellas imborrables en mi vida.

y en especial a Alissa por darme la fuerza, energía y los mejores momentos de mi vida. *The world will never ever be the same.*



## Resumen

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una  $\gamma$ -proteobacteria, Gram-negativa, quimiolitotoautotrófica, capaz de utilizar el ion ferroso y una variedad de compuestos reducidos de azufre como fuente de energía. Estas capacidades permiten a *A. ferrooxidans* participar, junto a otros microorganismos, en los procesos de la biominería para la extracción de cobre (Cu) y otros metales. Este acidófilo además puede ser adaptado al crecimiento con hasta 800 mM de Cu. Este hecho lo posiciona como el más resistente a dicho metal. Sin embargo, se sabe muy poco de los mecanismos que posee esta bacteria para la resistencia al Cu. Nuestro grupo ha propuesto un mecanismo de resistencia al Cu en microorganismos biolixiviantes basado en el metabolismo de los polifosfatos, por otra parte, en la literatura se ha sugerido que los determinantes de resistencia al cobre estarían codificados en el genoma de la bacteria.

Nuestro grupo realizó una búsqueda bioinformática de posibles determinantes de resistencia al Cu codificados en su genoma. Se encontró que los ORFs afe1073 (*afcopB*), afe0663 (*afcopA1*) y afe0329 (*afcopA2*) corresponden a posibles ATPasas de Cu. También se encontró un sistema de eflujo tipo RND, similar al sistema Cus (Cu sensing) codificado en los ORFs afe1142 (*afcusC*), afe1143 (*afcusB*) y afe1144 (*afcusA*). Además se identificaron dos posibles chaperonas de Cu periplasmáticas: ORF afe0326 (*afcusF*) y un ORF no anotado (*afcopC*). En este seminario de título mediante PCR en tiempo real se cuantificó la expresión de la mayoría de estos genes desde cultivos adaptados al crecimiento con Cu. Se observó que todos los genes del posible sistema Cus se inducen,



llegando a 330 veces por sobre el control (*afcusB*). La ATPasa de cobre *afcopB* mostró una aumento de la expresión de 90 veces y la chaperona de Cu *afcopC* de 8 veces por sobre el control. Estos resultados muestran por primera vez un aumento en la expresión de genes relacionados con la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

El presente seminario de título permitió desarrollar aproximaciones experimentales para la cuantificación de los niveles de mRNA en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a través de PCR en tiempo real. De esta forma se generó nuevo conocimiento relacionado con la resistencia al Cu en este acidófilo de importancia minera.



## Abstract

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is an acidophilic,  $\gamma$ - proteobacterium, Gram-negative and chemolithotrophic bacteria, capable of using ferric iron and a diversity of reduced sulfur compounds as an energy source. These capabilities allow *A. ferrooxidans* to participate with other microorganisms in biomining processes for the extraction of copper (Cu) and other metals. Moreover, this acidophile can be adapted to grow even with 800 mM of Cu. This fact makes it the most resistant microorganism to this metal. Nevertheless, very little is known about the mechanisms that these bacteria possess for Cu resistance. Our group has proposed a Cu resistance mechanism based on poly-P metabolism, on the other hand, it been suggested that the Cu resistance is encoded on the genome of the bacteria.

Our laboratory carried out a search for possible Cu resistance determinants coded in its genome. It was found that the ORFs afe1073 (*afcopB*), afe0663 (*afcopA1*) and afe0329 (*afcopA2*) correspond to possible Cu-ATPases. Also an RND efflux system, similar to the Cus system (Cus sensing) coded in ORFs afe1142 (*afcusC*), afe1143 (*afcusB*) y afe1144 (*afcusA*) was found. Additionally, two possible periplasmic Cu chaperones: ORF afe0326 (*afcusF*) and a non-annotated ORF (*afcopC*) were identified. In this work, by means of real time PCR, the expression of the majority of these genes was quantified from adapted cultures to growth with Cu. It was observed that all genes belonging to the Cus system were upregulated, reaching 330 times over the control

condition (*afcusB*). The Cu-ATPase *afcopB* showed a 90 times induction and the Cu chaperone *afcopC* showed an 8 times induction over control condition. These results show an increase in the expression of genes related with the Cu resistance in *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

The present work permitted the development of experimental approaches for the quantification of mRNA levels in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 through real time PCR. From this, new knowledge related to the Cu resistance mechanism in this acidophile of mining importance was generated.



## LISTA DE MATERIAS

1. Introducción.....	1
1.1. Metales pesados en bacterias.....	3
1.2. El Cu en el ambiente y en los organismos.....	4
1.3. Toxicidad del Cu en los microorganismos .....	4
1.4. Homeostasis y resistencia al Cu en <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus hirae</i> y <i>Pseudomonas syringae pv tomato</i> .....	5
1.4.1. Eflujo de Cu citoplasmático hacia el periplasma a través de ATPasas de Cu	6
1.4.2. Transporte de Cu desde el citoplasma y periplasma hacia el espacio extracelular, el sistema <i>cus</i> .....	9
1.4.3. Oxidación del Cu periplásmico por CueO.....	9
1.4.4. Plásmidos relacionados con la resistencia a Cu. <i>Pseudomonas syringae pv tomato</i> .....	10
1.5. Resistencia al Cu en <i>A. ferrooxidans</i> .....	11
2. Materiales y métodos .....	17
2.1. Cepas y condiciones de cultivo .....	17
2.2. Técnicas de Biología Molecular .....	17
2.2.1. Extracción de DNA .....	17
2.2.2. Cuantificación del DNA .....	18
2.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	18
2.2.4. Diseño de oligonucleótidos para las reacciones de PCR y PCR en tiempo real .....	19
2.2.5. Reacciones de PCR.....	20
2.2.6. Reacciones de PCR en tiempo real.....	21
2.3. Técnicas con RNA.....	22
2.3.1. Extracción de RNA total.....	22
2.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.....	23
2.3.3. Cuantificación del RNA .....	23
2.3.4. Transcripción inversa .....	24
2.3.5. Experimentos de co-transcripción .....	24

2.4. Métodos informáticos.....	25
2.4.1 Comparación informática de las secuencias analizadas .....	25
<b>3. Resultados.....</b>	<b>26</b>
3.1. Adaptación de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 a diferentes concentraciones de Cu.....	26
3.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	27
3.3. Expresión relativa de los mensajeros asociados a la resistencia al Cu de <i>A. ferrooxidans</i> .....	28
3.4. Búsqueda de posibles relaciones de co-transcripción. <i>cusCBA</i> y <i>copCD</i> .....	32
<b>4. Discusión.....</b>	<b>34</b>
4.1. Determinantes de resistencia al Cu en <i>A. ferrooxidans</i> .....	34
4.2. Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de Cu.....	35
4.3. Extracción RNA de cultivos adaptados al crecimiento con Cu y síntesis de cDNA.....	36
4.4. Estudio de la expresión diferencial de transcritos de los determinantes de resistencia a Cu de <i>A. ferrooxidans</i> por PCR en tiempo real .....	36
4.5. Posible sistema de resistencia al Cu en <i>A. ferrooxidans</i> .....	40
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>43</b>
<b>6. Referencias.....</b>	<b>44</b>
<b>7. Material suplementario.....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Homeostasis del Cu en <i>E. coli</i> .....	7
<b>Figura 2.</b> Homeostasis del Cu en <i>E. hirae</i> .....	8
<b>Figura 3.</b> Homeostasis del Cu en <i>P. syringae</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Contexto genético de los posibles determinantes de resistencia encontrados en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	14
<b>Figura 5.</b> Curva de crecimiento para los cultivos crecidos en 0, 5 y 25 mM de CuSO <sub>4</sub> .....	27
<b>Figura 6.</b> Integridad del RNA extraído previo y posterior al uso de la DNasa y prueba del cDNA por PCR.....	28
<b>Figura 7.</b> Resultados de la curva de calibración del gen <i>16S rRNA</i> por PCR en tiempo real.....	29
<b>Figura 8.</b> Los grupos de genes <i>afcusC/afcusB/afcusA</i> y <i>afcopC/afcopD</i> se co-transcriben.. ..	33
<b>Figura 9.</b> Posible sistema de resistencia y homeostasis del Cu en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 .....	41

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Concentración de metales pesados a la que existe actividad metabólica en distintos microorganismos con especial énfasis en bacterias y arqueas acidófilas. ....	2
<b>Tabla 2.</b> Grado de identidad aminoacídica entre los potenciales determinantes de resistencia a Cu de <i>A. ferrooxidans</i> y las proteínas descritas en los mecanismos de resistencia al Cu en otros microorganismos. ....	13
<b>Tabla 3.</b> Alineamiento de las posibles ATPasas de Cu en <i>A. ferrooxidans</i> con otros transportadores de Cu caracterizados para otras bacterias. ....	15
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de los partidores usados en el presente trabajo. ....	20
<b>Tabla 5.</b> Resumen de las curvas de calibración obtenidas para los genes analizados por PCR en tiempo real. ....	30
<b>Tabla 6.</b> Niveles de transcritos para los genes asociados con la resistencia al Cu en <i>A. ferrooxidans</i> mediante análisis de PCR en tiempo real. ....	30
<b>Tabla 7.</b> Expresión normalizada de los posibles genes de resistencia al Cu en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270. ....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS

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

## 1. Introducción

Los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias que les permiten adaptarse a los distintos nichos en que se desarrollan. Gracias a estas adaptaciones han podido colonizar todo tipo de ambientes e incluso algunos que nosotros podríamos clasificar como “extremos” desde un punto de vista antropocéntrico. Éstos se definen por al menos un parámetro extremo, pudiendo ser físico o químico (por ejemplo pH o concentración de sales y temperatura o radiación, respectivamente) (Nies, 2000). Es así que podemos clasificar a los microorganismos que resisten altas temperaturas, como termófilos, o los que viven a bajo pH, como acidófilos. En la actualidad existe alto interés a nivel científico por estos microorganismos desde un punto de vista tanto básico como aplicado.

Los microorganismos acidófilos están dispersos en distintos ambientes naturales y artificiales. Un claro ejemplo de este tipo de ambientes es el que se da en los procesos de lixiviación bacteriana, en los que además de existir bajos niveles de pH, presentan altas concentraciones de metales pesados (Dopson y col., 2003). Este proceso es desarrollado por comunidades de microorganismos que han participado en el depósito y solubilización de metales pesados en la tierra desde tiempos geológicos muy antiguos. Mucha de esta actividad está ligada a los ciclos del hierro y azufre, donde, bacterias anaeróbicas y sulfato reductoras producen sulfuros que reaccionan con distintos metales para formar sulfuros de metal insolubles que precipitan y participan en la formación de rocas. Por otra parte estos sulfuros de metales también pueden servir como fuente de electrones para microorganismos oxidantes de sulfuros. Como resultado de este

metabolismo se liberan sulfatos de metales solubles drenándose desde sus depósitos. Esta habilidad para solubilizar metales ha dado paso a la industria de la biominería. Este proceso biológico se utiliza para la recuperación de metales como el cobre (Cu), cobalto, níquel, zinc y uranio, los que son extraídos a partir de sulfuros insolubles u óxidos (Rohwerder y col., 2003).

Se ha reportado que los microorganismos que participan en los procesos de biolixiviación poseen altos niveles de resistencia a distintos metales pesados (Johnson y Hallberg, 2003). Ente ellos destaca *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Tabla 1).

**Tabla 1.** Concentración de metales pesados a la que existe actividad metabólica en distintos microorganismos con especial énfasis en bacterias y arqueas acidófilas. Basado en Dopson y col. (2003).

Microorganismo	Concentración de metal a la que hay actividad metabólica (mM)				
	As (III)	Cu(II)	Zn(II)	Cd(II)	Ni(II)
<b>Bacteria Neutrófila</b>					
<i>Escherichia coli</i>	4	1	1	0,5	1
<b>Bacteria Acidófila</b>					
<i>Acidiphilium cryptum</i>	ND	15	125	700	20
<i>Acidiphilium multivorum</i>	30	10	40	20	350
" <i>Acidiphilium symbioticum</i> " KM2	ND	20	150	700	20
" <i>Acidiphilium symbioticum</i> " H8	ND	15	150	700	30
<i>Acidiphilium angustum</i>	ND	5	8	<0,2	10
<i>Acidiphilium cepa</i> GS18h	ND	15	60	10	30
<i>Acidocella aminolytica</i>	ND	30	500	200	150
<i>Acidocella facilis</i>	ND	<1	100	<1	1
<i>Acidocella</i> strain GS19h	ND	15	900	700	150
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	84	800	1071	500	1000
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	ND	6	43	ND	5
<b>Arquea acidófila</b>					
" <i>Ferroplasma acidarmanus</i> "	13	16	ND	9	ND
<i>Metallosphaera sedula</i>	1	16	150	1	ND
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	ND	1	10	10	1
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ND	1	10	10	0,1
<i>Sulfolobus metallicus</i>	1,3 <sup>§</sup>	200*	300 <sup>§</sup>	3 <sup>§</sup>	17 <sup>§</sup>

\* Basado en Remonsellez y col. (2006) y <sup>§</sup> en Huber y Stetter (1991).

*A. ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa, quimilitoautotrófica, capaz de utilizar el ion ferroso y una variedad de compuestos reducidos de azufre como fuente de energía (Valenzuela y col., 2006). Este microorganismo además puede ser adaptado para crecer en altas concentración de distintos metales pesados y en el caso particular del Cu se ha descrito que puede crecer hasta en 800 mM de dicho metal en su medio de desarrollo (Harvey y Crundwell, 1996). Por este motivo *A. ferrooxidans* resulta ser un modelo de estudio muy interesante en cuanto a la alta resistencia a metales pesados.

### **1.1. Metales pesados en bacterias**

Existen metales que son esenciales e indispensables para el desarrollo de los organismos. Sin embargo, a una alta concentración estos pueden ser tóxicos. Algunos de estos metales son el cobalto (Co (II)), cobre (Cu (II)), níquel (Ni (II)) y el Zinc (Zn (II)). Pese a su toxicidad, estos metales pueden acumularse al interior de las células por sobre los niveles fisiológicos normales debido a la acción de sistemas de transporte que funcionan de manera constitutiva e inespecífica. Estas vías son responsables de un ingreso no controlado de metales pesados al interior de la célula, generándose de este modo una “compuerta abierta” para el tránsito de estas especies al espacio intracelular y/o periplásmico de estos microorganismos (Nies, 1999; Dopson y col., 2003).

En el interior de las células, estos metales pueden ejercer un efecto perjudicial sobre los componentes celulares, como por ejemplo, el bloqueo de grupos funcionales enzimáticos mediante la formación de enlaces coordinados con aniones (unión a grupos sulfhidrido p. ej), así como también pueden desplazar metales esenciales de sus uniones



nativas o afectar la integridad de la membrana celular. Debido a estos efectos tóxicos, algunos microorganismos generaron sistemas de destoxificación para mantener niveles no perjudiciales al interior de las células.

## **1.2. El Cu en el ambiente y en los organismos**

El Cu está ampliamente distribuido en la tierra y principalmente en la forma de minerales como sulfuros, óxidos y carbonatos, también en menas de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), calcocita ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), cuprita ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) y malaquita ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ). El Cu tiene parcialmente ocupado el orbital  $d$  por lo que puede encontrarse con más de un estado de valencia, ya sea en la forma de Cu(I) ( $d^{10}$ ) “cuprosa” o Cu(II) ( $d^9$ ) “cúprica” (Solioz y Stoyanov, 2003).

En los microorganismos y organismos superiores existen diversos tipos de proteínas que usan Cu en su estructura o que son capaces de unirlo a través de distintos dominios característicos. Estas proteínas están involucradas en procesos de respiración, defensa contra el estrés oxidativo, pigmentación y transporte de hierro.

## **1.3. Toxicidad del Cu en los microorganismos**

Las propiedades redox del Cu pueden resultar peligrosas ya que pueden causar daño celular cuando está en exceso. Aunque la forma exacta por la que el Cu es tóxico no está completamente descrita, se cree que posiblemente es por la producción de hidroxilos y radicales ( $\text{OH}\cdot$ ) en una reacción tipo Fenton:



Este radical hidroxilo es extremadamente reactivo y puede participar en distintas reacciones perjudiciales para las moléculas celulares, como por ejemplo, la oxidación de proteínas y lípidos (Magnami y Solioz, 2007). Por otro lado, el Cu puede ser tóxico debido a la unión espontánea a proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos. Esto provoca el desplazamiento de metales nativos en estas estructuras, y consecuentemente alteraciones en su función. Además pareciera que el Cu es mas tóxico en condiciones anaeróbicas, posiblemente debido a la reducción del Cu (II) a Cu (I). Esta forma puede difundir por la membrana citoplasmática causando una mayor acumulación de Cu.

No resulta difícil pensar por lo tanto, que junto con el uso del Cu en los metabolismos también surgieron mecanismos que permitiesen regular y mantener un nivel adecuado del metal en los distintos organismos.

#### **1.4. Homeostasis y resistencia al Cu en *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae* y *Pseudomonas syringae pv tomato***

A la fecha los mecanismos descritos para la homeostasis y resistencia al Cu se han reportado en *E. coli*, *E. hirae* y *P. syringae pv tomato*.

*E. coli* es una bacteria neutrófila, Gram-negativa que vive en los tractos digestivos de animales de sangre caliente. Se ha reportado que la concentración de Cu, específicamente en el duodeno y estómago de estos animales podría alcanzar hasta los 10  $\mu\text{M}$  (Rensing y Grass, 2003). *E. hirae* es una bacteria Gram-positiva y se ha asociado a la patogénesis en animales y humanos en muy pocos casos. *P. syringae pv tomato* es

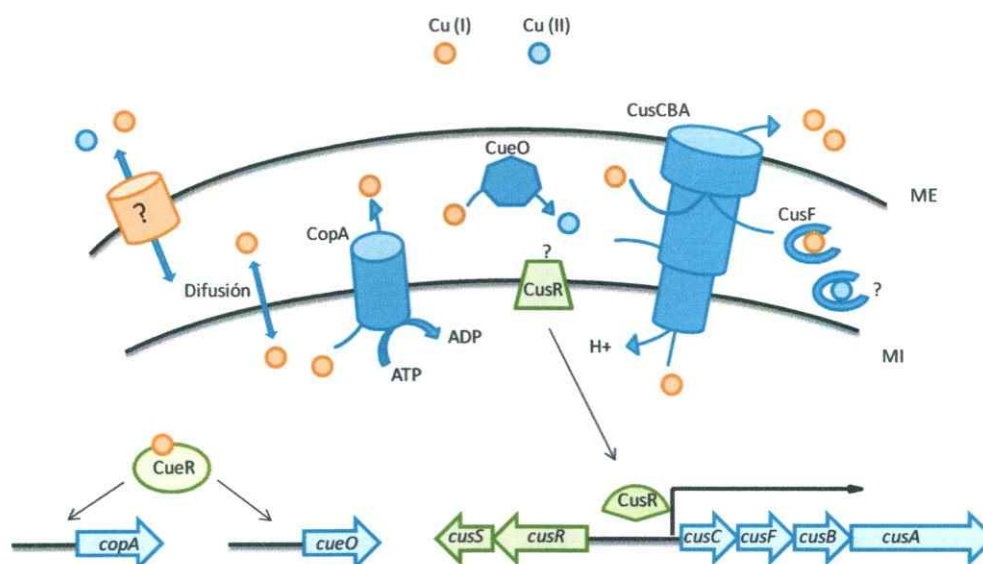
una bacteria Gram-negativa que se aisló por ser resistente al Cu durante la eliminación de patógenos en tomates infectados con distintos microorganismos.

#### **1.4.1. Eflujo de Cu citoplasmático hacia el periplasma a través de ATPasas de Cu**

Las ATPasas de Cu están localizadas en la membrana interna de algunas bacterias y transportan Cu(I) desde el citoplasma al espacio periplasmático (o viceversa) a expensas de la hidrólisis del ATP. Estas proteínas pertenecientes a un subgrupo de las ATPasas tipo P se caracterizan por el transporte de metales pesados como el  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$  a través de membranas biológicas (Argüello y col., 2007) y conservan un aminoácido (aspártico) en el dominio de fosforilación. Constan de 8 segmentos de transmembrana del tipo  $\alpha$ -hélice. Entre las ATPasas de Cu existen dominios conservados de unión a ATP (GDGIN), fosforilación (DKTGT) y dominios fosfatasas (TGE). También tienen dos motivos de unión a metales CxxC en la región N-terminal. Sin embargo, se ha visto que este último dominio no es requerido para su función y aparentemente no confiere especificidad al metal (Magnani y Solioz, 2007). Un motivo de gran importancia se encuentra en una  $\alpha$ -hélice de transmembrana y está relacionado con la especificidad al metal transportado por estas ATPasas. En este motivo "CPx" es común encontrar que el aminoácido siguiente a la prolina varíe según la especificidad al metal. En proteínas transportadoras de Cu es característico encontrar el motivo CPCALGLA. Otras de las características comunes entre estas ATPasas son el motivo HP. Éste se encuentra cercano al sitio de unión de ATP y su función hasta hoy es desconocida. Sin embargo, una mutación en este sitio no afecta la actividad de esta proteína (Solioz y Stoyanov,

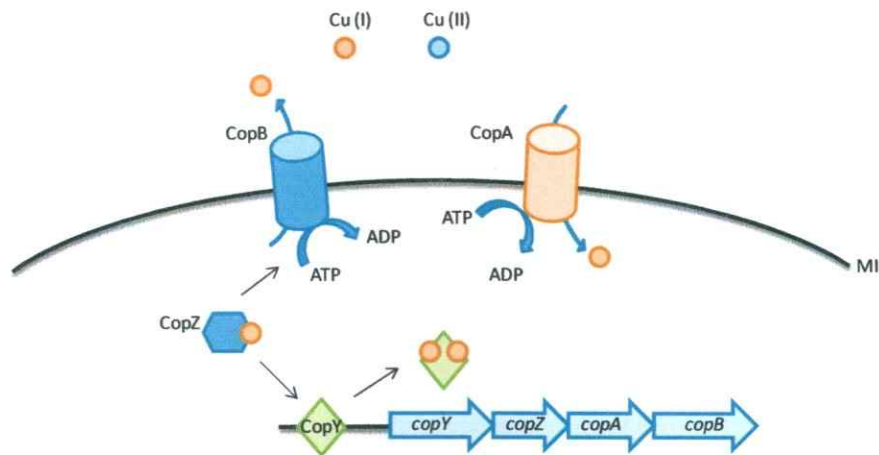
2003). Otras secuencias conservadas son el dominio de unión a nucleótidos (GDGxNDxP).

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



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

En *E. hirae* también se han descrito ATPasas relacionadas con la homeostasis del Cu que comparten características estructurales similares a las presentes en *E. coli*. En este microorganismo se han descrito proteínas de influjo (CopA) y de eflujo (CopB) de Cu. Sin embargo, en esta última proteína no se ha encontrado el motivo de unión a metales CxxC en el amino terminal, pero se ha descrito un sitio rico en aminoácidos histidina que probablemente participen en la unión a este metal (Solioz y Stoyanov, 2003). Se ha postulado que CopA transporta Cu hasta el medio intracelular, donde la chaperona CopZ captura el metal y lo transfiere a la proteína represora CopY. A la unión de Cu se inactiva la acción represora de CopY y entonces se transcriben genes asociados a la homeostasis del Cu (Solioz y Stoyanov, 2003) (Figura 2).



**Figura 2.** Homeostasis del Cu en *E. hirae*. El Cu puede entrar a las células por la ATPasa de influjo de Cu CopA. CopZ une el metal dentro de la célula. Esta proteína transfiere el metal a CopB (ATPasa de eflujo de Cu) o al represor CopY. Esta proteína reprime la expresión del operón *cop* cuando une zinc. La unión de dos átomos de Cu en su estructura permite su inactivación y la expresión del operón. A diferencia de *E. coli*, CopA es una ATPasa de influjo y no de eflujo. Figura modificada de Maganani y Solioz (2007).

#### **1.4.2. Transporte de Cu desde el citoplasma y periplasma hacia el espacio extracelular, el sistema *cus***

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

#### **1.4.3. Oxidación del Cu periplásmico por *CueO***

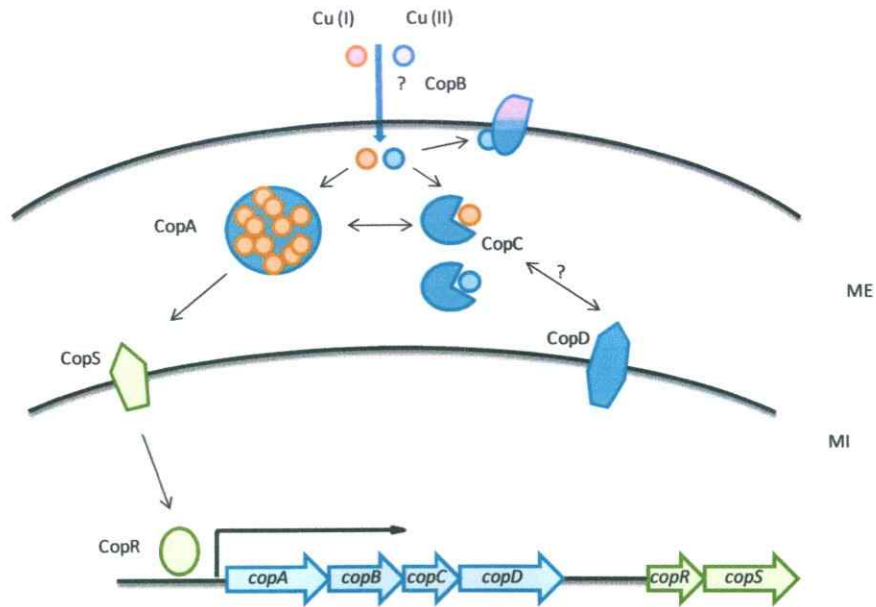
*CueO* es una oxidasa de Cu periplasmática que está relacionada con la resistencia al Cu en *E. coli*. Esta proteína participa en la oxidación del Cu (I) a Cu (II), cambiando la oxidación del metal a un estado menos tóxico. Su expresión, al igual que *CopA*, está

regulada por CueR y se ha demostrado que ambos genes comparten características comunes en la secuencia del promotor (Magnani y Solioz, 2007) (Figura 1).

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

Un sistema de resistencia asociada a plásmidos se encontró por primera vez en *Pseudomonas syringae pv tomato*. La resistencia a Cu reside en el operón *copABCDS* dentro del plásmido pPT23D. A diferencia de los otros mecanismos, este sistema se basa en la retención del Cu y no en la eliminación hacia el medio externo. De hecho, estas bacterias son capaces de acumular hasta un 12% de su peso seco en Cu. Aunque el mecanismo exacto por el cual estas proteínas estarían relacionadas con la resistencia a Cu es desconocido, se cree que este mecanismo une Cu periplásmico a través de las proteínas CopC, CopA y CopB. CopB retiene Cu en la membrana externa, mientras que CopC transfiere el metal hacia CopD o CopA. Esta última es una chaperona y oxidasa de Cu que es capaz de unir hasta 11 átomos de Cu en su estructura. La forma apo-CopA puede recibir Cu desde CopD, pero no se sabe exactamente si el metal pasa por el periplasma. En la regulación de este sistema participa CopS, que sensa el Cu periplasmático a través de una posible interacción con las proteínas CopA y CopC. Esta señal es transmitida a CopR la cual induce la expresión del operón *copABCD* (Puig y Rees, 2002) (Figura 3).





**Figura 3.** Homeostasis del Cu en *P. syringae*. El Cu entra al espacio periplásmico de una manera no conocida. CopC une este metal y lo puede transportar directamente a CopD. Además CopA puede unirse y oxidar Cu en sus 11 sitios de unión. El Cu también puede ser capturado en la membrana externa por CopB. CopD entregaría este metal a Apo-CopA y no necesariamente a través de intermediarios citoplasmáticos. En la membrana interna CopS sentiría el Cu por una posible interacción con las proteínas CopA y CopC. Esta señal sería enviada a CopR e induciría la expresión del operón *copABCD*. Figura modificada de Puig y Rees (2002).

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

Muy poco se sabe de los mecanismos que poseen los microorganismos acidófilos para la resistencia al bajo pH del medio y a metales pesados. En una cepa de *A. ferrooxidans* aislada desde una faena minera se reportó que al cultivarla con Cu en el medio se evidencian diferencias a nivel químico de la membrana, lo que se atribuye a un cambio a nivel de las proteínas que la constituyen (Das y col., 1998).

También se ha reportado que cuando esta bacteria se expone a Cu (II) hay una disminución en el número de copias de los plasmidios que esta célula posee. Sin embargo, se evidencia un aumento del número de copias del plasmidio cuando se crece



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

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

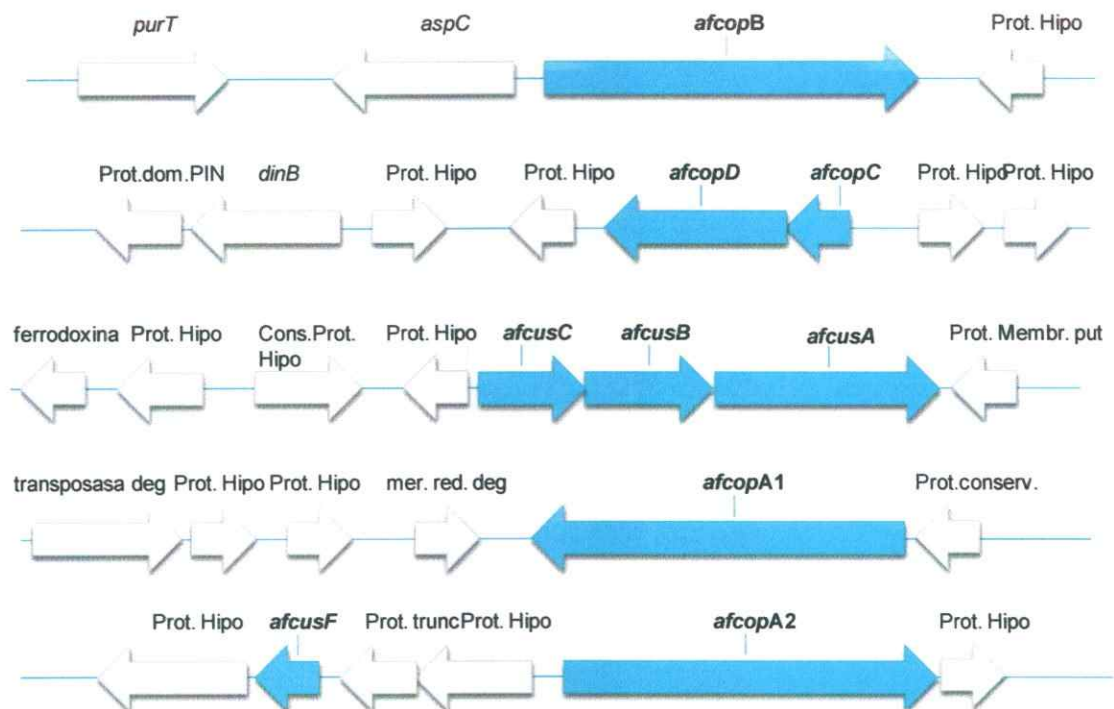
Nuestro grupo hizo una búsqueda de posibles determinantes de resistencia a Cu en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. La búsqueda de estos determinantes se realizó por comparación de los sistemas de resistencia a Cu conocidos y reportados en otros microorganismos. De esta manera fue posible proponer que ciertos ORFs presentes

en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 podrían tener una función de resistencia al Cu similar a otras bacterias (Tabla 2).

**Tabla 2.** Grado de identidad aminoacídica entre los potenciales determinantes de resistencia a Cu de *A. ferrooxidans* y las proteínas descritas en los mecanismos de resistencia al Cu en otros microorganismos.

ORF	gen	% Identidad	% Similitud	Comparado con	Nº acceso	Función probable
afe1073	<i>AfcopB</i>	42	61,9	<i>E. hirae</i> (CopA)	AAA61835	ATPasa de Cu
no anotado	<i>AfcopC</i>	30,3	41	<i>P. syringae pv</i>	AAAY36545	Chaperona de Cu
afe0454	<i>AfcopD</i>	20,5	30,2	<i>P. syringae pv</i>	AAAY36546	Resistencia al Cu
afe1142	<i>AfcusC</i>	22,9	33,8	<i>E. coli</i>	AAC73673	Sistema RND
afe1143	<i>AfcusB</i>	31	45	<i>E. coli</i>	AAC73675	Sistema RND
afe1144	<i>AfcusA</i>	49	71	<i>E. coli</i>	AAC73676	Sistema RND
afe0326	<i>AfcusF</i>	23	40,5	<i>E. coli</i>	AAC73674	Chaperona de Cu
afe0663	<i>AfcopA1</i>	41,3	60,8	<i>E. hirae</i> (CopB)	P05425	ATPasa de Cu
afe0329	<i>AfcopA2</i>	41,3	60,8	<i>E. hirae</i> (CopB)	P05425	ATPasa de Cu

Se encontraron 9 componentes pertenecientes a los principales sistemas de resistencia a Cu descritos en otras bacterias. Entre ellos, ATPasas de Cu, Chaperonas de Cu y un sistema de eflujo RND. Adicionalmente, en la figura 4 se muestra el contexto genético de estos posibles determinantes de resistencia de *A. ferrooxidans*.



**Figura 4.** Contexto genético de los posibles determinantes de resistencia encontrados en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En azul se muestran los ORF que podrían tener relación con la resistencia al Cu en este acidófilo. La anotación de los genes se obtuvo desde <http://cmr.jvci.org/>.

Uno de los posibles sistemas de resistencia al Cu encontrado en *A. ferrooxidans* corresponde a uno análogo al sistema Cus de *E. coli*. En la base de datos, estos ORFs están clasificados como miembros de un sistema de transporte RND. A la fecha no existe evidencia en la literatura que proponga estos genes como posibles determinantes de resistencia al Cu en este acidófilo.

Además fue posible encontrar dos componentes del sistema de resistencia y homeostasis al Cu similares a los de *P. syringae*. Chi y colaboradores (2007) encontraron experimentalmente una proteína tipo CopC codificada por un ORF no anotado en el genoma de *A. ferrooxidans* en preparaciones de proteínas periplasmáticas

de esta bacteria. Un análisis del contexto genético de esta proteína mostró que también hay presente un ORF que codifica una proteína de cierta identidad con la proteína CopD de *P. syringae*.

También se encontraron ATPasas de Cu en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En forma previa, la literatura ha propuesto que el ORF afe1073 (*afcusB*) correspondería a una ATPasa de influjo de Cu debido a su alto porcentaje de similitud con la proteína CopA de *E. hirae*, a diferencia del ORF afe0663 (*afcopA2*), el cual ha sido propuesto como una ATPasa de eflujo debido a su alto porcentaje de similitud con la proteína de CopB de *E. hirae* (Quatrini y col., 2007). En el genoma de *A. ferrooxidans* nuestro grupo encontró otro ORF (afe0663) que corresponde a una tercera ATPasa de Cu y con alta identidad nucleotídica (94,5%) a *afcopA2*. Esta ATPasa esta codificada por el gen *afcopA1* (Navarro y col., 2009).

La tabla 3 muestra que en las ATPasas de Cu de *A. ferrooxidans* es posible encontrar distintos dominios característicos entre este tipo de proteínas, que también están presentes en otros microorganismos.

**Tabla 3.** Alineamiento de las posibles ATPasas de Cu en *A. ferrooxidans* con otros transportadores de Cu caracterizados para otras bacterias.

	Microorganismo	Sitio de unión de metales	Dominio fosfatasa	Dominio de traslocación	Dominio de fosforilación	Dominio HP conservado	Motivo GDGxNDxP
CopA	<i>E. coli</i>	CASC...CASC	TGEP	CPCALGLA	FDKTGTLT	SSHPL	GDGINAP
CopA	<i>E. hirae</i>	CANC	TEGES	CPCALGLA	LDKTGTLT	SEHPL	GDGINAP
CopB	<i>E. hirae</i>	no	TEGES	CPHALGLA	LDKTGTLT	no	GDGINDAP
afCopA1	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	no	TEGES	CPHALGLA	FDKTGTLT	SEHPI	GDGVNDAP
afCopA2	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	no	TEGES	CPHALGLA	FDKTGTLT	SEHPI	GDGVNDAP
afCopB	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	CASC...CASC	TGEP	CPCMGLA	LDKTGTLT	SEHPL	GEDINDSP

A partir de los antecedentes anteriormente descritos, nos propusimos caracterizar la expresión genética de los potenciales determinantes de resistencia al Cu encontrados en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

### **1.6. Hipótesis de Trabajo**

El Cu induce la expresión de posibles determinantes de resistencia a este metal en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

### **1.7. Objetivo general**

Cuantificar la expresión de los posibles genes de resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en hierro como fuente de energía.

### **1.8. Objetivos específicos**

1. Obtener cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 adaptados a concentraciones crecientes de  $\text{Cu}^{+2}$ .
2. Extraer RNA total desde cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en distintas concentraciones de  $\text{Cu}^{+2}$  y obtención de los cDNAs correspondientes para cada condición de cultivo.
3. Cuantificar la expresión relativa de los transcritos asociados a la resistencia a Cu por PCR en tiempo real en las condiciones estudiadas.
4. Estudiar posibles relaciones de co-transcripción de los genes asociados a la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.



## **2. Materiales y métodos**

### **2.1. Cepas y condiciones de cultivo**

Se utilizó *A. ferrooxidans* ATCC 23270 el que se creció en un medio de cultivo con ion ferroso como fuente de energía. Este medio corresponde a una modificación del medio 9K y contiene (g/L): 0,1 de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,4 de  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,04 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$  y 33,33 de  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , ajustándose el pH a 1,45 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Posteriormente este medio se esterilizó en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 20 min. Se usó una solución 1 M de  $\text{CuSO}_4$  filtrada (MillexGV  $0,22 \mu\text{m}$ , Durapore) para obtener los cultivos con distintas concentraciones del metal. Las células se crecieron a  $30^\circ\text{C}$  con agitación rotatoria (180 rpm) hasta llegar a la fase exponencial tardía de crecimiento. El crecimiento se determinó mediante el recuento celular utilizando una cámara Petroff-Hausser y el microscopio óptico Olympus BX50.

Para obtener cultivos adaptados al Cu se usaron concentraciones crecientes del metal sobre cultivos en adaptación. Se empezó con un inóculo de células que nunca habían estado en contacto con Cu y se realizaron sucesivos subcultivos. La concentración se fue aumentando en 5 mM de  $\text{CuSO}_4$  cada vez, y de esta forma se llegó a una concentración final de 25 mM de  $\text{CuSO}_4$ .

### **2.2. Técnicas de Biología Molecular**

#### **2.2.1. Extracción de DNA**

Células provenientes de 200 ml de un cultivo de *A. ferrooxidans* en la fase exponencial tardía de crecimiento se colectaron por centrifugación a  $7500 \times g$  por 20

min. Posteriormente se realizó un lavado de las células con 1 mL de una solución de agua ácida ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH = 1,5) y otro con 1 mL de una solución de citrato de sodio 10 mM pH = 7. Estos lavados tienen como finalidad limpiar las células del medio de crecimiento y de  $\text{Fe}_3^+$ . Posteriormente se utilizó el “kit” “Wizard® Genome DNA purification kit” (Promega). Este se basa en la lisis celular seguido de una digestión enzimática del RNA y con una posterior precipitación del DNA genómico con isopropanol y solubilización en agua.

### **2.2.2. Cuantificación del DNA**

La cuantificación del DNA genómico de *A. ferrooxidans* se realizó por la medición de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ). Se utilizó una dilución de 50 veces del DNA obtenido previamente. Se consideró la relación  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g DNA/mL}$  y la pureza se determinó obteniendo la razón de  $A_{260}/A_{280}$ . Se utilizó una preparación de DNA genómico con una razón  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  lo que se considera como “libre” de contaminación por proteínas.

### **2.2.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

Para comprobar la calidad del DNA genómico o los fragmentos de DNA amplificados por PCR o PCR en tiempo real, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% en TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Todas las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25 % de bromofenol, 40 % sacarosa) y se separaron a 100V por 20 min. Finalmente, los geles se tñieron por 10 min

en una solución de bromuro de etidio (0,2 µg/mL). Los geles con las muestras ya separadas se visualizaron por la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta de 320 nm.

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

Para amplificar fragmentos específicos para cada uno de los genes en estudio o para analizar las posibles relaciones de co-transcripción de los genes en estudio se diseñaron partidores usando la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/CmrHomePage.cgi>). El diseño de partidores específicos se realizó utilizando el programa WEB Primer Quest (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) y se sintetizaron por la empresa Invitrogen ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)). Se escogieron partidores de entre 18 a 20 nucleótidos, con un contenido guanina-citocina de al menos 50%, de estructuras secundarias débiles y que permitieran obtener un amplificado de entre 100 y 200 pares de bases (pb) para cada pareja. Posteriormente, se comprobó que cada una de las parejas de partidores amplificara un fragmento específico para cada ORF utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.jcvi.org/cmr-blast/>). Las secuencias de todos los partidores utilizados están en la tabla 4.



**Tabla 4.** Secuencias de los partidores usados en el presente trabajo. Se indica en “usos” como “r” para los experimentos de PCR en tiempo real y “rt” en los de RT-PCR.

Partidor	Secuencia del oligonucleótido	Usos
cusf-fw	5' GGGATTCATGCCGTTGATTT 3'	r
cusf-rev	5' TATCTCACCCCTCATCCTGGC 3'	r
cusf-fw	5' ACTGAAAGGACAACAGGCGG 3'	r rt
cusf-rev	5' TCTTCGGCATAGAGGGCTTG 3'	r rt
cusf-fw	5' CTGGCGTCAACAACACTCCAAT 3'	r rt
cusf-rev	5' AGGCATACCCATACTGTCCT 3'	r rt
cusf-fw	5' GCCCTGCTCCTTTACTTCAA 3'	r rt
cusf-rev	5' ACCGCCACCGATAACTTGTA 3'	r rt
copc-fw	5' AAGAATGCCCAAGGTGCGGT 3'	r rt
copc-rev	5' ACGACGCTCCAGTACACGAA 3'	r rt
copd-fw	5' AGGGCTTGGGAAGGCTGATG 3'	r rt
copd-rev	5' TCCAGATGTCCAGTGTCCGGA 3'	r rt
copb-fw	5' GCGGATGTGGGTATGGCTCT 3'	r
copb-rev	5' GCTGCCTGAATGGCGGTAAT 3'	r
16S rRNA-fw	5' TGGTGCCTAGCGTACTGAGTG 3'	r
16S rRNA-rev	5' CCGAAGGGCACTTCCGCA 3'	r

### 2.2.5. Reacciones de PCR

Para comprobar la especificidad de los partidores diseñados se realizaron reacciones de PCR en un volumen de 25  $\mu$ L. Para cada reacción se usaron 5  $\mu$ L de amortiguador 5X “Green Go taq buffer” (Promega), 20 ng de DNA, 0,5  $\mu$ M de cada pareja de partidores, 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de  $MgCl_2$  y 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa “Go Taq” (Promega). Para la amplificación se utilizó un programa con desnaturación inicial de 3 min a 95°C, 30 ciclos con 30 s a 95°C, 30 s a 57-62°C (según la pareja de partidores), 0,5 a 1,5 min de extensión a 72°C (según el tamaño del amplificado) y finalizando con un paso a 10 min a 72°C.

También, se realizaron reacciones de PCR para comprobar la inexistencia de contaminación con DNA en la síntesis de cDNA. Para esto se amplificó un fragmento del gen 16S *rRNA* usando como molde el cDNA obtenido con y sin enzima transcriptasa

reversa. De esta manera se busca que solo haya un producto específico de amplificación en la reacción que contiene la enzima. Para esto se usó una dilución 1/10 del cDNA obtenido y siguió un programa de amplificación similar al anterior pero con 40 ciclos en lugar de 30.

### **2.2.6. Reacciones de PCR en tiempo real**

La expresión de los determinantes de resistencia a Cu de *A. ferrooxidans*, se cuantificó utilizando la técnica de PCR en tiempo real. Se usó el sistema Corbett rotor gene 6000 (Corbett Research) y las reacciones se hicieron en tubos del tipo "Strip tube" de 0,1 mL (Corbett Research) con un volumen final de 15  $\mu$ L para cada reacción. Para cada una de las mediciones se usó 1  $\mu$ L de una dilución 1:20 de cada cDNA previamente obtenido y 1:200 para el caso del 16S *rRNA*, 0,5  $\mu$ M final de cada partidores, de 2 a 3,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 1,5  $\mu$ L de "master mix" "DNA Fast Start DNA SYBR Green I" (Roche). Para cada pareja de partidores se optimizó la temperatura de hibridación y el tiempo de extensión, de manera de obtener productos específicos de amplificación. Además el grado de especificidad se comprobó por análisis de fusión en el mismo equipo y además se visualizaron en geles de agarosa. Los análisis de fusión buscan comprobar que exista un producto único de amplificación para cada gen. Este análisis mide la fluorescencia de cada reacción a medida que aumenta la temperatura. Posteriormente, se determina la razón de cambio de la fluorescencia con la temperatura la cual se grafica en función de la temperatura.

En general, las condiciones de amplificación fueron de 10 min de desnaturalización y activación enzimática a 95°C, seguido de 30 ciclos con una desnaturalización a 95°C, 10 s de alineamiento de 57 hasta 64 °C (según cada pareja de partidores) y extensión por 10 s a 72°C.

## **2.3. Técnicas con RNA**

### **2.3.1. Extracción de RNA total**

Se extrajo el RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 utilizando una versión modificada del método de TRIzol (Invitrogen). Este reactivo es una solución de fenol ácido e isotiocianato de guanidinio propuesto como una mejora del método original de Chomczynski y Sacchi (1987). El fenol ácido permite la partición del RNA en la fase acuosa y el isotiocianato de guanidinio la denaturación de proteínas como las RNasas. Para la extracción de RNA se usaron células en fase exponencial tardía de crecimiento. Primero se colectaron las células por centrifugación a 5500 x g por 30 min a 25°C. Posteriormente, las células se lavaron una vez con una solución de agua ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH = 1,5) y posteriormente 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 400 µl de una solución de lisis celular (acetato de sodio, 0,02M pH = 5,5; SDS 0,5%; EDTA, 1 mM). A cada resuspensión celular se le agregó 1 ml de solución de TRIzol (Invitrogen) y luego se resuspendió toda la mezcla en un tubo eppendorf de 2 ml, dejándose incubar por 5 min a temperatura ambiente. Consecutivamente se agregaron 200 µl de cloroformo y se incubó nuevamente por 2 min a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 12000 x g por 15 min a 4°C y se recuperó la fase superior acuosa que contiene el RNA. Después se

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

Para eliminar la posible contaminación por DNA, el RNA se trató con 5U de DNasa libre de RNasas RQ1 (Promega) por 30 min a 30°C. Se usó un volumen final de 100 µl y se siguió el protocolo sugerido por el fabricante.

### **2.3.2. Electroforesis de RNA en geles de agarosa**

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

### **2.3.3. Cuantificación del RNA**

Para determinar la concentración del RNA se midió la  $A_{260}$  de una dilución 1:250, utilizando la relación  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg RNA/mL}$  y la pureza se determinó obteniendo la razón de  $A_{260}/A_{280}$ . Se utilizaron preparaciones de RNA con una razón  $A_{260}/A_{280} > 1,6$  según esta descrito para RNA resuspendido en agua DEPC (Wilfinger y col., 1997). La

determinación de la concentración del RNA se realizó siempre antes de la reacción de transcripción inversa.

#### **2.3.4. Transcripción inversa**

Para la obtención del cDNA en cada condición de estudio se realizó una transcripción inversa del RNA extraído. Se ocuparon 0,8 µg del RNA y 0,5 µg de hexadesoxinucleótidos al azar (Random hexamer primer de Promega). En una primera parte se incubó una mezcla de 5 µl que contiene el RNA y los partidores a 70°C por 5 min para desnaturar las estructuras secundarias del RNA y facilitar así la hibridación de los partidores. Posteriormente se incubó en hielo por 5 min donde se le agregó 15 µl de una mezcla de amortiguador ImProm-II 5x (Promega), dNTPs 0,5 mM cada uno, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 unidades de inhibidor recombinante de ribonucleasas RNasin (Promega) y 1 U de la transcriptasa reversa (TR) ImProm-II (Promega). La reacción de síntesis incluyó una incubación inicial por 10 min a 25°C para inducir la hibridación de los partidores y luego la síntesis se realizó por 1 h a 42°C para luego finalizar con un paso para lograr la desnaturación de la transcriptasa reversa por 15 min a 70°C.

#### **2.3.5. Experimentos de co-transcripción**

En el caso de los experimentos de co-transcripción se usó como molde el cDNA obtenido del RNA extraído de cultivos de *A. ferrooxidans* crecido en 5 mM de CuSO<sub>4</sub> siguiendo el mismo procedimiento explicado en el punto 2.3.4 con única diferencia de que se usaron 25 pmoles de los partidores sentido de los genes *cusA* y *copD*.

## 2.4. Métodos informáticos

### 2.4.1 Comparación informática de las secuencias analizadas

Se comparó la secuencia primaria de las posibles proteínas relacionadas con la resistencia al Cu de *A. ferrooxidans* con las proteínas que participan en la resistencia a este metal en otros microorganismos. Se obtuvieron las secuencias para *A. ferrooxidans* desde la base de datos (<http://cmr.jcvi.org/>) para cada ORF correspondiente a los genes en estudio. En el caso de *E. coli*, *E. hirae* y *P. siryngae* las secuencias se obtuvieron desde el sitio Web del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

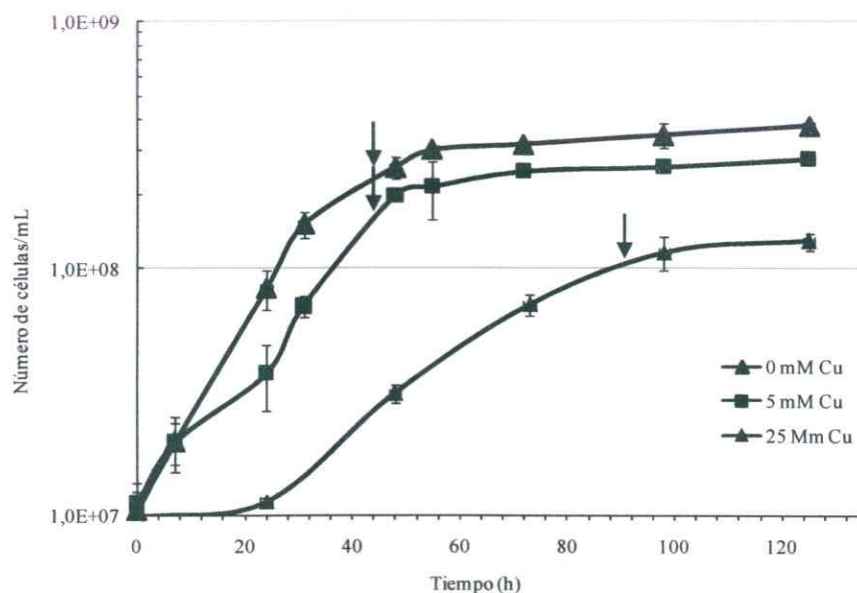
Las comparaciones de las secuencias de aminoácidos entre las distintas proteínas se realizaron a través de la herramienta “Align EMBOSS” que permite realizar alineamientos globales de las proteínas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>). De esta manera fue posible obtener los porcentajes de identidad y similitud para cada comparación.

### 3. Resultados

#### 3.1. Adaptación de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a diferentes concentraciones de Cu

*A. ferrooxidans* se adaptó al crecimiento con 5 y 25 mM de  $\text{CuSO}_4$  con el fin de estudiar la respuesta de *A. ferrooxidans* al Cu. Se consideró como “adaptado” a los cultivos que tuvieron una curva de crecimiento similar a la cepa sin adaptar. Además se comprobó la morfología de las células al microscopio. Se adoptó este procedimiento ya que en los cultivos no adaptados se observó una baja tasa de oxidación del ion ferroso y además una extendida fase de latencia durante el crecimiento.

En la figura 5 se observa la curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* para cada una de las condiciones estudiadas. Cuando se expone a 25 mM de  $\text{CuSO}_4$  hay una fase de latencia mayor y se alcanza un número menor de células que en el caso control y 5 mM del metal. Sin embargo, en todos los casos, el RNA se extrajo en la fase exponencial tardía de cada condición (flechas, Figura 5), asegurando así que las células estudiadas estuvieran en la misma fase de crecimiento.



**Figura 5.** Curva de crecimiento para los cultivos crecidos en 0, 5 y 25 mM de  $\text{CuSO}_4$ . Las curvas para cada condición se obtuvieron a través del conteo celular en una cámara Petroff-Hausser. Las flechas indican el momento de colección de las células en cada condición.

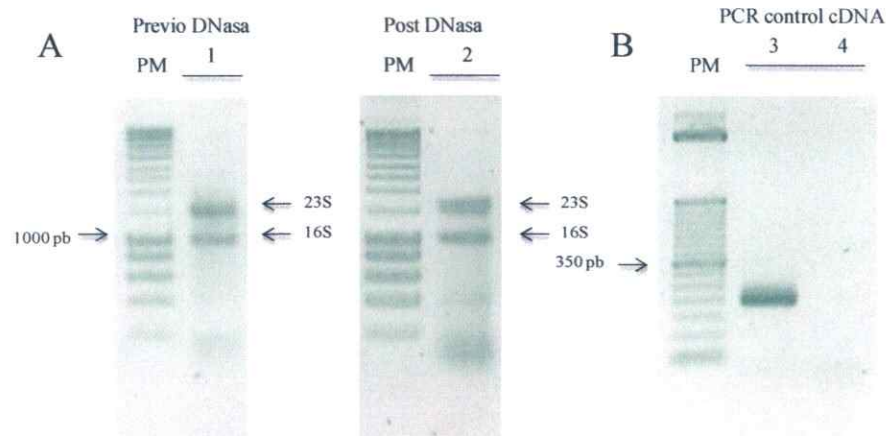
### 3.2. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

Una etapa importante desarrollada durante este seminario de título fue lograr una extracción de RNA total que permitiese obtener la calidad y cantidad adecuada para realizar los futuros análisis de PCR en tiempo real. Se implementó un método de extracción de RNA modificado del reactivo TRIzol (Invitrogen). Básicamente, se agregó un paso de lisis (SDS 0,5%, acetato de sodio 0,02M y 1 mM EDTA) previo al reactivo TRIzol.

En la figura 6 es posible evidenciar la integridad del RNA extraído desde un cultivo con 5 mM de  $\text{CuSO}_4$ . Se compara el estado del RNA previo y posterior al uso de la enzima DNasa. Posteriormente, se realizó la síntesis de cDNA con la enzima transcriptasa reversa usando el RNA correspondiente para cada condición de estudio.



Consecutivamente, se realizó la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA, con el fin de comprobar la integridad de la reacción de transcripción reversa y la posible contaminación con DNA. Sólo se evidenció un amplificado para el *16S rRNA* en el carril donde se usó la enzima transcriptasa reversa en la síntesis de cDNA (Figura 6 B).



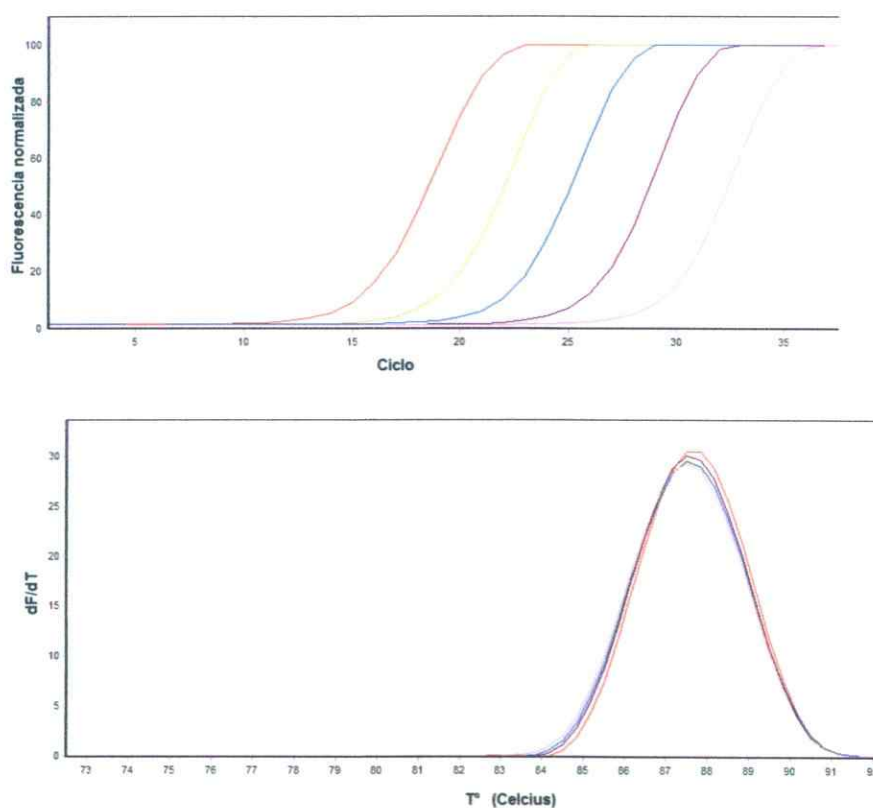
**Figura 6.** Integridad del RNA extraído previo y posterior al uso de la DNasa y prueba del cDNA por PCR. En A se presenta el RNA extraído desde células de *A. ferrooxidans* crecidas en 5 mM de  $\text{CuSO}_4$  previo (1) y posterior (2) al tratamiento con DNasa. Se utilizaron 5  $\mu\text{g}$  del estándar de peso molecular de DNA HyperLadder I (Bioline). En B se muestra el resultado del PCR para probar el cDNA y descartar la contaminación con DNA. Se usó como molde una dilución 1/10 de las reacciones de cDNA con (3) y sin (4) enzima transcriptasa reversa y se utilizaron los partidores para el gen *16S rRNA*. Se utilizaron 4  $\mu\text{g}$  del estándar de peso molecular de DNA 50 pb de Invitrogen (PM).

### 3.3. Expresión relativa de los mensajeros asociados a la resistencia al Cu de *A.*

#### *ferrooxidans*

Para medir cambios en la expresión de los posibles genes de resistencia al Cu se realizaron experimentos de PCR en tiempo real. En este seminario de título se usó la técnica de cuantificación “absoluta” o con estándares externos (Roche Technical note 11/2000) ya que como resultado final se obtiene un número de moléculas de cDNA total

y específico para cada gen de interés. Con este fin se diseñaron partidores específicos para cada gen en estudio (tabla 4, página 19). Se construyeron curvas de calibración para cada gen utilizando la misma preparación de DNA genómico de *A. ferrooxidans* como estándar y para cada pareja de partidores se optimizaron las condiciones de amplificación. Además, se comprobó que los productos de amplificación fueran únicos a través de los análisis de fusión para cada producto amplificado. De manera referencial, en la figura 7 se muestra la curvas de calibración y de fusión del gen *16S rRNA*.



**Figura 7.** Resultados de la curva de calibración del gen *16S rRNA* por PCR en tiempo real. En A se muestran los resultados de fluorescencia normalizada (en unidades arbitrarias) en cada ciclo de amplificación. Se realizaron 5 diluciones seriadas desde 10 ng hasta 1pg de DNA genómico de *A. ferrooxidans*. En B se muestra la curva de fusión para cada producto de amplificación. Esta curva se obtiene por el cambio de la fluorescencia de los productos amplificados a medida que aumenta la temperatura en la reacción. Ambas figuras se obtuvieron desde el software del termociclador Corbett rotor gene 6000.

En la tabla 5 se presentan los valores determinados de pendiente y eficiencia para cada gen analizado. Además se incluye un ejemplo de cálculo de copias relativas para el gen *16S rRNA* que se usó para normalizar las mediciones en el Anexo 2.

**Tabla 5.** Resumen de las curvas de calibración obtenidas para los genes analizados por PCR en tiempo real.

Gen	Recta			Eficiencia
	Pendiente	Intercepto	R <sup>2</sup>	
<i>afcopB</i>	-3,98	42,15	0,999	1,78
<i>afcopC</i>	-3,40	36,17	0,998	1,97
<i>afcopD</i>	-3,52	35,39	0,997	1,92
<i>afcusC</i>	-3,78	30,76	0,999	1,84
<i>afcusB</i>	-3,34	32,93	0,998	1,99
<i>afcusA</i>	-3,84	36,84	0,999	1,82
<i>afcusF</i>	-3,91	40,84	0,998	1,80
16S rRNA	-3,43	38,32	0,999	1,96

Se calculó la eficiencia de la reacción según la fórmula  $E = 10^{-\frac{1}{s}}$ , donde s es la pendiente obtenida al graficar Ct v/s log n°copias.

Los valores de Ct (Ciclo umbral al cual la amplificación comienza a ser exponencial) y el número de copias determinado para cada gen están resumidos en la tabla 6.

**Tabla 6.** Niveles de transcritos para los genes asociados con la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* mediante analisis de PCR en tiempo real. Los valores de desviación estándar se determinaron para cada gen en tres muestras biológicas por condición analizada.

Gen	sin Cu		5 mM Cu		25 mM Cu	
	CT	Número de copias	CT	Número de copias	CT	Número de copias
<i>AfcopB</i>	31,7	4,19E+02 ± 6,74E+01	24,8	2,23E+04 ± 3,97E+03	24,5	2,65E+04 ± 5,58E+03
<i>AfcopC</i>	22,5	1,79E+04 ± 2,30E+03	21,3	4,00E+04 ± 4,16E+03	20,0	1,05E+05 ± 2,24E+04
<i>AfcopD</i>	21,7	3,28E+04 ± 6,53E+03	20,6	7,65E+04 ± 1,33E+04	20,6	8,05E+04 ± 1,66E+04
<i>AfcusC</i>	20,3	5,80E+03 ± 1,36E+03	15,1	4,19E+05 ± 9,96E+04	14,7	5,90E+05 ± 4,89E+04
<i>AfcusB</i>	23,2	8,33E+02 ± 1,22E+01	17,2	5,07E+04 ± 7,75E+03	15,3	1,96E+05 ± 2,14E+04
<i>AfcusA</i>	27,1	3,45E+02 ± 4,64E+01	21,2	1,20E+04 ± 3,42E+02	20,0	2,45E+04 ± 3,49E+03
<i>AfcusF</i>	28,3	1,64E+03 ± 3,03E+02	22,2	5,73E+04 ± 1,18E+04	20,9	1,26E+05 ± 2,80E+04
16S rRNA	12,5	3,46E+07 ± 7,56E+06	12,0	4,65E+07 ± 9,29E+06	13,0	2,45E+07 ± 1,85E+06

Es posible evidenciar genes con una expresión comparativamente alta (en número de copias) en la condición control (*afcopC* y *afcopD*). En cambio, hay otros genes que presentan un nivel de expresión comparativamente bajo (*afcopB* y *afcusF*) en la condición sin Cu, pero que tienen un marcado aumento de la expresión en presencia del metal. De hecho, hay genes que presentan un marcado aumento de la expresión, alcanzando una diferencia en el número de copias de hasta 2 órdenes de magnitud en presencia de Cu (*AfcusC*)

Una visión global de los cambios de expresión se realizó al normalizar los valores de número copias determinados para cada gen con el número de copias del gen *16S rRNA* de cada condición (Tabla 7). Se muestran los valores de aumento de expresión normalizado de cada gen desde la condición sin Cu a 5 y 25 mM de Cu respectivamente y desde 5 a 25 mM de Cu. Es posible corroborar que se mantiene la misma tendencia que se observa al comparar sólo las copias obtenidas para cada gen. Comparativamente los genes *afcusC* y *afcusB* son los que presentan un mayor aumento de la expresión, seguido de *afcusF*, *afcopB* y *afcusA* que siguen un patrón similar y finalmente los genes *afcopC* y *afcusD*, presentan una menor inducción relativa.

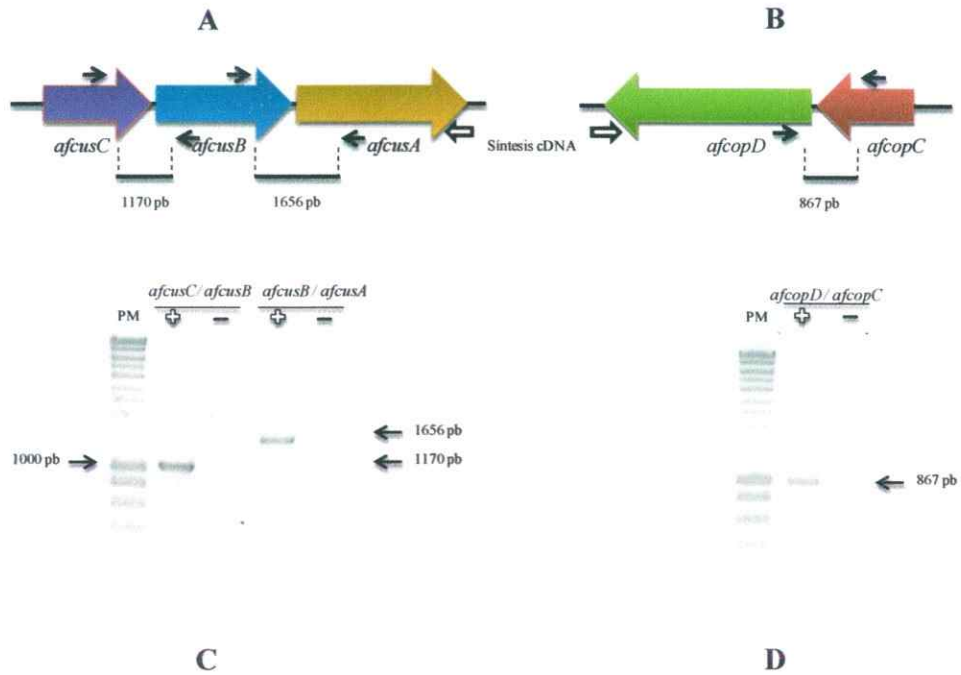
**Tabla 7.** Expresión normalizada de los posibles genes de resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Las proporciones de inducción fueron determinadas usando el valor de copias obtenidas para cada mensajero en 5 y 25 mM de Cu y el valor obtenido en la condición control.

Gen	Veces de aumento de la expresión normalizado		
	5 mM/0 mM	25mM/0mM	25mM/5mM
<i>AfcopB</i>	40	90	2
<i>AfcopC</i>	2	8	5
<i>AfcopD</i>	2	3	2
<i>AfcusC</i>	54	144	3
<i>AfcusB</i>	45	332	7
<i>AfcusA</i>	26	100	4
<i>AfcusF</i>	26	108	4
16S rRNA	1	1	1

### 3.4. Búsqueda de posibles relaciones de co-transcripción. *cusCBA* y *copCD*

Con el objetivo de investigar posibles relaciones de co-transcripción entre los grupos de genes *afcusC/afcusB/afcusA* y *afcopC/afcopD* se realizaron experimentos de RT-PCR. Se obtuvo el cDNA a partir de RNA extraído de un cultivo crecido en presencia de 5 mM de CuSO<sub>4</sub>. Posteriormente, se usaron partidores que abarcaran las regiones intergénicas entre cada par de genes (Figura 8 A y B) y se amplificaron por PCR. En la figura 8 se observan los segmentos intergénicos amplificados en cada caso.





**Figura 8.** Los grupos de genes *afcusC/afcusB/afcusA* y *afcopD/afcopC* se co-transcriben. En A y B se muestran los contextos génicos de los genes que se co-transcriben, además, se muestran los tamaños de los fragmentos intergénicos esperados. En C y D se muestran los productos de amplificación encontrados para cada fragmento. Para cada reacción se usó una dilución 1/10 del cDNA obtenido con la enzima transcriptasa reversa (+) y sin la enzima (-).

## 4. Discusión

### 4.1. Determinantes de resistencia al Cu en *A. ferrooxidans*

Si bien la búsqueda de los determinantes de resistencia al Cu en el genoma de *A. ferrooxidans* se logró por comparación con los sistemas descritos en microorganismos como *E. coli*, *E. hirae* y *P. syringae*, en *A. ferrooxidans* encontramos diferencias en cuanto a la organización genética de los distintos genes que forman parte de cada uno de los sistemas de resistencia.

En la figura 4 (Página 13) se muestra la posible organización genética del sistema tipo Cus de *A. ferrooxidans*. En esta bacteria difiere la organización de los genes del operón *cus* en comparación con la organización de estos genes en *E. coli*. La diferencia está dada por la ubicación del gen que codifica la proteína periplasmática afCusF. Este gen está en un contexto genómico distinto pero cercano y en forma divergente a la ATPasa de Cu *afcopA2*. En *E. coli*, forma parte del operon *cus* (*cusC/cusF/cusB/cusA*). Sin embargo, mediante los experimentos de RT-PCR se demostró que el sistema tipo Cus de *A. ferrooxidans* también se transcribe en forma de operon pero sin la participación de *afcusF*.

Por otra parte, fue posible encontrar un posible regulador transcripcional que tiene 32% de identidad con la proteína reguladora CueR de *E. coli* (Yamamoto y Ishihama, 2005) (N° de acceso AAK06655). En el contexto genético de este posible regulador hay una proteína relacionada con el eflujo de cadmio, zinc y cobalto, lo que sugeriría una posible relación con el metabolismo de esos metales. Pese a esto, el gen que codifica

este gen no se pudo amplificar por técnicas básicas de PCR, pues se observó un producto inespecífico de amplificación (datos no mostrados) y que posiblemente se deba a problemas técnicos del PCR o a errores en la anotación de la secuencia

Además, se encontraron diferencias en cuanto a las secuencias nucleotídicas de reconocimiento por reguladores de los sistemas de resistencia al Cu descritos para *E. coli*. Estos sitios corresponden a secuencias palindrómicas características donde se unen estas proteínas reguladoras. No se encontraron este tipo de secuencias al comparar las posibles regiones promotoras de las 3 ATPasas de Cu (*afcopA1*, *afcopA2* y *afcopB*) en el genoma de *A. ferrooxidans*. Esto concuerda con lo anteriormente expuesto, ya que al no tener un sistema de regulación similar, es evidente que no funcione de igual modo. A pesar de todo, no se descarta la posible participación de ésta u otra proteína no identificada que participe en la regulación de la expresión en *A. ferrooxidans*.

#### **4.2. Crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia de Cu**

Durante el proceso de adaptación al Cu de *A. ferrooxidans*, fue posible comprobar una extensión de la fase latencia en el crecimiento. Cuando se usó un inóculo que no había sido expuesto al Cu o que provenía de un cultivo adaptado a una concentración menor del metal, fue posible evidenciar una fase de latencia prolongada en cada caso. Esto demuestra la toxicidad del ion cúprico sobre el crecimiento de esta bacteria. No obstante, una vez terminada esta fase de latencia, se observó la oxidación del ion ferroso del medio. Das y Modak (1998) sugieren que este retraso en el crecimiento está asociado a un rearrreglo en los componentes de membrana que permitirían el crecimiento de las



células en estas condiciones. Esta idea se fortalece al observar una disminución de la latencia durante en el crecimiento cuando se realizaron repetidos subcultivos de células expuestas al metal.

#### **4.3. Extracción RNA de cultivos adaptados al crecimiento con Cu y síntesis de cDNA**

En nuestro laboratorio se estaba usando la técnica de extracción por fenol caliente (Guiliani y col., 1997) para la obtención de preparaciones de RNA total. Aunque esta técnica permite obtener buenos rendimientos en la extracción de RNA, la literatura sugiere en experimentos de PCR en tiempo real, el uso de técnicas que permitan obtener una extracción de RNA de buena calidad (Nolan y col., 2006). Es por esto que se decidió usar el reactivo de TRIzol. Sin embargo al realizar el protocolo sugerido, no fue posible obtener RNA desde cultivos de *A. ferrooxidans*, ya que no ocurría una lisis celular eficiente. Esto probablemente se deba a que en microorganismos acidófilos poseen una membrana externa compleja que les permite resistir bajos niveles de pH, entre otros mecanismos (Baker-Austin y Dopson, 2007). Fue por esta razón de que se añadió un paso de lisis celular a este protocolo con una solución con SDS 0,5% que permitió mejorar la lisis celular.

#### **4.4. Estudio de la expresión diferencial de transcritos de los determinantes de resistencia a Cu de *A. ferrooxidans* por PCR en tiempo real**

En general los resultados obtenidos a través de los experimentos de PCR en tiempo real mostraron que existe un aumento de la expresión en función de la concentración de

Cu en el medio para ciertos genes posiblemente relacionados con la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans*.

El determinante de resistencia a Cu *afcopB* de *A. ferrooxidans* ha sido propuesto bioinformáticamente como una ATPasa de influjo de Cu debido a su alta similitud con la ATPasa CopA de *E. hiriae* (Quatrini y col., 2007) con 42% de identidad y 68% de similitud. Producto del trabajo realizado en este seminario de título se evidenció que este posible determinante se induce hasta 90 veces cuando la bacteria crece en un medio con Cu. Por otra parte, mediante ensayos de funcionalidad posteriores a la realización de este seminario de título, nuestro grupo observó que al complementar con este gen una cepa de *E. coli* sensible al Cu ( $\Delta copA$ ), existe un aumento de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de esta cepa (Navarro y col., 2009). Por lo tanto, este hallazgo junto con el aumento de la transcripción de *afcopB* en presencia de Cu, sugieren que este gen estaría relacionado con el eflujo del metal hacia el espacio extracelular y no con el influjo.

Fue posible comprobar que existe una alta expresión relativa para algunos transcritos en la condición control, como por ejemplo *afcopC* y *afcopD*. Este hallazgo concuerda con estudios de proteínas periplasmáticas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 ya publicados en ausencia de Cu (Chi y col., 2007), donde afCopC resultó estar presente en este extracto proteico. En este seminario de título, mediante PCR en tiempo real fue posible evidenciar que *afcopC* presenta un leve aumento de la expresión por sobre *afcopD* en células crecidas a 25 mM de CuSO<sub>4</sub> (8,3 y 3,5 respectivamente), sugiriendo que afCopC podría actuar en la resistencia al cobre como una chaperona de Cu.

Trabajo previo realizado por nuestro grupo mediante "Northern Blot" reveló que los grupos de genes *afcusC/afcusB/afcusA* y *afcopC/afcopD* se expresan como un mRNA de un tamaño cercano al que teóricamente suman cada conjunto de genes (Tesis doctoral Navarro, 2009). En este seminario de título mediante ensayos de RT-PCR se logró la amplificación de un fragmento que corresponde al tamaño predicho para las regiones entre estos genes. Teniendo en consideración ambos resultados, resulta claro pensar que los genes que codifican a afCopC y afCopD forman parte de una misma unidad transcripcional. Sin embargo, en la actualidad es desconocido el mecanismo exacto por el cual ambas proteínas interactúan (Magnami y Solioz, 2007; Puigs y Rees, 2002). Resulta interesante además el hecho que estos determinantes residan en el cromosoma de este acidófilo y no en plásmidos como se ha descrito en *P. syringae*.

En *E. coli* se ha descrito el sistema de eflujo de Cu *cus* codificado en el genoma de esta bacteria (Outen y col., 2001). Se ha descrito que esta vía de eflujo se activa en condiciones aeróbicas solo cuando existe alta concentración de Cu externo, mientras que en condiciones anaeróbicas este sistema se activa a baja concentración externa del metal. Se ha sugerido que en *E. coli* este sistema sería independiente a la acción del sistema de oxidasas de Cu (CueO). Es decir, existe una expresión diferencial de estos componentes según la disponibilidad de oxígeno y concentración de cobre externo. De hecho, se ha visto que en una situación de anaerobiosis la oxidación del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por CueO está reprimida debido a la carencia del oxígeno molecular necesario para completar la reacción de oxidación. En este caso la expresión del sistema *cus* se activa a bajos niveles de Cu citoplasmático, siendo una pieza clave en la destoxificación de Cu para *E. coli* en

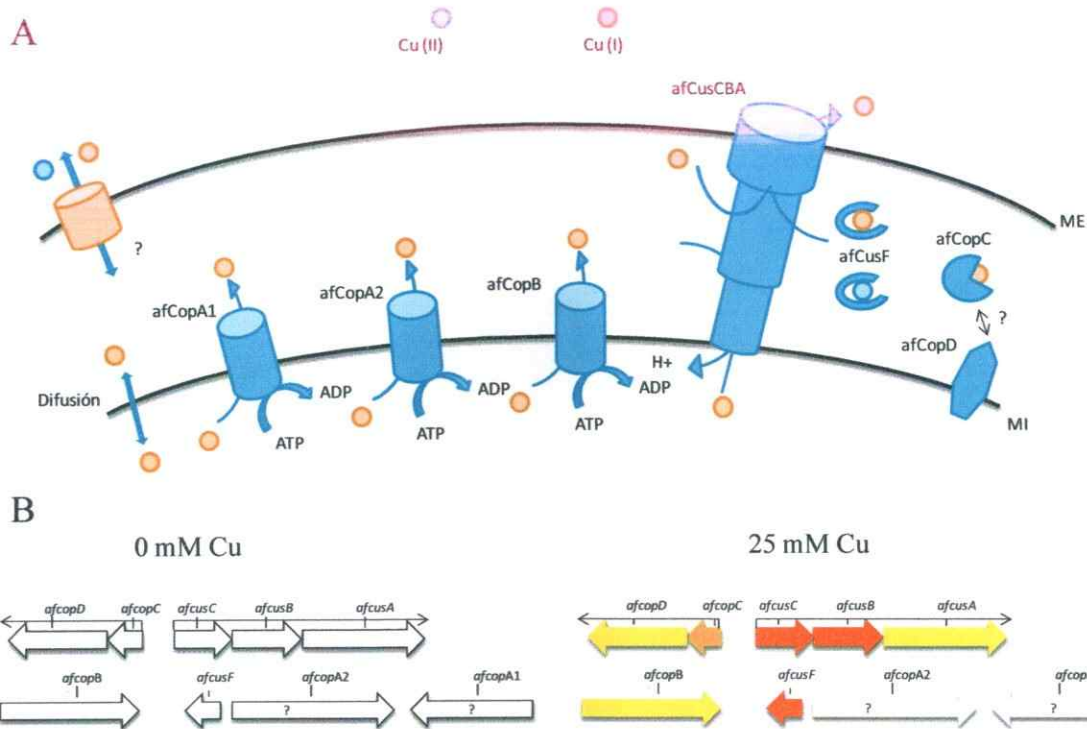
anaeróbiosis. En *A. ferrooxidans*, no se han descrito a la fecha proteínas o algún ORF que permita inferir la existencia de una posible oxidasa de Cu. Este hecho le daría una mayor importancia al sistema *cus* en la resistencia a Cu. Esta idea surge tras la alta expresión que presentan los mensajeros del sistema *cus* cuando *A. ferrooxidans* se crece en un medio con Cu. Por otro lado, también en este seminario de título se comprobó que estos genes forman parte de una unidad transcripcional, ya que al igual que para el par *afcopD/afcopC*, mediante ensayos de RT-PCR fue posible la amplificación de fragmentos intergénicos entre estos genes. Teniendo esto en consideración, resulta interesante resaltar el hecho de las diferencias en los niveles de transcripción de estos genes medidos a través de los experimentos de PCR en tiempo real. Es probable que estos genes tengan una regulación interna debido a promotores internos o secuencias que permitan la regulación a través de distintas proteínas. Diferencias en la expresión de genes que se ubican en un mismo RNA policistrónico se han reportado para distintos microorganismos (Laing y col., 2006). Por otra parte también se ha propuesto que en transcritos policistrónicos de mRNA existen elementos en la estructura primaria de estas moléculas que inducen la estabilización o desestabilización de estos mRNA y que tienen como fin generar diferencias en la estequiometría de las proteínas que codifican dentro de complejos proteicos. En consecuencia, cambia la vida media de estas moléculas y la disponibilidad de los mensajeros que forman parte del transcrito, lo que se traduce en una distinta cantidad molar de las proteínas que serán traducidas (Rauhut y Klug, 1999).

Finalmente, para el caso de las posibles ATPasas de Cu *afcopA1* y *afcopA2* no se realizaron mediciones de los niveles de transcritos por PCR en tiempo real ya que entre

ellas presentan una identidad del 94,5% a nivel nucleotídico, lo que hace difícil diseñar partidores específicos para diferenciar la expresión de cada ATPasa (Luo y col., 2008). Sin embargo, en este trabajo se reportó que *afcopA2* podría tener una mayor importancia en la resistencia al Cu. Este grupo encontró mediante la técnica de RFLP-PCR que cuando *A. ferrooxidans* es crecido con hierro como fuente de energía y con Cu en el medio, *afcopA2* (AFE0329) se expresa comparativamente en una mayor proporción que *afcopA1* (AFE0663), sugiriendo de esta forma que el primer gen tendría un rol de mayor importancia en la resistencia al Cu.

#### **4.5. Posible sistema de resistencia al Cu en *A. ferrooxidans***

Los resultados previamente presentados sugieren fuertemente que los posibles determinantes de resistencia al Cu encontrados en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 estarían relacionados con la resistencia a este metal. Es probable que la alta resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* se deba a sistemas de eflujo del metal desde el espacio intracelular hacia el extracelular mediados por ATPasas y un sistema de eflujo de Cu. Por otro lado, pareciera ser que en el espacio periplasmático también hay un sistema de secuestro del Cu a través de chaperonas de Cu como *afCusF* y *afCopC*. Teniendo en consideración los resultados obtenidos durante el desarrollo de este seminario de título se propone el siguiente modelo para la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Figura 9).



**Figura 9.** Posible sistema de resistencia y homeostasis del Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En A, la entrada de Cu al espacio periplasmático sería a través de sistemas no específicos. Acá el metal se podría unir a las chaperonas de Cu afCopC o afCusF. Esta última proteína sería capaz de transferir el Cu unido al sistema Cus. El Cu que llega hasta el citoplasma sería llevado hasta el periplasma por acción de las ATPasas de Cu afCopA1, afCopA2 y afCopB. Alternativamente, el Cu podría ir hasta el espacio extracelular por el sistema de eflujo Cus. En B, se muestran los perfiles de expresión de los determinantes de resistencia estudiados. Los colores indican los cambios en la inducción a 25 mM de CuSO<sub>4</sub> de los determinantes de resistencia al Cu. Las flechas negras indican co-transcripción. En gris se muestran las ATPasas de cobre *afcopA1* y *afcopA2* que no fueron estudiadas por experimentos de PCR en tiempo real, pero que formarían parte del sistema de resistencia al cobre en *A. ferrooxidans*.

Aun teniendo estos antecedentes en consideración, es probable que este acidófilo cuente con mecanismos no tradicionales que le permitan desarrollarse en tan comparativamente altas concentraciones de Cu, ya que los sistemas estudiados durante este seminario de título sólo son capaces de otorgar resistencia a bajas concentraciones del metal a otros microorganismos. Planteado de esta manera, resulta evidente pensar que esta bacteria posea mecanismos alternativos que la hagan tan resistente al Cu. En este sentido se ha propuesto que los polifosfatos podrían participar en la resistencia al

Cu de este acidófilo. Álvarez y Jerez (2004) reportaron que cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crece en presencia de Cu en el medio existe degradación de polifosfatos por la enzima exopolifosfatasa (PPX) generando monómeros de fosfato inorgánico. Éstos se unirían al metal y serían bombeados fuera de la célula a través de transportadores metal-fosfato tal como se ha propuesto para *E. coli*. Este fenómeno también se ha observado en la arquea *Sulfolobus metallicus* (Remonsellez y col., 2006). Este acidófilo, al igual que *A. ferrooxidans*, pueden resistir elevadas concentraciones de Cu y acumular polifosfatos. También resultaría interesante investigar si algunos de los genes en *A. ferrooxidans* presentan inducción de su expresión cuando *A. ferrooxidans* se expone al Cu.

Futuros experimentos deben esclarecer la posible relación de los polifosfatos en la resistencia al Cu y así como también la confirmación y búsqueda de posibles nuevos determinantes de resistencia a través del estudio de los cambios que suceden a nivel de la expresión de RNA y proteínas cuando este acidófilo crece en presencia de Cu.

## 5. Conclusiones

Se obtuvo cultivos adaptados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 para el crecimiento en 5 y 25 mM de CuSO<sub>4</sub> en el medio a través de sucesivos subcultivos. Estos cultivos presentaron una curva de crecimiento similar a la condición sin Cu.

Se desarrolló un protocolo mejorado para la extracción de RNA usando el reactivo TRIzol en células de *A. ferrooxidans*. Esta mejora se logró realizando una lisis celular previa al uso del TRIzol con una solución de SDS al 0,5%, Tris HCl 1mM y acetato de sodio.

Se comprobó que los grupos de genes *afcusC/afcusB/afcusA* y *afcopC/afcopD* se co-transcriben.

Mediante PCR en tiempo real se evidenció por primera vez el aumento de la expresión de genes propuestos como participantes en la resistencia al Cu en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Los genes del sistema tipo Cus presentaron el mayor aumento de la expresión a 25 mM de Cu, llegando a 330 veces por sobre el control para el caso de *afcusB*, 143 veces para *afcusC*, 100 veces para *afCusA* y 108 veces para *afcusF*. La ATPasa de Cu *afcopB* alcanzó un aumento de 90 veces por sobre el control, mientras que *afcopC* y *afcopD* alcanzaron una inducción de 8 y 3 veces respectivamente.



## 6. Referencias

- Argüello, J.M., Eren, E. y González-Guerrero, M. 2007. The structure and function of heavy metal transport P<sub>1B</sub>-ATPases. *Biometals* **20**:233-248.
- Álvarez, S. y Jerez, C.A. 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5177-5182.
- Baker-Austin, C. y Dopson, M. 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**:165-171.
- Chi, A., Valenzuela, L., Beard, S., Mackey, A.J., Shabanowitz, J., Hunt D.F. y Jerez, C.A. 2007. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Mol. Cell. Proteomics.* **6**:2239-2251
- Chisholm, I., Leduc, L. y Ferroni, G. 1998. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie Leeuwenhoek.* **73**:245-254.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**:156-159
- Das, A. y Modak, J.M. 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**: 215-222.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R, y Bond, P.L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organism. *Microbiology* **149**:1959-1970.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C. y Nies, D.H. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **13**:3804-3812.

- Guiliani, N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M. y Bonnefoy, V. 1997. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143**: 2179-2187.
- Harvey, P. I. y Crundwell, F. K. 1996. The effect of As (III) on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* in an electrolytic cell under controlled redox potential. *Min Eng* **9**:1059-1068.
- Huber, G. y Stetter K.O. 1991. *Sulfolobus metallicus*, sp. Nov., a novel strictly chemolithoautotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *System. Appl. Microbiol.* **14**:472-378
- Johnson, D.B, y Hallberg, K.B. 2003. The microbiology of acidic waters. *Res. Microbiol.* **154**:466-473.
- Keasling, J.D. 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. New York Acad. Sci.* **829**:242-249.
- Laing, E., Mersinias, V., Smith, C.P. y Simon, J.H. 2006. Analysis of gene expression in operon of *Streptomyces coelicolor*. *Genome Biol.* **7**:r46
- Luo, Y., Liu, C., Zhang, H., Luo, H. Guan, H., Liao, G., Qiu, G. y Liu, X. 2008. Insights into two high homogenous genes involved in Cu homeostasis in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr. Microbiol.* **57**:274-280.
- Navarro, C. 2009. Determinantes de resistencia al cobre en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Tesis Doctoral. USACH.
- Navarro, C., Orellana, L.H., Mauriaca, C. y Jerez, C.A. 2009. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:6102-6109.

- Nies, D.H. 2000. Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles* 4:77-82.
- Nies, D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730-750.
- Nolan, T., Hands, R.E. y Bustin, S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocol* 3:1559-1582.
- Magnani, D. y Solioz, M. 2007. How bacteria handle copper. Nies, D., Silver (Eds). *Molecular microbiology of heavy metals*. 259-285. Springerlink Verlag, Berlín.
- Outten, W.F., Huffman, D.L., Hale, J.A. y O'Halloran T.V. 2001. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Bio. Chem* 33: 30670-30677
- Paulino, L.C., De Mello, M.P. y Ottoboni, L.M. 2002. Differential gene expression in response to Cu in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis* 23:520-527.
- Puig, S. y Rees, E.R. 2002. The ABCDSs of periplasmic copper trafficking. *Structure.* 10:1292-1295.
- Quatrini, R., Lefimil, C., Veloso, F., Pedroso, I., Holmes, D.S. y Jedlicki, E. 2007. Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Nucleic Acid Res.* 35:2153-2166.
- Rauhut, R., y Klug, G. 1999. mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. rev.* 23:353-370.
- Rensing, C. y Grass, G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of Cu homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. rev.* 27:197-213.

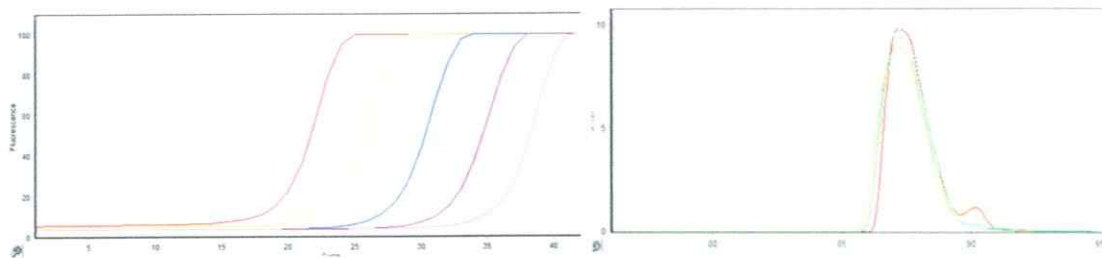
- Remonsellez, F., Orell, A. y Jerez, C.A. 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archeon *Sulfolobus metallicus*: posible role of the polyphosphate metabolism. *Microbiology* **152**:59-66.
- Roche molecular biochemicals. Absolute quantification with external standards. Roche Technical Note LC 11/2000.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. y Sand, W. 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:239-248.
- Solioz, M. y Stoyanov, J.V. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. rev.* **27**:183-195.
- Stoyanov, J.V., Hobman, J.L. y Brown, N.L. 2001. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the Cu exporter CopA. *Mol. Microbiol.* **39**:502-511.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. y Jerez, C.A. 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* **24**:197-211.
- Van Veen, H.W. 1997. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**: 299-315.
- Wilfinger, WW., Mackey, K. y Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**:474-481.
- Yamamoto, K. y Ishihama, A. 2005. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.* **56**:215-227

## 7. Material suplementario.

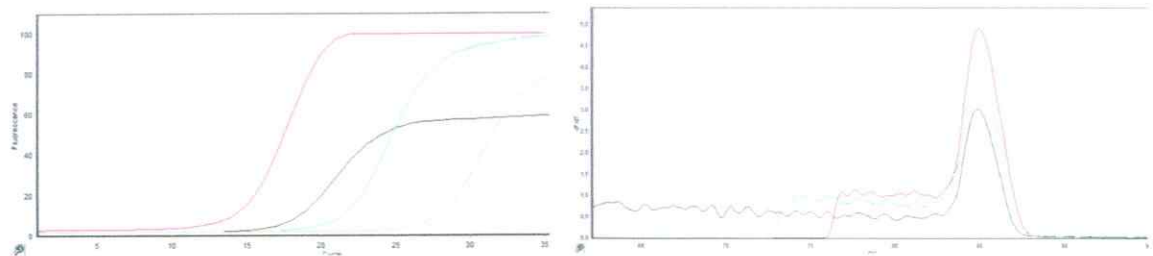
### Anexo 1

Cuantificación de los niveles de transcritos relativos al *16S rRNA* mediante PCR en tiempo real.

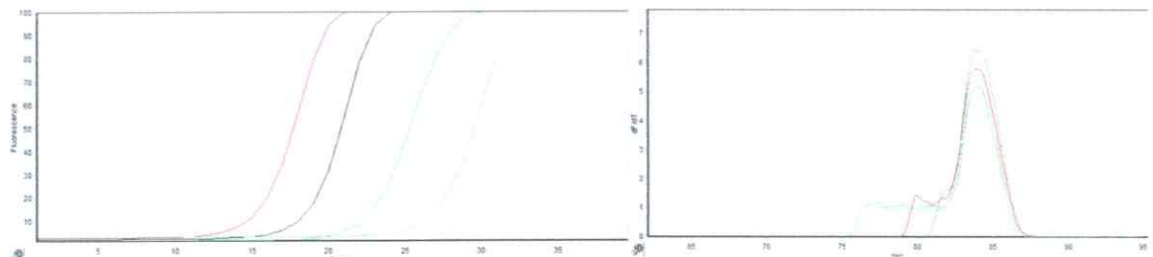
*afcopB*



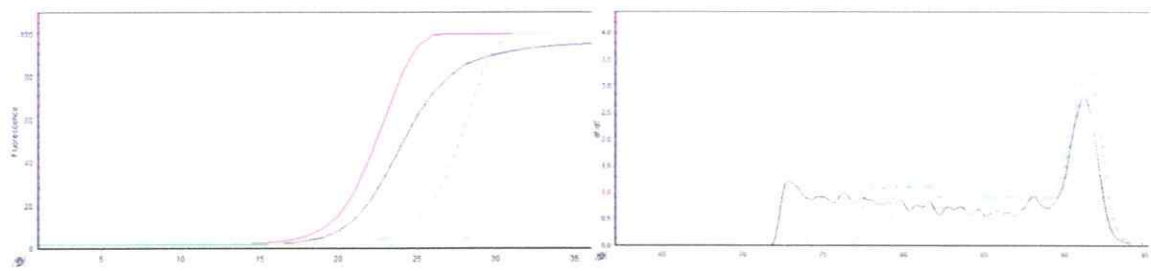
*afcopC*



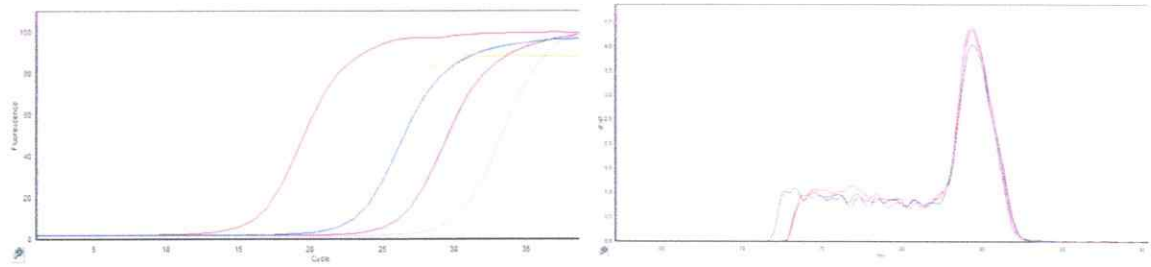
*afcopD*



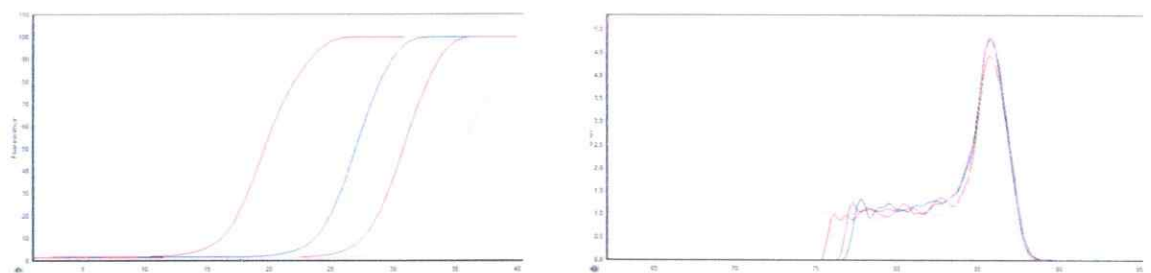
*afcusC*



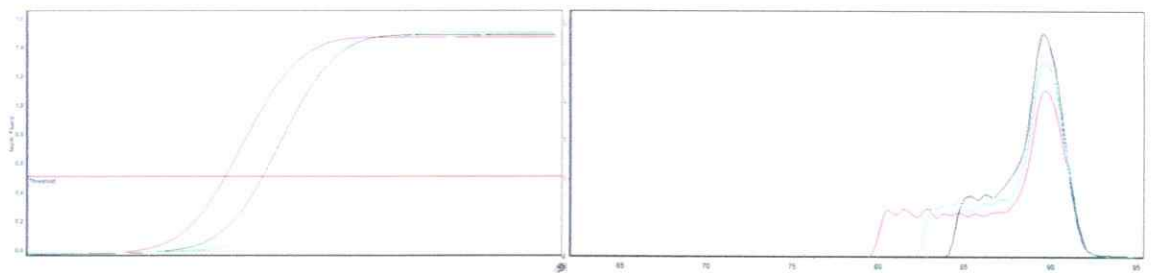
***afcusB***



***afcusA***



***afcusF***



**Figura A1.** Curvas de calibración para los genes estudiados por PCR en tiempo real. Se muestra la fluorescencia obtenida para las diluciones de DNA utilizadas en la realización de la curva de calibración. Además se muestra la curva de fusión para cada caso.

## Anexo 2

### Ejemplo de cálculos realizados en la determinación de número de copia para los genes estudiados.

#### I. Cálculo de los niveles de mRNA relativos del gen 16S rRNA.

Primero es necesario determinar el número de copias presentes en cada dilución de DNA genómico. Teniendo en cuenta que para *A. ferrooxidans* el peso molecular del genoma es

$$P. M = 1,97 \times 10^9 \frac{\text{gramos}}{\text{mol}}$$

Usando el número de Avogadro, esto equivale a tener

$$3,27 \times 10^{-15} \frac{\text{gramos}}{\text{genoma}}$$

Esta equivalencia nos permite determinar el número de “genomas” presentes en una masa determinada de moléculas de DNA.

Por ejemplo:

En 1 ul de una dilución de DNA  $30 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}$ ,

hay 30 ng que corresponden a  $9,17 \times 10^6$  genomas

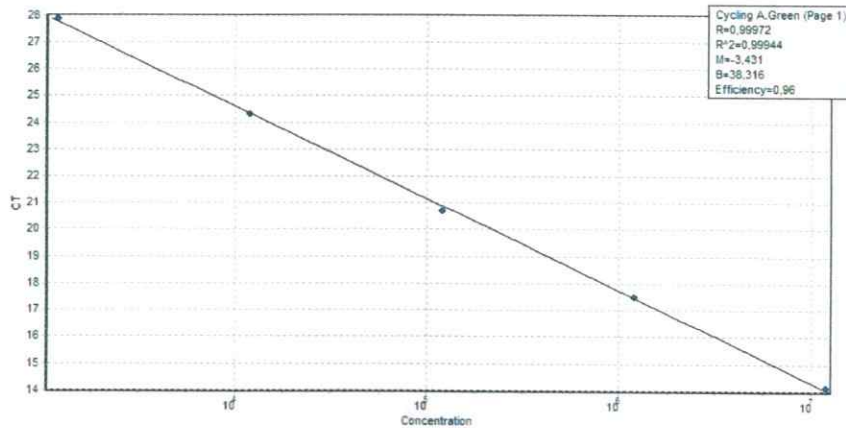
Este número de genomas corresponde al mismo número de copias para un gen que tenga solo una copia en el genoma. Esta aseveración es válida cuando se amplifica un producto específico de un gen presente en una dilución del DNA.

Este procedimiento se utilizó para la determinación del número de copias en 5 diluciones seriadas, desde 10 ng hasta 1 pg de DNA genómico de *A. ferrooxidans* a partir de las cuales se realizaron las curvas de calibración para cada gen analizado. Sabiendo la masa de DNA utilizada en cada dilución es posible, por lo tanto, determinar

el número de copias presentes en cada reacción. Esta fue la lógica utilizada para la realización de las curvas de calibración de este trabajo.

En el caso del gen *16S rRNA*: tiene 2 copias en el genoma, por lo tanto, en un 1 uL de una dilución de 30 ng/ $\mu$ L de DNA, existen  $1,83 \times 10^7$  copias del gen *16S rRNA*.

Usando la ecuación obtenida para el gen *16S rRNA* es posible determinar el número de copias en las tres condiciones estudiadas:



**Figura A2.** Curva de calibración obtenida para el *16S rRNA* Se realizaron 5 diluciones seriadas y se usó un rango desde 10 ng hasta 1 pg de DNA genómico de *A. ferrooxidans*. Figura obtenida desde el software Corbett rotor gene 6000.

$$Ct(0 \text{ mM Cu}) = 12,5$$

$$Ct(5 \text{ mM Cu}) = 12$$

$$Ct(25 \text{ mM Cu}) = 13$$

Utilizando la curva de calibración para este gen y los valores de Ct obtenidos se tienen:

$$\log(\text{copias}) = \frac{Ct - B}{-3,431}$$

$$\log(\text{copias})(0 \text{ mM Cu}) = 7,52 \rightarrow 3,3 \times 10^7 \text{ copias}$$

$$\log(\text{copias})(5 \text{ mM Cu}) = 7,67 \rightarrow 4,6 \times 10^7 \text{ copias}$$

$$\log(\text{copias})(25 \text{ mM Cu}) = 7,39 \rightarrow 2,46 \times 10^7 \text{ copias}$$