

UCH - FC
Biotecnología
C355
C.1



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias

**Estudio de la participación del motivo estructural [β 4-lazo- α 6] en
la especificidad de sustrato de la sintasa de homoserinas
lactonas aciladas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Afel**

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

Matías Esteban Castro González

Director de Tesis

Dr. Nicolas Guiliani Guerin

Laboratorio de Comunicación Bacteriana,
Departamento de Biología, Facultad de Ciencias

Diciembre, 2009

Santiago-Chile





INFORME DE APROBACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

“Estudio de la participación del motivo estructural [β 4-lazo- α 6] en la especificidad de sustrato de la sintasa de homoserinas lactonas aciladas de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Afel”

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

MATÍAS ESTEBAN CASTRO GONZÁLEZ

Dr. Nicolas Guilliani Guerin
Director del Seminario

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

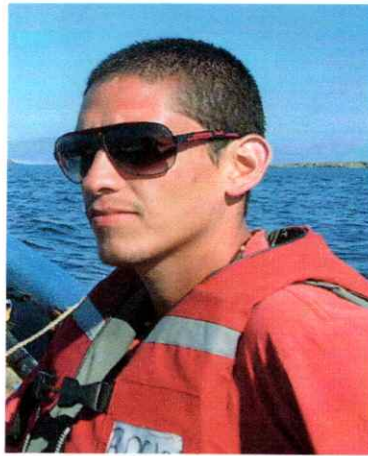
Dr. Marcelo Enrique Baeza Cancino
Presidente Comisión

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal. A la derecha de la firma se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.

Dr. Sergio Álvarez Armijo
Evaluador

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago, Diciembre de 2009



Nací el día 28 de Diciembre del año 1981. Creo que mis primeros recuerdos son de “pelotear” en calles de la comuna La Florida, Santiago. Ahí vivía mi abuela Irma, donde pasé muchos días de verano “manguereandome” en su patio, levantando pastelones de cemento para observar los insectos que vivían bajo él y comiendo mucha sandía. De un momento a otro en mi vida apareció Simón, mi hermano. Llegó en el mejor momento, fue el pilar fundamental para soportar tiempos muy duros y desde entonces es que recorre su vida salvando la mía.

Estudí prácticamente toda la enseñanza básica y escolar en el colegio Notre Dame, un pequeño castillo donde más que cualquier otra cosa aprendí enfrentar la vida de forma verdadera, bondadosa, fraterna y musical. Hice grandes amigos, muchos de los cuales seguimos compartiendo pichangas, cicletadas y asados hasta el día de hoy. Si bien el infinito amor que siento por la naturaleza fue inculcado por mi padre, fue mi profesor de química, Javier Guzmán, quien logró abrir esa caprichosa ventana hacia la molecularidad. Así fue como el año 2001 ingresé a la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular, periodo que con altos y bajos ha sido, sin duda, la época más feliz de mi vida.

Para Martín



Agradecimientos

A mi hijo Martín por alegrarme, por sorprenderme y por cuestionar esencialmente todo.

A mi padre Armando por haberme dado desde siempre las alas de la libertad y por ser un ejemplo de valentía.

A mi madre por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermano Simón por su eterna compañía.

A mis maestros de la vida Joel Arias y Álvaro Banderas por siempre darme el valor a intentarlo.

A mis amigos Mario Sanhueza y Fernando Pagliai por su ayuda dentro y fuera de la cancha.

A Nicolas Guiliani por la confianza que siempre me otorgó en su laboratorio.

Al Proyecto Fondecyt 1040676 por financiar este seminario de título.



Índice General



Índice General.....	i
Índice de figuras.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Lista de abreviaturas.....	v
Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 Quorum Sensing AI-1.....	5
1.1.1 Las tres familias de sintasas de AHLs.....	6
1.1.2 Síntesis de AHLs por proteínas I.....	7
1.1.3 Análisis funcional de proteínas I.....	9
1.2 QS en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	13
2. Planteamiento del estudio.....	15
2.1 Hipótesis.....	18
2.2 Objetivo General.....	18
2.3 Objetivos Específicos.....	18
3. Metodología.....	19
3.1 Cepas y plasmidios.....	19
3.2 Mutaciones sitio-dirigidas independientes de ligasa.....	19
3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	23
3.4 Transformación.....	24
3.5 PCR en Colonias.....	25
3.6 Extracción de DNA plasmidial.....	25

3.7	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	26
3.8	Detección de AHLs.....	27
3.8.1	Extracción orgánica de AHLs.....	27
3.8.2	Separación de la Extracción Orgánica por Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	27
3.8.3	Ensayo Biosensor.....	28
4.	Resultados.....	29
4.1	Reducción del tamaño del bolsillo [β 4-lazo- α 6]	30
4.2	Sustitución del lazo perteneciente al motivo [β 4-lazo- α 6] de Afel por el de otras sintasas.....	35
5.	Discusión.....	38
6.	Conclusiones.....	48
7.	Referencias.....	49



Índice de Figuras



Figura 1. Sistema de QS tipo al- en bacterias Gram-negativas.....	5
Figura 2. Estructura de AHLs producidas por diferentes bacterias Gram-negativas.....	8
Figura 3. Esquema de la reacción de síntesis de AHLs.	9
Figura 4. Estructuras de Esal de <i>P. stewartii</i> y LasI de <i>P. aeruginosa</i>	11
Figura 5. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de Afel, LasI ,ExpI, Esal y RhII.....	16
Figura 6. “Docking” realizado con C14 y SAM sobre Afel	17
Figura 7. Principio molecular de la mutagenesis dirigida independiente de ligasa (SLIM).	20
Figura 8. Modelos estructurales de las distintas mutantes de delección.....	31
Figura 9. SDS-page de los extractos totales de las proteínas de la cepa de <i>E. coli</i> que sobreexpresan los diferentes plasmidios T7/NT-TOPO Afel _m (1-16).....	32
Figura 10. Ensayos de CCF para los extractos de AHLs de producidos por los distintos mutantes de Afel revelados con el biosensor <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4).	33
Figura 11. Modelos estructurales de las distintas mutantes de sustitución.....	35
Figura 12. Similitud estructural entre el bolsillo de unión a acil-CoA en la N-miristoil-transferasa de <i>Candida albicans</i> y el sitioI de Afel.....	37
Figura 13. Modelo propuesto para la interacción entre acil-ACPs y Afel.....	47

Índice de Tablas

Tabla 1. Partidores utilizados para generar las mutaciones de delección sobre el gen <i>afei</i>	21
Tabla 2. Partidores utilizados para generar las mutaciones de sustitución sobre el gen <i>afei</i>	22
Tabla 3. Partidores utilizados para la reacción de PCR en colonias.....	26
Tabla 4. Aminoácidos escindidos en las distintas mutantes de escisión.....	29
Tabla 5. Aminoácidos reemplazados en las distintas mutantes de sustitución.	30



Lista de Abreviaciones

ABm:	Medio <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACP:	Proteína Transportadora de grupos Acilo
AHL:	Homoserina Lactona Acilada ("Acyl Homoserine Lactone")
AI:	Autoinductor
CCF:	Cromatografía en capa fina
CoA:	Coenzima A
DCM:	Dicloro Metano
DMSO:	Dimetilsulfóxido
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético
HSL:	Homoserina Lactona
IPTG:	Isopropyl- β -D-tiogalactopiranosido
LB:	Medio Luria Bertani
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QS:	Quorum Sensing
RISC:	Compuestos Inorgánicos Reducidos de Azufre
SAM:	S-adenosil Metionina
SLIM:	Mutagenesis Sitiodirigida independiente de Ligasa
TAE:	Amortiguador Tris Acetato EDTA
X-GAL:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

Resumen

La síntesis y detección de homoserina lactona acilada (AHL) permiten que diversos tipos de bacterias desarrollen un sistema de comunicación llamado "quorum sensing" (QS). Las bacterias son capaces de responder a AHLs específicas, cuya estructura depende de los sustratos involucrados en su síntesis. El QS participa en la regulación de importantes procesos fisiológicos que pueden determinar el estado de diferenciación de la bacteria y el comportamiento de su población. Esto hace que la comprensión del QS a nivel molecular sea importante en el desarrollo de estrategias para "manipular" el comportamiento de microorganismos. Las sintasas de AHLs catalizan la lactonización de S-adenosil-metionina (SAM) y su acilación por la proteína transportadora de grupos acilo acilada (acil-ACP), sustrato que determina la estructura de la molécula. El mecanismo por el cual la sintasa de AHLs selecciona como sustrato a ACPs que portan diferentes grupos acilo no ha sido aclarado por completo. En este trabajo, mediante experimentos de "docking", modelamiento molecular y mutaciones sitio-dirigidas de la sintasa de AHLs de *A. ferrooxidans*, Afel, se ha estudiado la participación del motivo estructural [β 4-lazo- α 6] en la selección de acil-ACPs. Utilizando la técnica de mutación SLIM dirigida sobre Afel se construyeron 8 mutantes de escisión y 8 mutantes de sustitución. Se analizó el efecto que tiene cada mutación sobre el patrón AHLs sintetizadas en *E. coli*. Los resultados revelan que escisiones de aminoácidos en el lazo ubicado entre la hoja β 4 y la hélice α 6 influyen en el repertorio de las AHLs sintetizadas, disminuyendo la producción de AHLs de cadena acilo largas y, posiblemente, aumentando las AHLs de cadena mediana y corta, en acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo. Las sustituciones del motivo estructural [β 4-lazo- α 6] de Afel por los de otras proteínas resultan en la producción de AHLs con un largo de cadena acilo semejante a la descrita en la literatura para estas sintasas. Este trabajo sugiere que la disponibilidad espacial entre las estructuras β 4 y α 6 es importante para la selección de la longitud de la cadena acilo que transporta el sustrato acil-ACP en la reacción de síntesis de AHLs.

Abstract

Synthesis and detection of acyl homoserine lactones (AHLs) by diverse types of bacteria allows the development of a communication system called quorum sensing (QS). Bacteria are able to answer to specific AHLs whose structure depends on the substrates involved in their synthesis. QS is involved in regulation of significant physiologic processes which can regulate bacterial differentiation state and bacterial multicellular behavior. For this reason, the understanding of QS at molecular level is important for development of strategies to manipulate microorganisms behavior. AHLs synthases catalyze S-adenosyl-methionine (SAM) lactonization and their acylation by acyl chain from the acyl carrier protein (acyl-ACP), the key substrate for the structural specificity of AHLs. The mechanism by which AHLs synthase selects acyl-ACPs with different acyl chains has not been completely clarified yet. By docking, molecular modeling and site-directed mutagenesis of AHLs synthase of *A. ferrooxidans*, Afel, we studied the participation of [β 4-loop- α 6] structural motif in the acyl-ACP selection. By using SLIM technique, 8 deletion and 8 substitution mutants were generated. Deletions of amino acids located in the loop among β 4 sheet and α 6 helix modify the AHLs repertoire, decreasing the production of AHLs with long acyl chain and possibly increasing the AHLs with medium and short acyl chain. Aminoacid substitutions in the [β 4-loop- α 6] Afel motif for those of other I proteins drive to AHLs production with an acyl chain similar to those described in the literature for these synthases. This work suggests that the available space among the β 4 sheet and α 6 helix are important in order to select the longitude of the acyl chain of acyl-ACP in AHLs synthesis reaction.

1. Introducción

El "Quorum Sensing" (QS) es el tipo de comunicación bacteriana que involucra la producción, secreción y detección de señales químicas llamadas autoinductores (AIs). Generalmente, la detección de estas moléculas ocurre de manera dependiente de la densidad celular, lo que permite que grandes grupos de células puedan adoptar determinadas conductas coordinadamente (Winans y Bassler, 2002). De manera global, el QS controla la fisiología de la población bacteriana mediante la sincronización de la expresión génica, lo que permite el desarrollo de fenotipos como bioluminiscencia, conjugación, motilidad, producción de factores de virulencia y formación de biopelículas entre otros (Lazdunski y col., 2004).

El mecanismo general del QS comprende la síntesis de AIs al interior de la célula y su liberación al medio extracelular. Aquí, la concentración de AI aumenta concomitantemente con el crecimiento de la población bacteriana, alcanzando niveles detectables por las células. Numerosos estudios en distintos microorganismos han permitido identificar distintos tipos de QS dependiendo de la naturaleza del AI y los distintos elementos moleculares involucrados en la transducción de la señal.

La molécula autoinductora utilizada por bacterias Gram-positivas es un oligopéptido. Este tipo de AI es sintetizado como un péptido precursor, el cual es procesado por exportadores específicos de membrana al momento de ser liberado hacia el medio extracelular. Además, muchos de estos péptidos pueden sufrir otros procesos postraduccionales tales como la formación de anillos de tiolactona. La transducción de la señal ocurre a través de un sistema de dos componentes, en el cual el AI es reconocido por un sensor histidina quinasa de membrana y la información de esta unión es transmitida hacia la célula a través de fosforilaciones de

proteínas regulatorias que finalmente se unen a promotores de genes blanco, permitiendo la regulación de la expresión génica (Taga y Bassler, 2003).

Existe un sistema híbrido de QS que involucra tres tipos de AIs. Para cada AI existe un receptor de membrana específico que detecta la señal, de manera que el sistema puede ser activado independientemente por cada una. Sin embargo, los tres tipos de receptores utilizan la misma vía de transducción, convergiendo en la regulación de un solo fenotipo. El AI denominado autoinductor tipo 2 (AI-2), consiste en un derivado de la molécula 4,5-dihidroxi-2,3-pentonadiona (DPD) (Chen y col., 2002). El sistema basado en AI-2 está ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. La producción de AI-2 y su influencia en la regulación de genes blanco ha sido demostrada en numerosas especies bacterianas. Además, el gen que codifica para la sintasa del AI-2, *luxS*, está presente en cerca de la mitad de los genomas bacterianos secuenciados, por lo que el AI-2 es considerado como una señal de comunicación interespecie (Waters y Bassler, 2005). El segundo tipo de AI es denominado CAI-1 y su estructura molecular, correspondiente a una α -hidroxicetona 3-hidroxitridecan-4-ona, ha sido descrita recientemente (Higgins y col., 2007). El tercer tipo de AI es una molécula de homoserina lactona acilada (AHL), las cuales también son utilizadas como AIs en el sistema de QS mejor caracterizado hasta la fecha, el QS tipo AI-1.

El QS tipo AI-1 es utilizado por bacterias Gram-negativas, involucra la producción de AIs por sintasas de AHLs pertenecientes a la familia de proteínas I y, a diferencia del QS híbrido, las señales son directamente detectadas por reguladores transcripcionales intracelulares pertenecientes a la familia de proteínas R (Gray y Garey, 2001) (figura 1).

1.1 Quorum Sensing AI-1

El QS tipo AI-1 fue descrito en los años 1970s en la bacteria Gram-negativa *Vibrio fischeri* y se ha convertido desde entonces en un paradigma (Nealson y Markovitz, 1970; Eberhard, 1972; Hastings y Nealson, 1977; Nealson y Hastings, 1979).

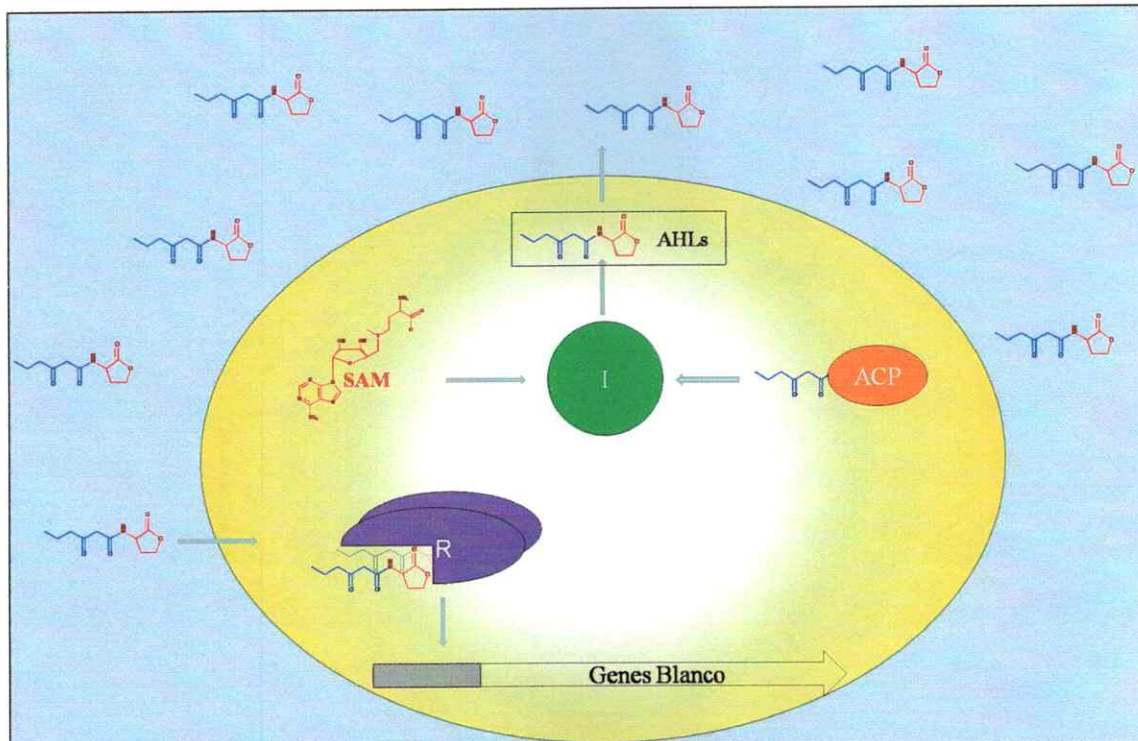


Figura 1. Sistema de QS tipo AI-1 en bacterias Gram-negativas. La proteína I (verde) es responsable de sintetizar AHLs a partir de acil-ACP (naranja) y SAM (rojo). Estas moléculas son capaces de difundir, acumulándose en el medio extracelular. Una vez alcanzada una concentración umbral, el AI se une a la proteína R (púrpura), la cual dimeriza y entonces es capaz de regular la transcripción de genes blanco.

A baja densidad celular, las moléculas de AHLs producidas al interior de la célula difunden libremente a través de la membrana o son externalizadas mediante bombas activas hacia el medio extracelular en donde su concentración aumenta en relación al crecimiento de la población (Kaplan y Greenberg, 1985; Evans y col., 1998; Pearson y col., 1999). Cuando la señal

alcanza cierta concentración umbral activa, es unida por el regulador transcripcional, LuxR, provocando la formación de dímeros de esta proteína. Estos dímeros son capaces de interactuar con la región operadora llamada *caja lux* y regular positivamente la expresión del operón *luxICDABEG*, cuyos genes codifican para proteínas involucradas en la producción de luz. En este sistema, la síntesis de AHL es llevada a cabo por LuxI, cuyo gen forma parte del operón regulado por LuxR. Esto crea un circuito de regulación positiva para la expresión de la sintasa de AHLs.

Los microorganismos que poseen sistemas de QS tipo AI-1 responden específicamente a determinadas AHLs. Las distintas proteínas R son capaces de discriminar las AHLs dependiendo del largo de la cadena acilo; del grupo funcional ubicado en el tercer carbono de esta e incluso de la estereoquímica del autoinductor (Cao y Meighen, 1993). A su vez, la estructura de las AHLs está determinada por la cadena acilo que presente la proteína transportadora de grupos acilo (acil-ACP), la cual es sustrato de las sintasas de AHLs. A pesar de que el repertorio de acil-ACP al interior de cada célula tendría cierta influencia, el factor preponderante en la producción de determinadas AHLs es la especificidad intrínseca de la proteína I por determinados sustratos (Parsek y Greenberg, 1999; Parsek y col., 1999).

1.1.1 Las tres familias de sintasas de AHLs

Hasta ahora se han caracterizado tres familias de sintasas de AHLs no homólogas entre sí (González y Marketon, 2003).

La familia de sintasas tipo Hdts está compuesta por homólogos de la sintasa de AHLs de *Pseudomonas fluorescens F113*, Hdts (Laue y col., 2000). La expresión en *E. coli* ha demostrado

que HdtS es capaz de dirigir la síntesis de tres tipos de AHLs (C_6 -HSL, C_{10} -HSL y 3-OH- $C_{14:1}$ -HSL). Su relación con la familia de las fosfatidil acil-transferasas sugiere que HdtS puede transferir la cadena acilo desde acil-coenzima A (acil-CoA) o acil-ACP a S-adenosil-metionina (SAM) para la producción de AHLs.

La familia de sintasas tipo LuxM/AinS está compuesta por homólogos de las sintasas de AHLs LuxM y AinS de *V. harbeyi* y *V. fischeri*, respectivamente. LuxM es capaz de sintetizar 3-OH- C_4 -HSL a partir de SAM y acil-ACP, mientras que AinS produce C_8 -HSL desde SAM y octanoil-ACP u octanoil-CoA.

La familia más estudiada y mejor caracterizada corresponde a las sintasas de AHLs homólogas a LuxI de *V. fischeri*. Estas enzimas son responsables de la síntesis de la señal en el sistema de QS tipo AI-1 y son llamadas proteínas I (Gray y Garey, 2001). Las proteínas I constan de 200 residuos de aminoácidos aproximadamente y sintetizan AHLs a partir de SAM y acil-ACP sin la necesidad de cofactores o fuentes de energía (Cao y Meighen, 1993; Hanzelka y Greenberg, 1996; Parsek y col 1999; Schaefer y col., 1996).

1.1.2 Síntesis de AHLs por proteínas I

Las AHLs son moléculas anfipáticas que combinan una cadena acilo hidrofóbica y un anillo del tipo lactona hidrofílico. Se han descrito homoserinas lactonas aciladas de diferentes composiciones dependiendo del largo de la cadena acilo y de la presencia de insaturaciones y sustituciones en esta cadena. La longitud de la cadena acilo varía desde 4 a 18 átomos de carbono (C_4 - C_{18}). Aunque la mayoría de las AHLs poseen cadenas acilo con cantidades pares de átomos de carbono, también se han encontrado AHLs con 7 o 9 carbonos en su cadena acilo

(Lithgow y col., 2000; Gonzalez y Marketon, 2003). También, hay diferencias en la sustitución en el tercer carbono de la cadena acilo, donde este puede estar unido a un átomo de hidrógeno, grupos oxo o hidroxilos (Fuqua y col., 1994) (figura 2).

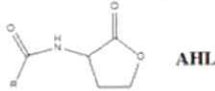


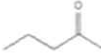



		
Nombre	Grupo R	Microorganismo/Proteína I
N-butilhomoserina-lactona, C ₄ -HSL		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RhII
N-(3-oxododecanoil)homoserina lactona, 3-oxo-C ₁₂ -HSL		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LasI
N-(3-oxohexanoil)homoserina lactona, 3-oxo-C ₆ -HSL		<i>Pantoea stewartii</i> Esal
N-(3-oxooctanoil)homoserina lactona, 3-oxo-C ₈ -HSL		<i>Erwinia carotovora</i> ExpI
N-heptanoilhomoserina lactona, C ₇ -HSL		<i>Rhizobium leguminosarum</i> RhII
N-(3-hidroxi-7-cis-tetradecenoil)homoserina lactona, 3-OH-C ₁₄ -HSL		<i>Rhizobium leguminosarum</i> CinI

Figura 2. Estructura de AHLs producidas por diferentes bacterias Gram-negativas. Todas las moléculas poseen una mitad homoserina lactona (parte superior), difiriendo en la longitud y en el grado de oxidación de la cadena acilo (grupo R).

Durante la síntesis de AHLs, la cadena acilo es presentada a la proteína I como un tioéster del grupo prostético de fosfopanteteína presente en ACPs. En la reacción de acilación, el grupo amino del SAM realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del primer grupo carbonilo de la cadena acilo. La lactonización ocurre por un ataque nucleofílico sobre el carbono- γ del SAM por parte su propio grupo carboxilo, originando el anillo característico de las AHLs (Hanzelka y Greenberg, 1996; Parsek y col 1999; Val y Cronan, 1998) (figura 3). Las moléculas liberadas además de la propia AHL, son 5`metil-tioadenosina y holo-ACP.

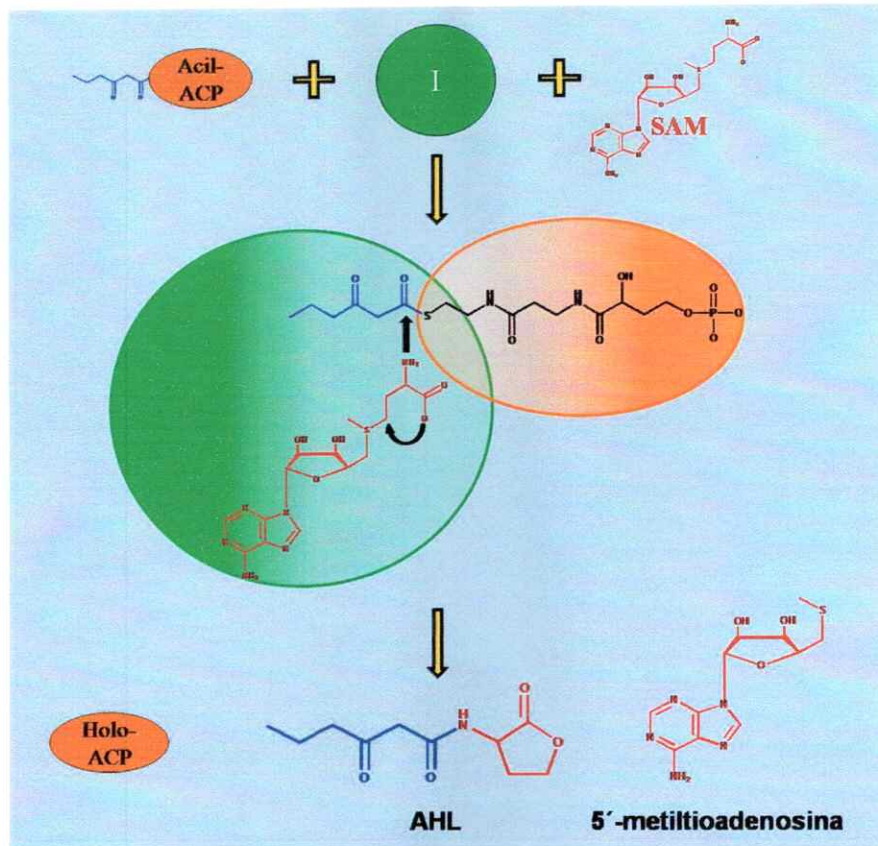


Figura 3. Esquema de la reacción de síntesis de AHLs. El primer paso requiere la unión de los sustratos acil-ACP (naranja) y SAM (rojo) a la proteína I (verde). La cadena acilo (azul) se presenta como un tioéster de fosfopanteteína (negro). En un segundo paso, ocurren las reacciones de acilación y lactonización (flechas negras). Finalmente, se liberan holo-ACP, 5'-metiltioadenosina y la AHL respectiva.

1.1.3 Análisis funcional de proteínas I

Como se mencionó anteriormente, las distintas especies bacterianas son capaces de responder a AHLs específicas. Tomando en cuenta que la estructura de las AHLs depende de la cadena acilo que lleve la acil-ACP que seleccione la proteína I en la síntesis de AHLs, es que el estudio particular de la especificidad para este sustrato se hace importante.

Si bien existe poca información acerca de la estructura y selección de sustrato de proteínas I, estudios de mutagenesis y modelamientos *in silico* arrojan algunas pistas.

Trabajos de mutagenesis al azar y sitio-dirigida en LuxI (*V. fischeri*) y RhII (*P. aeruginosa*) han ayudado a identificar regiones importantes para la síntesis de AHLs (Hanzelka y col., 1997; Parsek y col., 1997). En estos reportes se describe una región N-terminal conservada en 12 proteínas I y una región C-terminal con menor grado de conservación. Mutaciones puntuales al azar y sitio-dirigidas para los residuos de aminoácidos conservados en la región N-terminal producen proteínas cuya síntesis de AHLs es indetectable, sugiriendo que la región comprendida entre los aminoácidos 25 y 70 es esencial para la actividad de estas sintasas. Probablemente, esta región forma parte del sitio activo donde se lleva a cabo la formación del enlace amida entre el SAM y la cadena acilo, mientras que la región C-terminal menos conservada podría contener residuos involucrados en la selectividad de la cadena acil (Hanzelka y col., 1997; Parsek y col., 1997). En estos trabajos también se demostró que residuos aminoacídicos de cisteinas no son esenciales para la unión de la cadena acilo, discrepando con postulados en los cuales se proponía la existencia un enlace covalente entre el grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína y la cadena acilo (Sitnikov y col., 1995; More y col., 1996).

Trabajos basados en las estructuras cristalinas de dos proteínas I han aportado información sobre la unión de sus sustratos y el proceso de síntesis de AHLs. La estructura cristalina de la proteína Esal de *Pantoea stewartii* muestra que los aminoácidos conservados en el N-terminal se encuentran sobre la misma faz de la enzima, apoyando los postulados que indican que el sitio activo se encuentra en esta región (Watson y col., 2002). Aquí, los aminoácidos conservados se ubican en dos regiones. La primera corresponde a la parte más distal del N-terminal la cual posee un alto grado de flexibilidad. Esta zona podría estabilizarse por la unión de algún sustrato y/o por la segunda zona consistente en una red de pares iónicos que

involucra aminoácidos de la parte más central del N-terminal. También se observa que no existen cisteínas accesibles al sustrato, por lo que se descarta un intermediario tio-acil-enzima. La estructura de esta proteína I revela una notable similitud con *N*-acetiltransferasas lo que permitió modelar un bolsillo de unión a 3-oxo-C₆-fosfopanteteína. Se identificaron residuos importantes para la estabilización de la fosfopanteteína y para la cadena acil, los cuales fueron ubicados en un bolsillo hidrofóbico en forma de “V” entre las hojas β 4 y β 5 (figura 4A).

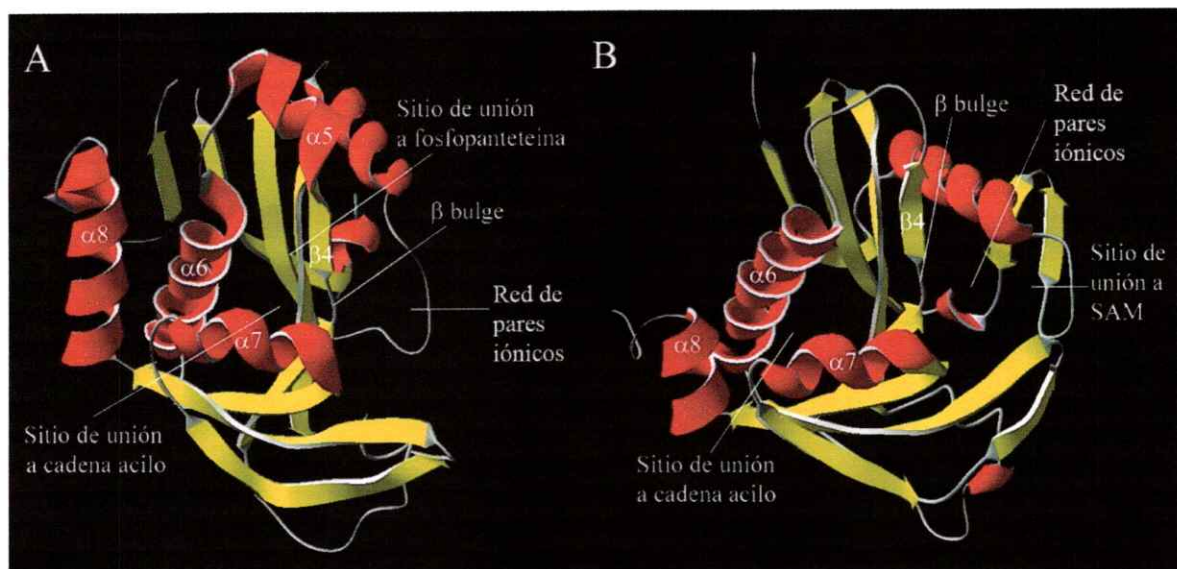


Figura 4. Estructuras de Esal de *P. stewartii* (A) y LasI de *P. aeruginosa* (B). Ambas estructuras se muestran en el modo “cartoon”, hélices α en rojo y hojas β en amarillo. Se señalan los sitios de unión a sustrato propuestos por los autores respectivos (Watson y col., 2002; Gould y col., 2004).

Este modelamiento sugiere que el residuo de treonina ubicado en la posición 140 sobre la hoja β 5 podría formar un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo del tercer carbono de la cadena acil, influyendo en la selección de este sustrato. Experimentos de mutagenesis sitio-dirigida comprobaron que la sustitución de treonina 140 por alanina cambia la afinidad de Esal para unir 3-oxo-acil-ACP por alcanoil-ACP (Watson y col., 2002). Posteriormente, análisis de espectrometría de masas demostraron que no existe un cambio en los niveles de producción de 3-oxo-C₆-HSL, sino más bien un aumento en la producción de C₆-HSL y otras AHLs no

sustituidas de distinto largo de cadena, indicando que la mutación de la treonina 140 resulta en una pérdida de especificidad y que entonces el rol de este aminoácido es restringir el tipo de acil-ACPs que pueden unirse a la enzima más que aumentar la afinidad por 3-oxo-acil-ACPs (Gould y col., 2006).

La estructura de LasI de *Pseudomonas aeruginosa* comparte características con la estructura de Esal. Ambas muestran similitud con N-acetiltransferasas y poseen una red de pares iónicos que serían importantes para la estabilización del N-terminal y, por lo tanto, para la síntesis de AHLs. El modelamiento de 3-oxo-C₁₂-fosfopanteteina sobre la estructura de LasI permitió la identificación de una región estructurada en forma de túnel, cuyos aminoácidos participarían en la unión de la cadena acilo. Apparently, esta estructura permite acomodar una cadena acilo sin importar su longitud, por lo que la producción mayoritaria 3-oxo-C₁₂-HSL sería principalmente debido al repertorio de acil-ACP de la célula y no a un impedimento estérico al momento de encajar cadenas acilo más largas. De esta misma forma, se propusieron sitios de unión a SAM y a acil-ACP (figura 4B). Este último sitio involucra la hélice $\alpha 7$ (cargada positivamente) que interactuaría con la hélice $\alpha 2$ (cargada negativamente) de la ACP (Gould y col., 2004).

Distintas cepas de *Erwinia carotovora* poseen distintas versiones de la sintasa de AHLs Expl. Se ha demostrado que algunas de estas enzimas sintetizan C₆-oxo-HSL mientras otras sintetizan C₈-oxo-HSL. Una comparación entre las distintas versiones de estas proteínas I reveló aminoácidos importantes en la selección de la cadena acil. Particularmente interesante resulta el residuo 127 ubicado en la hélice $\alpha 6$. Expl_{SCC1} sintetiza 3-oxo-C₆-HSL y presenta metionina en esta posición mientras que Expl_{SCC3193} produce 3-oxo-C₈-HSL y posee un residuo de treonina. Trabajos de mutagénesis sitio-dirigida probaron que el cambio de la metionina 127 por treonina induce la producción de 3-oxo-C₈-HSL en lugar de 3-oxo-C₆-HSL y, por el contrario, el cambio de

la treonina 127 por metionina induce la producción de 3-oxo-C₆-HSL en lugar de 3-oxo-C₈-HSL (Brader y col., 2005).

Estos trabajos han sido importantes tanto en identificar aminoácidos conservados como en demostrar de forma singular la importancia de algunos de ellos en la actividad de algunas sintasas de AHLs. Sin embargo, hasta la fecha no se han definido por completo las bases estructurales responsables de la selección de distintas acil-ACPs.

1.2 QS en *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria Gram-negativa quimiolitotrófica acidófila capaz de oxidar el ion ferroso y compuestos inorgánicos reducidos de azufre (RISC), convirtiéndolo en objeto de interés para la biolixiviación (Pronk y col., 1990). Mediante la acción de un consorcio de microorganismos acidófilos, este proceso permite solubilizar los metales presentes en un mineral (Rawlings, 2002). Durante la biolixiviación, los sulfuros metálicos insolubles son oxidados a sulfatos metálicos solubles por acción química del ion férrico (Fe³⁺). La oxidación de estos sulfatos genera azufre elemental, el cual se deposita sobre el mineral como una lámina que enlentece el proceso. Algunos miembros del consorcio favorecen la disolución del mineral llevando a cabo la reoxidación del ion ferroso (Fe²⁺) generado, reponiendo así los niveles de ion férrico (Rohwerder y col., 2003). Otros miembros del consorcio bacteriano, poseen la capacidad de oxidar RISC, llevando el azufre elemental insoluble hasta iones sulfatos solubles, favoreciendo la disolución del mineral mediante la remoción de la lámina de azufre (Rohwerder y col., 2003). Se ha demostrado que este tipo de microorganismos son capaces de adherirse a la superficie de los minerales formando biopelículas (Harnett y col., 2006). También, se ha sugerido que la formación de este tipo de estructuras biológicas se correlaciona con la disolución del

mineral (Harneit y col., 2006). Por ende, la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el control y regulación de la formación de biopelículas puede ser de gran importancia para optimizar el proceso de biolixiviación. En diversas γ -proteobacterias se ha demostrado el importante rol regulatorio que cumple el QS en la regulación de la formación de biopelículas (Davies y col., 1998; Huber y col., 2001; Labbate y col., 2004; Sakuragi y Kolter, 2007).

Nuestro laboratorio ha demostrado la existencia de un sistema de QS AI-1 funcional en *A. ferrooxidans* (Farah y col., 2005). Posteriormente, junto con reportar que las AHLs influyen en la adhesión de *A. ferrooxidans* al mineral, hemos observado la producción de AHLs por parte de otros miembros del consorcio biominero, sugiriendo que este sistema de comunicación pudiese ser un fenómeno común entre este tipo de microorganismos (Ruiz y col., 2007). En *A. ferrooxidans*, el locus QS consta de dos marcos de lectura abiertos, *afel* y *afeR*, orientados de forma divergente, los cuales codifican para proteínas con altos niveles de similitud con proteínas I y R, respectivamente. Río arriba de *afel* están localizadas dos cajas *afe* las cuales podrían ser utilizadas por el regulador transcripcional AfeR para modular la expresión de este gen. Se demostró que *afel* es transcrito en forma diferencial dependiendo de la fuente energética utilizada y que AfeI es capaz de sintetizar a lo menos 9 AHLs distintas, preferencialmente de cadena larga.

2. Planteamiento del estudio

La directa relación que tiene el tipo de AHLs sintetizadas por las proteínas I con el largo de la cadena acilo presentada por las ACPs utilizadas como sustrato, precisa de estudios que permitan comprender las bases moleculares de la selección del largo de la cadena acilo.

La sintasa de AHLs de *A. ferrooxidans*, Afel, es una proteína de 183 aminoácidos y un peso molecular de 19,95 kDa. Nuestro laboratorio ha demostrado que esta proteína tiene la capacidad de sintetizar distintas AHLs de cadena larga (C₁₂-HSL, 3-oxo-C₁₂-HSL, 3-OH-C₁₂-HSL, C₁₄-HSL, 3-oxo-C₁₄-HSL, 3-OH-C₁₄-HSL y 3-OH-C₁₆-HSL), medianas (3-OH-C₈-HSL, 3-OH-C₁₀-HSL) (Farah y col., 2005) y cortas (C₆-HSL) (Banderas 2008, seminario de título).

Al realizar un alineamiento múltiple entre secuencias aminoacídicas de distintas proteínas I y Afel, observamos una correlación entre el largo de la cadena acilo de la AHL sintetizada y la longitud de una región particular de las secuencias de estas proteínas (figura 5). El modelamiento tridimensional de Afel basada en la estructura cristalina de la sintasa de AHLs de *P. aeruginosa*, LasI, reveló que esta región corresponde al motivo estructural formado por la hoja β 4, la hélice α 6 y un lazo ubicado entre estas dos estructuras (figura 6).

Finalmente, análisis de "docking" en Afel para una cadena acilo de 14 carbonos y SAM muestran que el espacio conformado por el motivo estructural [β 4-lazo- α 6] podría ser responsable de encajar la cadena acilo (figura 6A).

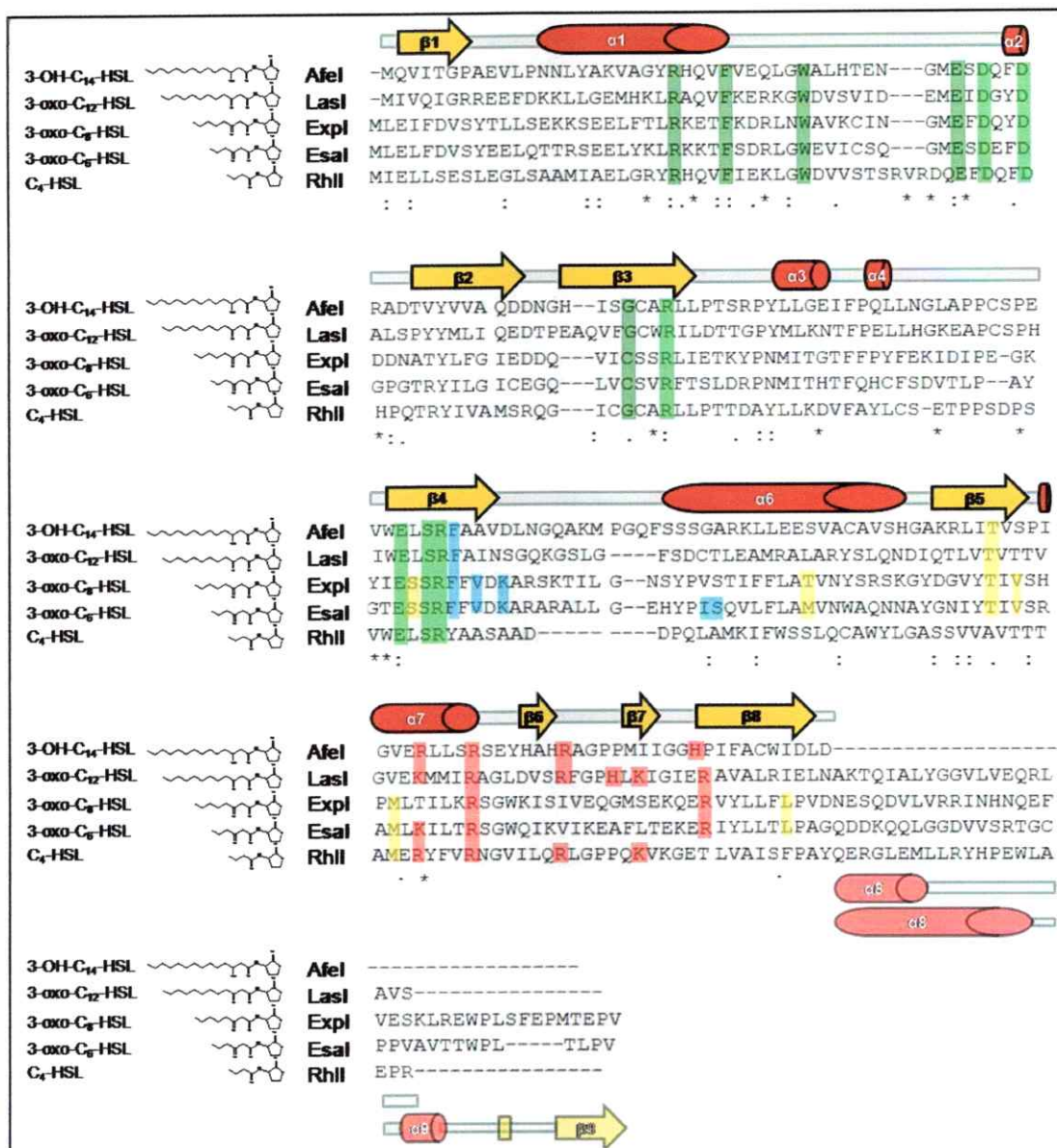


Figura 5. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de la proteína Afel con otras cuatro proteínas I que sintetizan AHLs con cadena acilo de diferentes largos. La hipótesis de esta tesis propone que la longitud de la cadena acilo de la AHL sintetizada por cada sintasa (izquierda) se relaciona con la longitud del lazo entre las estructuras secundarias $\beta 4$ y $\alpha 6$, sugiriendo su participación en la selección de la cadena acilo. La estructura secundaria de Afel se muestra sobre el alineamiento. Las estructuras bajo el alineamiento corresponden a los C-terminales de Esal y LasI. Hélices α (rojo), Hojas β (amarillo), lazos (gris). En el N-terminal se destacan los aminoácidos conservados propuestos para la unión de SAM (verde oscuro) y la formación de la red iónica (verde claro). En la región correspondiente a $\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$ se destacan aminoácidos sugeridos para la unión de fosfopanteteína (celeste). En el C-terminal se destacan los aminoácidos sugeridos para la unión de la cadena acil (amarillo) y ACP (rojo). LasI y RhII, *Pseudomonas aeruginosa*; Expl, *Erwinia carotovora*; Esal, *Pantoea stewartii*; Afel, *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

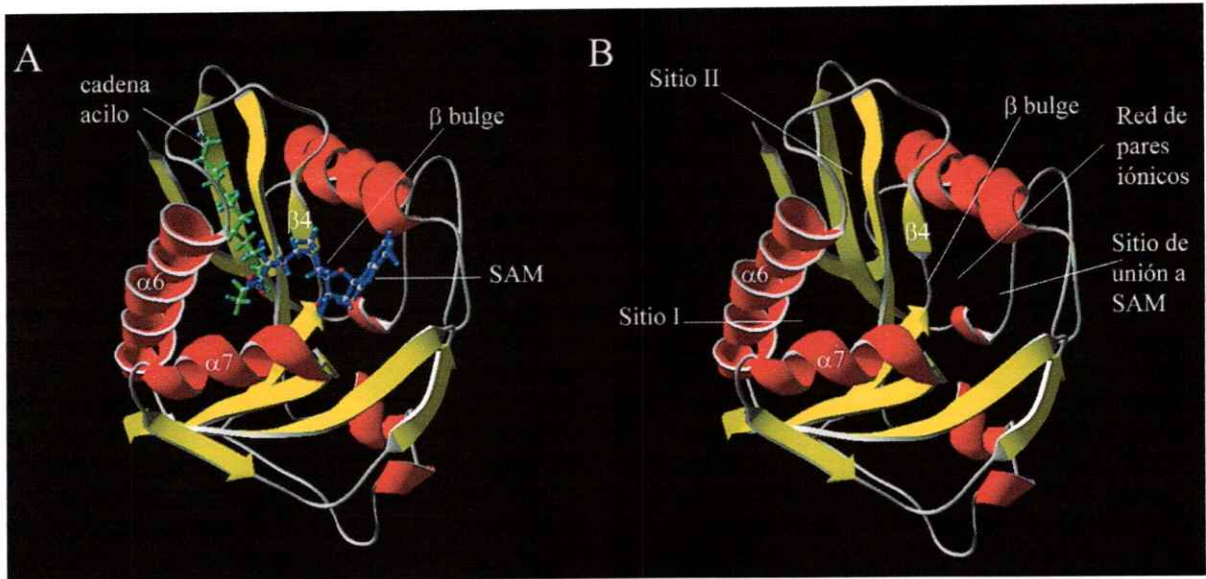


Figura 6. Modelo estructural de la sintasa de AHLs Afel basado en la estructura de LasI. En **A** se muestra el resultado del “docking” realizado con una cadena acilo de 14 carbonos y el SAM sobre Afel. En **B**, se destaca el sitio de unión a la cadena acilo propuesto en LasI (sitio I) y el propuesto por el “docking” en Afel (sitio II). SAM y la cadena acilo C-14 se muestra en modo “stick”, en azul y verde, respectivamente.

El motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$] también se encuentra en las estructuras de las proteínas LasI y Esal de *P. aeruginosa* y *P. stewartii*, respectivamente (figura 4A y 4B), sin embargo, en ambos casos la longitud del lazo es menor que la encontrada en Afel. Esta última sintasa produce AHLs cuyo largo de cadena llegan hasta 16 átomos carbonos, mientras que se ha descrito que las proteínas Esal y LasI sintetizan AHLs con cadenas de 6 y 12 carbonos, respectivamente.

En base a todos estos antecedentes, nos propusimos utilizar la proteína Afel como modelo para estudiar si el espacio conformado por el motivo estructural [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$] está involucrado en la selectividad del sustrato acil-ACP de las sintasas de AHLs.

2.1 Hipótesis

La disposición espacial del motivo estructural [β 4-lazo- α 6] encontrado en la proteína Afel de *A. ferrooxidans* está relacionada con la selección del largo de la cadena acilo en la síntesis de AHLs.

2.2 Objetivo General

Determinar si el motivo estructural [β 4-lazo- α 6] de la proteína Afel participa en la selección del tamaño de la cadena acilo utilizada como sustrato para la síntesis de AHLs.

2.3 Objetivos Específicos

- 1.- Construir distintas proteínas mutantes de Afel que presenten escisiones y sustituciones aminoacídicas en el motivo estructural [β 4-lazo- α 6].
- 2.- Expresión heteróloga de las proteínas mutantes Afel_{M1-M16} en *E. coli*.
- 3.- Caracterización de las AHLs producidas en *E. coli* por las proteínas Afel_{M1-M16}.

3. Metodología

3.1 Cepas y plasmidios

Para construir los distintos mutantes de la sintasa de AHLs Afel se utilizó el vector T7/NT-TOPO-Afel. Este plasmidio tiene una longitud total de 3.424 pb, otorga resistencia al antibiótico ampicilina y porta el gen silvestre de *A. ferrooxidans*, *afel*, el cual codifica para la sintasa de homoserinas lactonas aciladas, Afel (Farah y col., 2005). Para la mantención de los plasmidios Afel_m(1-16) se utilizó la cepa TOP 10 F' de *E. coli* mientras que la sobreexpresión de *afel* se realizó en la cepa BL21 (DE3). Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio LB líquido y semisólido (agar 1,5%) (Sambrook y col., 1989), suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Para inducir la expresión de los plasmidios se suplementó con 0,5 mM IPTG.

La cepa de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) fue crecida en medio LB suplementado con 25 µg/ml de gentamicina o medio AB mínimo (ABm) (Chilton y col., 1974).

3.2 Mutaciones sitio-dirigidas independientes de ligasa

Las mutaciones sitio-dirigidas se realizaron mediante la técnica independiente de ligasa, SLIM (Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis) (figura 7) (Chiu y col., 2004).

En esta técnica, el gen que se va a mutar está clonado en un plasmidio que es amplificado en su totalidad. El método consta de una reacción de PCR inverso que utiliza cuatro partidores a la vez: dos partidores largos (Ft y Rt) y dos cortos (Fs y Rs) (Tablas 1 y 2).

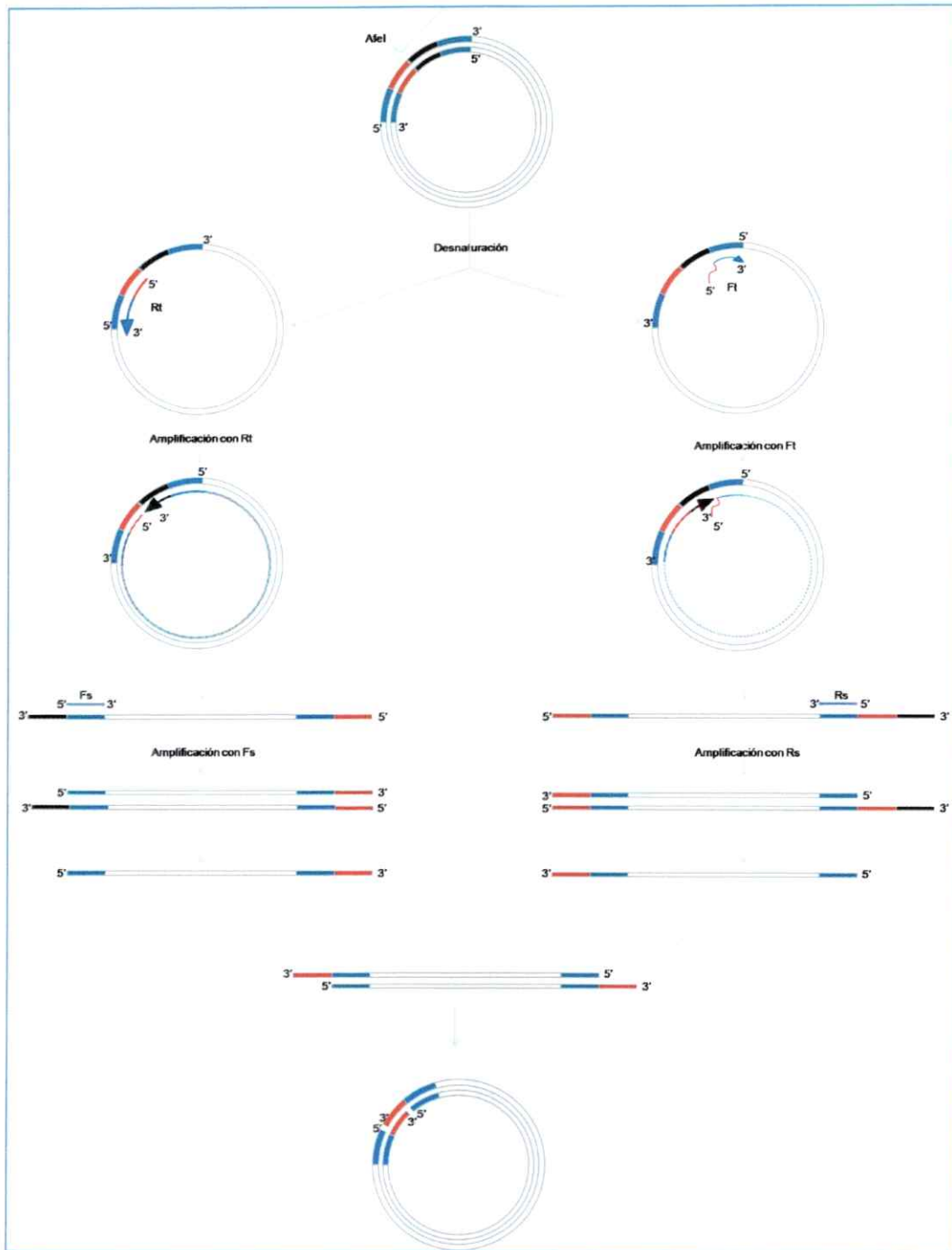


Figura 7. Principio molecular de la mutagenesis dirigida independiente de ligasa (SLIM). Se ejemplifica con la escisión de un fragmento (negro) del gen *afeI* (región multicolor del plasmidio). Después de la desnaturación del plasmidio, ambas hebras son amplificadas. Los partidores Ft ("forward tailed") y Rt ("reverse tailed") amplifican desde regiones vecinas a la región a mutar hacia afuera de *AfeI*. El producto lineal producido sirve de molde para que los partidores Rs ("reverse simple") y Fs ("forward simple") amplifiquen la hebra complementaria sin la región negra. Entonces, un desapareamiento entre las hebras de estos constructos y una posterior hibridación, permite la formación de un heteroduplex lineal, cuyos extremos son complementarios. Estos constructos lineales se transforman en *E. coli* donde los plasmidios lineales son circularizados.

Tabla 1. Partidores utilizados para generar las mutaciones de escisión sobre el gen *afel*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Afel (AKMP) Ft	TGGATCTGAATGGCCAAAGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (AKMP) Fs	GGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (AKMP) Rt	TTGGCCATTGAGATCCAAGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (AKMP) Rs	CGGCCGCAAAGCGCGACAGTT
Afel (QAKM) Ft	CCGTGGATCTGAATGGCCAGGCAGTTTTTCATCCTCGG
Afel (QAKM) Fs	CCAGGCAGTTTTTCATCCTCGG
Afel (QAKM) Rt	GCCATTGAGATCCACGGCCGCAAAGCGCGACAGTTCCC
Afel (QAKM) Rs	CCGCAAAGCGCGACAGTTCCC
Afel (QAKMP) Ft	CCGTGGATCTGAATGGCCAGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (QAKMP) Fs	GGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (QAKMP) Rt	GCCATTGAGATCCACGGCCGCAAAGCGCGACAGTTCCC
Afel (QAKMP) Rs	CCGCAAAGCGCGACAGTTCCC
Afel (LNGQAKMP) Ft	GCTTTGCGGCCGTGGATGGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (LNGQAKMP) Fs	GGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (LNGQAKMP) Rt	ATCCACGGCCGCAAAGCGCGACAGTTCCCAAACCTCGG
Afel (LNGQAKMP) Rs	GCGACAGTTCCCAAACCTCGG
Afel (L) Ft	GCTTTGCGGCCGTGGATAATGGCCAAGCCAAGATGCCA
Afel (L) Fs	AATGGCCAAGCCAAGATGCCA
Afel (L) Rt	ATCCACGGCCGCAAAGCGCGACAGTTCCCAAACCTCGG
Afel (L) Rs	GCGACAGTTCCCAAACCTCGG
Afel (N) Ft	TTGCGGCCGTGGATCTGGCCAAGCCAAGATGCCAGGG
Afel (N) Fs	GGCCAAGCCAAGATGCCAGGG
Afel (N) Rt	CAGATCCACGGCCGCAAAGCGCGACAGTTCCCAAACCT
Afel (N) Rs	AGCGCGACAGTTCCCAAACCT
Afel (G) Ft	CGGCCGTGGATCTGAATCAAGCCAAGATGCCAGGGCAG
Afel (G) Fs	CAAGCCAAGATGCCAGGGCAG
Afel (G) Rt	ATTCAGATCCACGGCCGCAAAGCGCGACAGTTCCCAA
Afel (G) Rs	CAAAGCGCGACAGTTCCCAA
Afel (LNG) Ft	GCTTTGCGGCCGTGGATCAAGCCAAGATGCCAGGGCAG
Afel (LNG) Fs	CAAGCCAAGATGCCAGGGCAG
Afel (LNG) Rt	ATCCACGGCCGCAAAGCGCGACAGTTCCCAAACCTCGG
Afel (LNG) Rs	GCGACAGTTCCCAAACCTCGG

En rojo se muestra la secuencia adaptadora, responsable de generar la mutación deseada.

Tabla 2. Partidores utilizados para generar las mutaciones de sustitución sobre el gen *afel*.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Afel (Expl) Ft	GATAAAGCGCGGTCAAAAATCTTAGGAAATCTTATCCCTCGGGTGC GCGAAAACTGCTG
Afel (Expl) Fs	TCGGGTGC GCGAAAACTGCTG
Afel (Expl) Rt	GGGATAAGAATTTCTAGAAATAGTTTTGACCGCGCTTTATCGGCCGAAAGCGCGACAGTTC
Afel (Expl) Rs	GGCCGCAAAGCGCGACAGTTC
Afel (Esal) Ft	AAAGCCCGCGCACGTGCGCTGTTAGGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (Esal) Fs	GGGCAGTTTTTCATCCTCGGGT
Afel (Esal) Rt	TAACAGCGCACGTGCGCGGGCTTTATCCACGGCCGCAAAGCGCGA
Afel (Esal) Rs	ATCCACGGCCGCAAAGCGCGA
Afel (RhII) Ft	AGCGCGGCGGACGATCCGTCGGGTGC GCGAAAACTGCTG
Afel (RhII) Fs	TCGGGTGC GCGAAAACTGCTG
Afel (RhII) Rt	CGGATCGTCCGCCGCGCTGGCCGCAAAGCGCGACAGTTC
Afel (RhII) Rs	GGCCGCAAAGCGCGACAGTTC
Afel (G138L) Ft	GCGCCGTTTTGCGACCTTGCAAACGGCTGATCACGGTG
Afel (G138L) Fs	GCAAACGGCTGATCACGGTG
Afel (G138L) Rt	AAGGTGCGAAACGGCGCAGGCGACGGATTCCTCCAGCA
Afel (G138L) Rs	AGGCGACGATTCTCCAGCA
Afel (A139L) Ft	CCGTTTTGCGACGGGCTTAAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (A139L) Fs	AAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (A139L) Rt	AAGCCCGTGCGAAACGGCGCAGGCGACGGATTCCTCCA
Afel (A139L) Rs	CGCAGGCGACGGATTCCTCCA
Afel (G138L, A139L) Ft	CCGTTTTGCGACCTTCTTAAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (G138L, A139L) Fs	AAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (G138L, A139L) Rt	AAGAAGGTGCGAAACGGCGCAGGCGACGGATTCCTCCA
Afel (G138L, A139L) Rs	CGCAGGCGACGGATTCCTCCA
Afel (G138L, A139L, V135L) Ft	CCCTTTGCGACCTTCTTAAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (G138L, A139L, V135L) Fs	AAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (G138L, A139L, V135L) Rt	AAGAAGGTGCGAAAGGGCGCAGGCGACGGATTCCTCCA
Afel (G138L, A139L, V135L) Rs	CGCAGGCGACGGATTCCTCCA
Afel (G138L, A139L, V135L, A134L) Ft	CTTCTTTGCGACCTTCTTAAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (G138L, A139L, V135L, A134L) Fs	AAACGGCTGATCACGGTGTCG
Afel (G138L, A139L, V135L, A134L) Rt	AAGAAGGTGCGAAAGAAGGCAGGCGACGGATTCCTCCAG
Afel (G138L, A139L, V135L, A134L) Rs	GCAGGCGACGGATTCCTCCAG

En rojo se muestra la secuencia adaptadora, responsable de generar la mutación deseada.

La mutación se diseña en la región adaptadora ubicada en el extremo 5' de los partidores largos (ejemplificada en rojo en los partidores Ft y Rt de la figura 7). Se usan dos partidores cortos para sintetizar la hebra complementaria a la producida por los partidores largos. Después de la amplificación, una etapa de desnaturación e hibridación permite la formación de un heteroduplex entre los amplificados creados por los distintos partidores.

Para aumentar el grado de especificidad, la obtención de cada plasmidio recombinante se realizó mediante una reacción de PCR "hot-start" que contenía los siguientes componentes: 200 μ M dNTPs, 1 mM MgSO₄, 2,5 μ L DMSO, 200 pg del plasmidio T7/NT-TOPO-Afel, 1 U Long PCR Enzyme Mix (Fermentas), 5 μ L del amortiguador 10X (Fermentas), 15 pmol de cada partidor y agua nanopura hasta completar 50 μ L. La reacción fue incubada a 98°C por 2 minutos y luego a 85 °C, momento donde se agregó la DNA polimerasa. Se realizaron 25 ciclos consistentes en 30 segundos a 95°C, 20 segundos a la temperatura correspondiente a la T_m más baja de los cuatro partidores y 3,5 minutos a 68 °C. Se realizó un paso de extensión final de 7 minutos a 68 °C. Con la finalidad de eliminar el DNA parental, 25 μ L de cada reacción de SLIM se incubaron por 1 h a 37 °C con la enzima de restricción DpnI. Posteriormente se inactivó esta enzima incubando la mezcla de reacción a 75 °C por 15 minutos. Finalmente y con el propósito de formar el heterodúplex, se incubó 5 minutos a 65 °C y 15 minutos a 30 °C. Todas las mutaciones fueron corroboradas mediante la secuenciación de los plasmidios (Macrogen ®, Korea).

3.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Se utilizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa para observar tanto los plasmidios lineales generados a partir de la reacción de SLIM como las purificaciones

plasmidiales. Los geles se prepararon en el amortiguador TAE 0,5X, con una concentración de 1% de agarosa. Para introducir las muestras en el gel, se agregó solución amortiguadora de carga (0,25 % de Azul de Bromofenol, 40 % de Sacarosa). La tinción se realizó durante 30 minutos en una solución de TAE 0,5X con bromuro de etidio a una concentración de 20 µg/ml. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta.

3.4 Transformación

La transformación de *E. coli* fue realizada por los métodos de sales de calcio o por electroporación (Sambrook y col., 1989). Para la selección de las construcciones obtenidas por SLIM se electrotransformó la cepa TOP 10 F' de *E. coli*. Para estudiar la expresión de los genes mutantes, la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* fue transformada con los plasmidios purificados desde las cepas recombinantes de TOP 10 F'. Se dispuso de cubetas de 200 µL de capacidad, a las cuales se les añadió 50 µL de células electrocompetentes y 100 ng de DNA plasmidial. La electroporación fue realizada en el electroporador "gene pulser x-cell" de Bio-Rad con los siguientes parámetros: Voltaje 2500 V, Capacitancia 25 µF, Resistencia 200 Ω. Los 50 µL de reacción se llevaron a 1 mL de medio LB y se incubó 45 minutos a 37 °C. Un volumen de 100 µL de células se sembró en placas con medio LB 1 % agar 100 µg/mL de ampicilina y fueron crecidos durante una noche a 37°C.

Para la transformación por sales de calcio, se incubaron 200 µL de células competentes y 200 ng de DNA plasmidial en hielo durante 20 minutos. Luego, se dio un choque térmico a 42 °C por 1 minuto. El volumen de reacción se aumentó hasta 1 mL con medio LB y se incubó sin agitación durante 1 hora a 37 °C. Las células fueron concentradas mediante centrifugación y

resuspendidas en 200 μ L de medio LB, los cuales se sembraron en medio semisólido (LB 1 % agar 100 μ g/mL de ampicilina). Las placas fueron incubadas durante una noche a 37°C.

3.5 PCR en Colonias

Con el fin de analizar los plasmidios mutantes generados por SLIM, se utilizó la técnica de PCR en colonias (Campbell y Choy, 2001). Para obtener el DNA a amplificar, se tomó una fracción de una colonia recombinante y se resuspendió en un volumen de 50 μ l de agua estéril. Posteriormente se tomaron 2 μ l de la suspensión bacteriana y se agregó a la siguiente mezcla: 100 ng de cada uno de los dos partidores, 0,6 μ L de DMSO, 10 mM de dNTPs, 2,5 μ L de buffer Taq, 0,25 U de Taq polimerasa (Promega) y agua nanopura hasta completar 10 μ L. Uno de los dos partidores usados amplifica el gen *afeI* desde un extremo (amino terminal), mientras que el otro lo hace desde el sitio mutado, siendo su extremo 3'-OH libre complementario al sitio exacto de mutación (tabla 3). Con esto, se espera obtener amplificadas sólo con las colonias que llevan los plasmidios mutantes.

3.6 Extracción de DNA plasmidial

Los clones recombinantes de *E. coli* fueron crecidos en 5 mL de medio LB ampicilina (100 μ g/mL) durante una noche. Mediante el uso del kit de extracción plasmidial E.Z.N.A (kit I) y siguiendo las instrucciones del proveedor, se realizaron purificaciones de los distintos plasmidios construidos mediante SLIM.

Tabla 3. Partidores utilizados para la reacción de PCR en colonias.

Nombre Partidor	Secuencia (5'-3')
PCRCOL_ΔAKMP	TGAAAACCTGCCCTTGGCC
PCRCOL_ΔQAKM	AAACTGCCCTGGGCCATT
PCRCOL_ΔQAKMP	TGAAAACCTGCCCGCCATT
PCRCOL_ΔLNGQAKMP	TGAAAACCTGCCCATCCAC
PCRCOL_ΔLNG	CATCTTGGCTTGATCCAC
PCRCOL_ΔL	CTTGGCTTGGCCATTATC
PCRCOL_ΔN	CATCTTGGCTTGGCCAG
PCRCOL_ΔG	TGGCATCTTGGCTTGATT
PCRCOL_(Esal)	TGAAAACCTGCCCTAACAG
PCRCOL_(Expl)	TCGCGCACCCGAGGGATA
PCRCOL_(RhlI)	CGCGCCACCCGACGGATC
PCRCOL_(G138L)	GATCAGCCGTTTTGCGTG
PCRCOL_(A139L)	CGTGATCAGCCGTTTCCC
PCRCOL_(G138L, A139L)	GATCAGCCGTTTGTGCGA
PCRCOL_(134L, G138L, A139L)	CCGTTTGTGCGAGGCGCA
PCRCOL_(V134L, A135L, G138L, A139L)	CCGTTTGTGCGAGCAGGC
AfeI NH ₂	GGTAGCGCAAGATGACAA

3.7 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Para comprobar la presencia de las proteínas mutantes se realizaron geles de poliacrilamida-SDS. Células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los distintos plasmidios AfeI_{M1-M16} fueron crecidas con agitación en 200 mL de medio LB ampicilina (100 µg/mL) hasta una D.O.₆₀₀=0,5. Luego, se indujo la expresión de las proteínas mutantes y silvestre con 1 mM IPTG, incubándose por 1,5 horas. Mediante centrifugación, los sobrenadantes fueron separados de las células. Los sobrenadantes fueron utilizados para extracciones de AHLs (sección 3.8.1). Las células se trataron con amortiguador de corrida (Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8), SDS al 2%,

glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,001%). Las muestras se incubaron 5 minutos a 100°C. Las electroforesis se corrieron entre 100 o 200 V, hasta que el frente de migración alcanzó el borde inferior del gel. Los geles se tiñeron 1 hora con una solución de azul de Coomassie al 0,2%, metanol al 50% y ácido acético al 7%. Se destiñeron luego mediante lavados sucesivos con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 7%.

3.8 Detección de AHLs

3.8.1 Extracción orgánica de AHLs

Las extracciones orgánicas de AHLs fueron realizadas según lo descrito (Farah y col., 2005). Los sobrenadantes de cultivos fueron extraídos 3 veces con 100 mL de diclorometano durante 30 minutos. La fase orgánica fue rescatada y liberada de residuos de fase acuosa mediante la adición de $MgSO_4$ anhidro. Los extractos fueron filtrados con algodón hidrofílico para eliminar los agregados de sal y luego concentrados hasta un volumen aproximado de 1 mL mediante la utilización de un rotavapor a 50°C. Las muestras obtenidas fueron secadas y saturadas con Nitrógeno gaseoso.

3.8.2 Separación de la Extracción Orgánica por Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Los ensayos de CCF fueron realizados según lo descrito (Ruiz y col., 2007). Para separar los distintos compuestos que puedan haberse obtenido mediante la extracción orgánica se utilizó

la técnica de cromatografía en capa fina utilizando una matriz C₁₈ de fase reversa (Merck®). Los extractos orgánicos se resuspendieron en acetato de etilo concentrándolos 200-1000 veces. Luego, se depositó esta solución en la CCF a 1 cm del borde inferior. Se esperó la absorción de la muestra para iniciar la cromatografía, corriéndose dos veces utilizando metanol 60% como solvente (Bertani y Venturi, 2004; Shaw y col., 1997).

3.8.3 Ensayo Biosensor

Se utilizó la cepa reportera de *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) la cual no produce AHLs debido a la carencia del gen que codifica para la respectiva proteína I. Esta cepa presenta una fusión del gen *lacZ* con *traG*, gen que es regulado mediante autoinducción. Estas características permiten la detección de AHL exógenas mediante la reacción de la β-galactosidasa en presencia de X-gal, lo que se evidencia con halos azules en las zonas donde la proteína R de este microorganismo (TraR) es activada (Luo y col., 2001; Shaw y col 1997). La cepa reportera fue inoculada desde una colonia aislada fresca y crecida en un tubo de 5 ml de LB gentamicina 25 µg/mL a 30 °C durante 24 horas. Se inoculó al 1% en medio fresco ABm y crecida hasta fase exponencial. El cultivo fue mezclado en proporción 1:1 con ABm 1% agar fundido. Se agregó X-gal a una concentración final de 80 µg/ml y se agitó. Finalmente, se vertieron 0,3 mL de la suspensión por cada cm² de CCF, la cual se incubó a 30 °C durante 24 horas. Una vez visualizadas las manchas correspondientes a las distintas AHLs, se procedió a secar y fotografiar la CCF.

4. Resultados

Análisis de "docking" y modelamiento molecular de la proteína Afel han permitido identificar el motivo estructural [β 4-lazo- α 6] y postular su participación en la selección del tamaño de la cadena acilo utilizada para la síntesis de AHLs. Para estudiar el rol que cumple el motivo estructural [β 4-lazo- α 6] en la producción de AHLs se diseñaron mutantes de escisión y sustitución de la sintasa de AHLs de *A. ferrooxidans*, Afel. Estas mutaciones fueron realizadas mediante la técnica de SLIM sobre el gen *afel* que lleva el plasmidio T7/NT-TOPO-Afel. Para la expresión de las diferentes sintasas mutantes, la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* fue transformada con los distintos plasmidios Afel_{M1-M16} (tablas 4 y 5). Las distintas cepas fueron crecidas en medio líquido y el sobrenadante de cada cultivo fue extraído con DCM para analizar la presencia de AHLs.

Tabla 4. Aminoácidos escindidos en las distintas mutantes de escisión.

Plasmidio	Proteína	Aminoácidos escindidos (N°)
Afel _{M1}	Afel _{M1} (Δ AKMP)	AKMP (4)
Afel _{M2}	Afel _{M2} (Δ QAKM)	QAKM (4)
Afel _{M3}	Afel _{M3} (Δ QAKMP)	QAKMP (5)
Afel _{M4}	Afel _{M4} (Δ LNGQAKMP)	LNGQAKMP (8)
Afel _{M5}	Afel _{M5} (Δ L)	L (1)
Afel _{M6}	Afel _{M6} (Δ N)	N (1)
Afel _{M7}	Afel _{M7} (Δ G)	G (1)
Afel _{M8}	Afel _{M8} (Δ LNG)	LNG (3)

Tabla 5. Aminoácidos reemplazados en las distintas mutantes de sustitución.

Plasmidio	Proteína	Aminoácidos escindidos (N°)	Aminoácidos insertados (N°)
Afel _{M9}	Afel _{M9} (ExpI)	VDLNGQAKMPGQFSS (15)	DKARSKTILGNSYP (14)
Afel _{M10}	Afel _{M10} (Esal)	LNGQAKMP (8)	KARARALL (8)
Afel _{M11}	Afel _{M11} (RhII)	VDLNGQAKMPPGQFSS (16)	SAADDP (6)
Afel _{M12}	Afel _{M12} (G138L)	G (1)	L (1)
Afel _{M13}	Afel _{M13} (A139L)	A (1)	L (1)
Afel _{M14}	Afel _{M14} (G138L; A139L)	GA (2)	LL(2)
Afel _{M15}	Afel _{M15} (V135L; G138L; A139L)	VSHGA (5)	LSHLL (5)
Afel _{M16}	Afel _{M16} (A134L; V135L; G138L; A139L)	AVSHGA (5)	LLSHLL (5)

4.1 Reducción del tamaño del bolsillo [β 4-lazo- α 6]

Para ensayar la participación del motivo estructural [β 4-lazo- α 6] en la selección de cadenas acilo de diferente longitud, se realizaron mutaciones consistentes en la escisión de 4 (Δ AKMP y Δ QAKM), 5 (Δ QAKMP) y 8 (Δ LNGQAKMP) aminoácidos del lazo ubicado entre la hoja β 4 y la hélice α 6 (figura 8). La expresión de cada proteína mutante fue comprobada mediante geles de poliacrilamida (figura 9). Tal y como se ha observado en otros trabajos (Hanzelka y col., 1997), algunas de las proteínas migran de forma anómala en este tipo de ensayo.

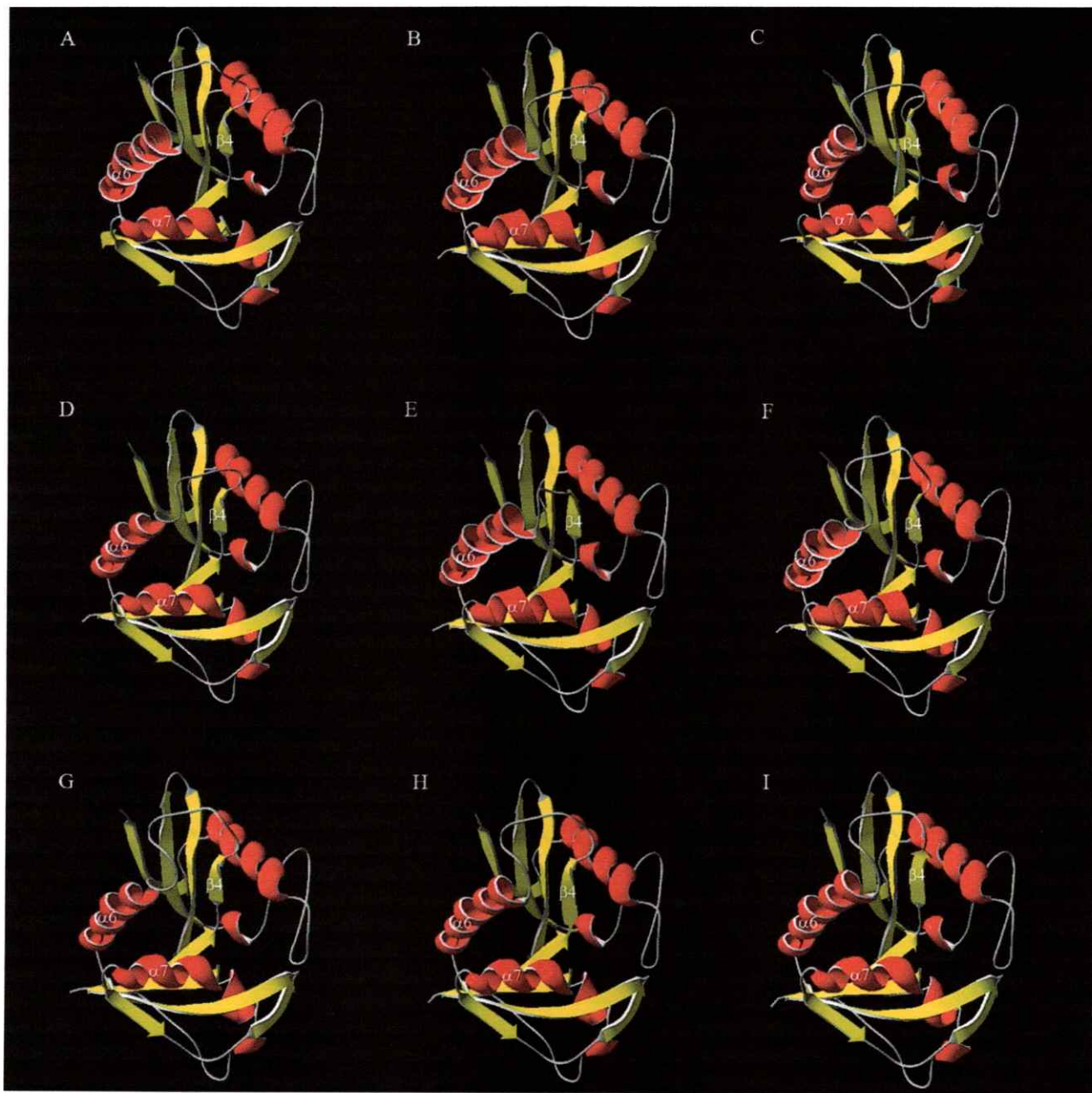


Figura 8. Modelos estructurales de las distintas mutantes de escisión en el lazo ubicado entre la hoja $\beta 4$ y la hélice $\alpha 6$. **A**, Afel silvestre; **B**, Afel_{M1}(Δ AKMP); **C**, Afel_{M2}(Δ QAKM); **D**, Afel_{M3}(Δ QAKMP); **E**, Afel_{M4}(Δ LNGQAKMP); **F**, Afel_{M5}(Δ L); **G**, Afel_{M5}(Δ N); **H**, Afel_{M5}(Δ G); **I**, Afel_{M5}(Δ LNG).

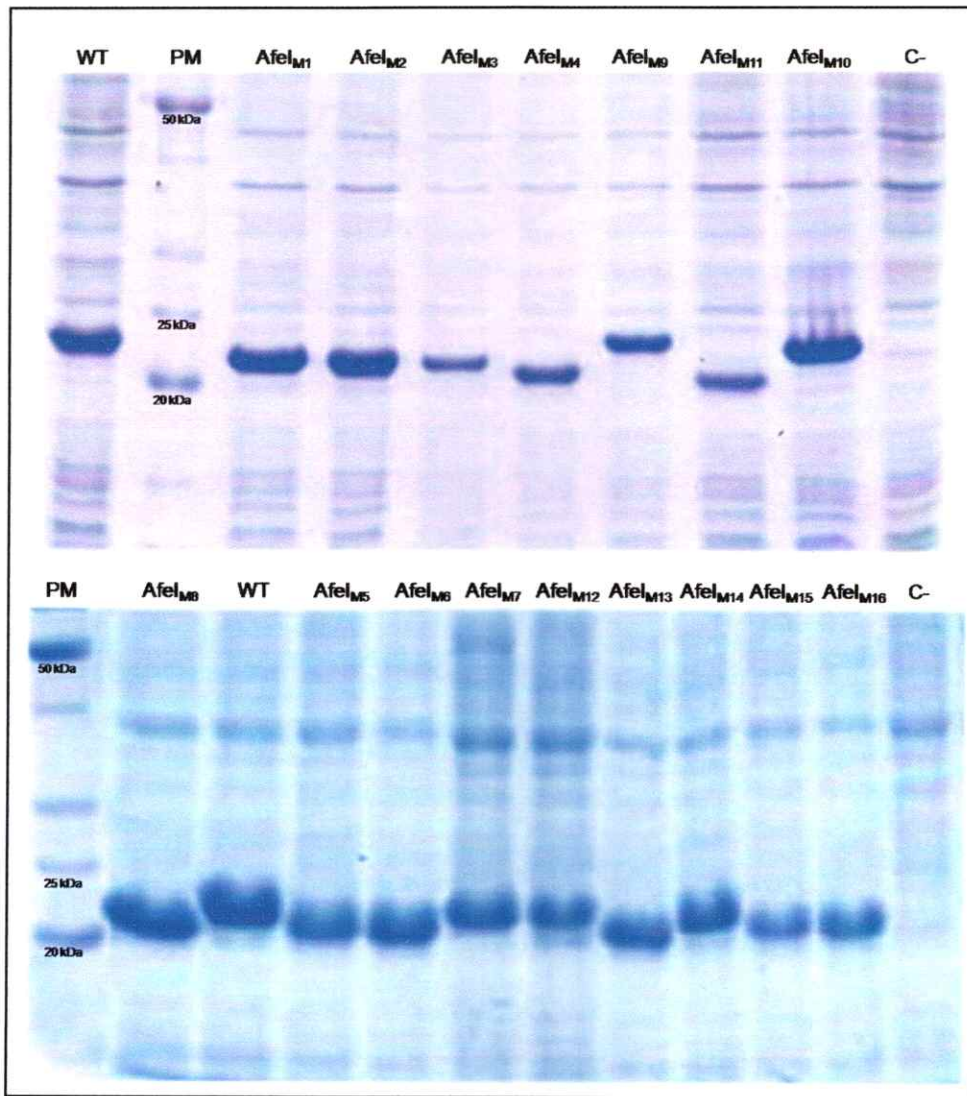


Figura 9. SDS-PAGE de los extractos totales de proteínas de la cepa de *E. coli* que sobreexpresan los diferentes plasmidios T7/NT-TOPO Afel_{M1-M16} con las diferentes mutaciones en el motivo [β4-lazo-α6]. WT, Extracto total de proteínas de *E. coli* que contiene el plasmidio T7/NT-TOPO- Afel; PM, estándar de peso molecular; C-, extracto total de proteínas de *E. coli* que contiene el plasmidio T7/NT-TOPO como control negativo.

Los sobrenadantes de los cultivos de *E. coli* que llevan los distintos plasmidios Afel_{M1-M16} fueron sometidos a un análisis de detección de AHLs. Tal como se describió anteriormente (Farah y col., 2005; Banderas 2008, seminario de título), se observa que la sintasa silvestre Afel es capaz de producir AHLs de cadena corta (C₆ y C₄), mediana (C₈) y larga (probablemente C₁₄ y/o C₁₆) (figura 10A, columna WT).

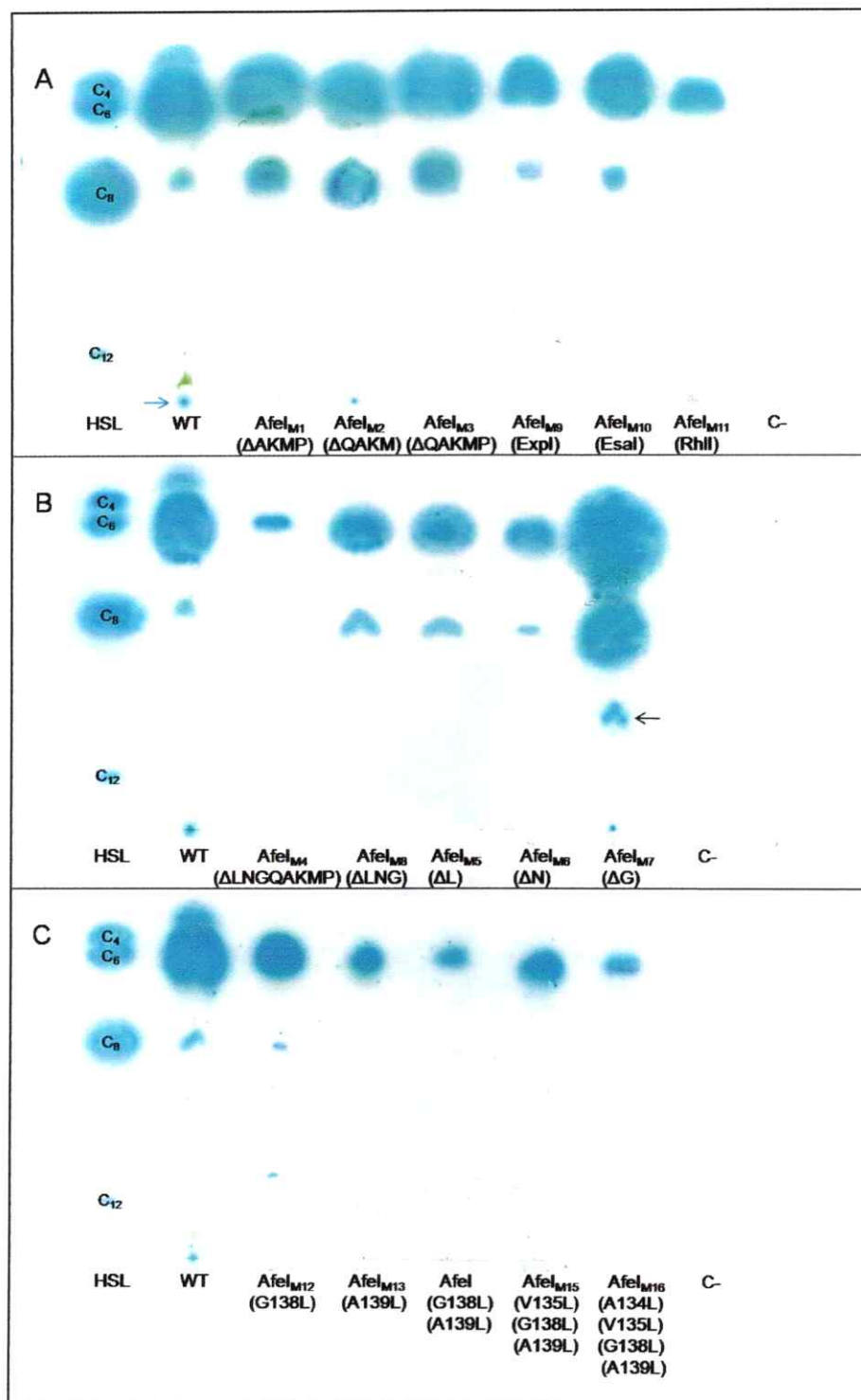


Figura 10. Ensayos de CCF para los extractos de AHLs de producidos por los distintos mutantes de Afel revelados con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4). **A**, AHLs producidas por mutantes de escisión y sustitución en el motivo [β4-lazo-α6]. **B**, AHLs producidas por mutantes de escisión en el motivo [β4-lazo-α6]. **C**, AHLs producidas por mutantes de sustitución en el motivo [α6-lazo-β5]. **S**, estándar de AHLs; **WT**, Afel silvestre; **C-**, control negativo.

En comparación con la sintasa silvestre Afel, podemos observar una disminución en la detección de AHLs de cadena larga en el extracto correspondiente a la mutante Afel_{M2} (Δ QAKM). Este fenómeno se acentúa en las mutantes Afel_{M1} (Δ AKMP) y Afel_{M3} (Δ QAKMP), donde la señal correspondiente a AHLs de cadena larga es indetectable. Sin embargo, estos tres mutantes muestran un aumento del área de la mancha correspondiente a AHLs de cadena mediana. La producción de AHLs de la mutante Afel_{M4} (Δ LNGQAKMP) es moderada y solo se detecta una mancha correspondiente a AHLs de cadena corta (figura 10B). Aunque este fenómeno es directamente atribuible a la ausencia de estos ocho aminoácidos no se puede descartar que la ausencia puntual de algunos de ellos tenga también algún efecto. Si la diferencia en la producción de AHLs de la mutante Afel_{M4} (Δ LNGQAKMP) respecto a las otras mutantes de escisión es debido a la pérdida puntual de aminoácidos, consideramos que estos residuos no pueden ser ninguno de los escindidos en los mutantes Afel_{M1} (Δ AKMP), Afel_{M2} (Δ QAKM) o Afel_{M3} (Δ QAKMP). Por lo tanto, los aminoácidos que podrían estar jugando un rol importante en la selección del sustrato son: Leu-108, Asn-109 y Gly-110.

Para estudiar esta posibilidad se construyeron tres sintasas mutantes con una escisión puntual a nivel de estos aminoácidos [Afel_{M5} (Δ L), Afel_{M6} (Δ N) y Afel_{M7} (Δ G)] y también una cuarta mutante para los tres aminoácidos [Afel_{M8} (Δ LNG)] (figura 10B).

Las mutantes Afel_{M5} (Δ L), Afel_{M6} (Δ N) y Afel_{M8} (Δ LNG) muestran una disminución o pérdida de producción de AHLs de cadena larga. La mutante Afel_{M7} (Δ G) produce AHLs de cadenas largas, medianas y cortas, incluso aparece una AHL que no se observa en el extracto de la sintasa silvestre; posiblemente esta molécula sea C₁₀-HSL (flecha negra en la figura 10B). Estos resultados indican que la pérdida puntual de cualquiera de estos aminoácidos no es suficiente para lograr un cambio en la síntesis de AHLs similar al que muestra la mutante

Afel_{M4} (Δ LNGQAKMP). Por lo tanto, la producción de AHLs observada en la mutante Afel_{M4} (Δ LNGQAKMP) se debe a la ausencia conjunta de los 8 aminoácidos escindidos y posiblemente a la disponibilidad espacial que presenta el motivo estructural [β 4-lazo- α 6].

4.2 Sustitución del lazo perteneciente al motivo [β 4-lazo- α 6] de Afel por el de otras sintasas

Debido a que el factor más importante en variabilidad de las AHLs es la especificidad intrínseca de la AHL sintasa por una determinada cadena acilo (Parsek y Greenberg, 1999; Parsek y col 1999), decidimos evaluar la especificidad del arreglo de aminoácidos correspondiente al motivo estructural [β 4-lazo- α 6] de AHL sintasas que producen diferentes AHLs. Se construyeron mutantes de Afel en las cuales aminoácidos ubicados en el lazo del motivo estructural fueron sustituidos por aminoácidos correspondientes a aquellos presentes en proteínas I que sintetizan AHLs de cadena mediana (Expl de *E. carotovora*, 3-oxo-C₈-HSL) y corta (Esal de *P. stewartii*, 3-oxo-C₆-HSL y RhII de *P. aeuroginosa*, C₄-HSL) (figura 11).

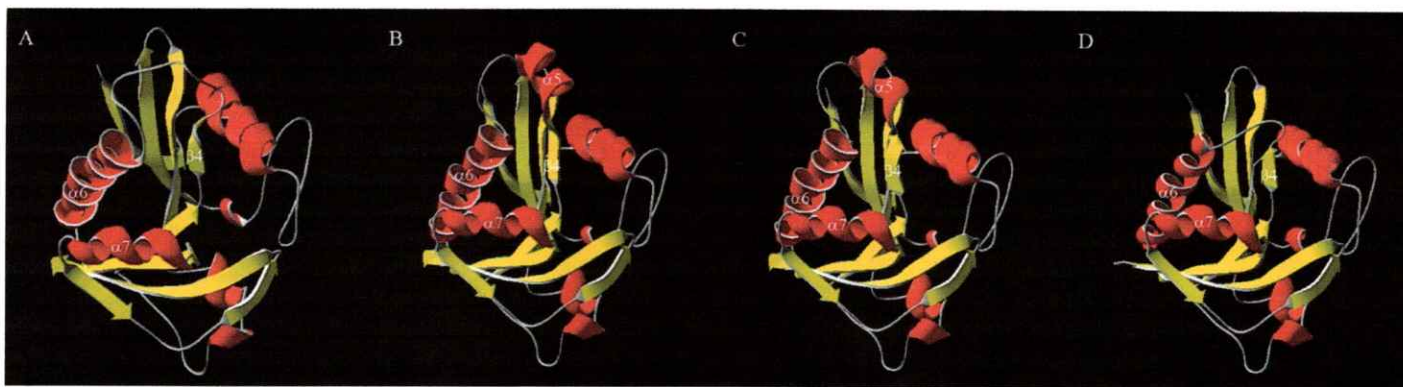


Figura 11. Modelos estructurales de las distintas mutantes de sustitución. **A**, Afel Silvestre; **B**, AfelM9(Expl); **C**, AfelM9(Esal); **D**, AfelM9(RhII).

En las mutantes Afel_{M9} (Expl), Afel_{M10} (Esal) y Afel_{M11} (Rhll) podemos observar la disminución o la pérdida de la síntesis de AHLs de cadena larga en comparación con Afel silvestre (figura 10A).

Además, podemos observar que la producción de AHLs con largo de cadena mediana parece ser afectada en el mutante Afel_{M11} (Rhll). Estos resultados muestran que estas tres mutantes producen AHLs cuya longitud de cadena acilo se asemeja ligeramente a las seleccionadas como sustrato por las sintasas Expl, Esal y Rhll.

Aunque todos estos resultados concuerdan con la hipótesis de trabajo, decidimos explorar la posibilidad de que otro motivo estructural de estas proteínas esté involucrado en la selección de la cadena acilo. Hasta la fecha, no existen estructuras cristalizadas de proteínas I con alguno de sus sustratos unido. Por otro lado, se ha descrito que el plegamiento de estas proteínas se parece a *N*-acetiltransferasas (Watson y col., 2002). En la base de datos MMDB (Molecular Modeling Data Base) existen disponibles estructuras de aciltransferasas cristalizadas en presencia de acil-CoA, ligando que comparte similitud estructural con la molécula de fosfopanteteína acilada presente en ACPs. Acil-CoAs de cadena larga (15 carbonos) han sido observadas en los cristales de dos aciltransferasas de levaduras (1IYK y 1IID). La estructura terciaria de la región aminoacídica que une el ligando en estas proteínas fue comparada con las estructuras cristalinas de LasI y Esal y con el modelo estructural de Afel. La región que aloja la acil-CoA en acil transferasas incluye al motivo estructural [β 4-lazo- α 6], sin embargo, el extremo acilo de este ligando limita con el lazo ubicado entre la hélice α 6 y la hoja β 5 (figura 12).

Para evaluar la participación del motivo [α 6-lazo- β 5] en la selectividad de sustrato para la síntesis de AHLs, se realizaron mutantes de sustitución de Afel en donde aminoácidos de la proteína silvestre fueron reemplazados por aminoácidos más voluminosos (leucina).

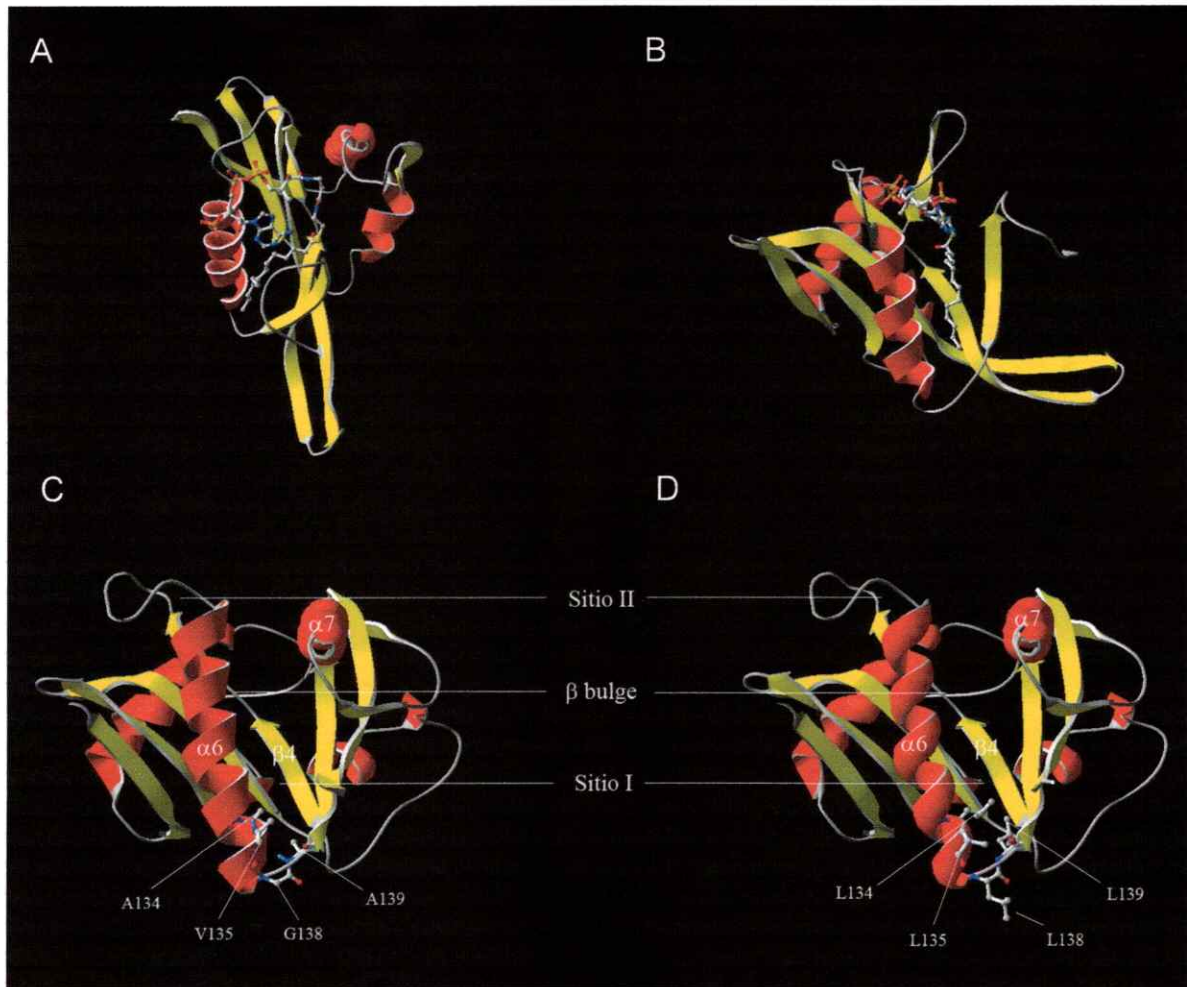


Figura 12. Similitud estructural entre el bolsillo de unión a acil-CoA en la N-miristoil-transferasa 1IYK de *Candida albicans* y el sitio I de Afel. En **A** y **B** se muestran distintas vistas de los primeros 200 aminoácidos de la N-miristoil-transferasa 1IYK. En **C** se muestra el modelo de Afel silvestre destacando los aminoácidos sustituidos por leucinas en el mutante Afel_{M16} (AVGA) (**D**). El resto de los mutantes de sustitución de este motivo en particular no fueron incluidos en la figura debido a que la orientación de los aminoácidos sustituidos es similar a las que se observan en el mutante Afel_{M16} (AVGA).

En la figura 10C podemos observar que en comparación con Afel silvestre, la mutante Afel_{M12} (G138L), muestra una disminución en la producción de AHLs de cadena larga, aunque se detectaron también AHLs de cadena mediana y corta. Por otro lado para las mutantes Afel_{M13} (A139L), Afel_{M14} (G138L; A139L), Afel_{M15} (V135L; G138L; A139L) y Afel_{M16} (A134L; V135L; G138L; A139L) sólo se detectaron AHLs de cadena corta.

5. Discusión

Los trabajos enfocados a determinar el mecanismo de reacción de las proteínas I han sido capaces de identificar aminoácidos conservados y esenciales para la actividad de estas enzimas (Hanzelka y col., 1997; Parsek y col., 1997; Watson y col., 2002; Gould y col., 2004). La mayoría de estos aminoácidos están ubicados en la región N-terminal, donde se han identificado dos zonas de importancia: el sitio de unión del SAM, uno de los dos sustratos, y una red de pares iónicos. El "docking" de SAM sobre el modelo de Afel permite postular a los aminoácidos F27, Q30 y W33 para la unión de SAM. Esto concuerda con el sitio de unión a SAM propuesto en el cristal de LasI (Gould y col., 2004) y con otras proteínas que unen SAM formando un "sándwich" de anillos aromáticos (Schubert y col., 2003). La similitud de estructura primaria, secundaria y terciaria entre LasI y el modelo de Afel, permite proponer que en Afel los aminoácidos R23, E42, D44, D47, R68 y R102 formarían una red de pares iónicos, la cual pone en contacto las hojas $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ con la hélice $\alpha 1$ y el lazo entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Se ha propuesto que uno de los roles de esta red iónica sería estabilizar zonas con alto grado de flexibilidad en el extremo N-terminal. Cabe señalar que los cristales de proteínas I han sido obtenidos dificultosamente debido a la flexibilidad que presentan zonas del extremo N-terminal. En este sentido, la estructura de Esal está incompleta ya que la disposición de los aminoácidos 16-27 no pudo ser determinada. Si bien la estructura de LasI está completa, la proteína cristalizada no es exactamente la que está codificada en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína cristalizada (llamada LasI Δ G) posee una sustitución de 6 aminoácidos en el extremo N-terminal, dando una menor flexibilidad a esta zona y posibilitando la cristalización de la proteína.

La estructura de Esal muestra que los aminoácidos E97 y S99, junto con participar de la red de pares iónicos, coordinan una molécula de H₂O. En la reacción de acilación el carbono 1 (C1) de la cadena acilo sufre un ataque nucleofílico por parte del grupo amino del SAM. La molécula

de H₂O o en su defecto la S99, servirían como base catalítica abstrayendo un protón del grupo amino del SAM (Watson y col., 2002). Junto con los aminoácidos R100 y F101, la S99 participa de un "β-bulge" que interrumpe la hoja β₄. Estos aminoácidos y esta estructura están conservados en LasI (aminoácidos S104, R104 y F105) (Gould y col., 2004). Los modelamientos de 3-oxo-C₆-fosfopanteteina en Esal y de 3-oxo-C₁₂-fosfopanteteina en LasI muestran que este "β-bulge" permitiría que los aminoácidos R100/R104 y F101/F105 formen puentes de hidrógenos con el oxígeno del grupo carbonilo del C1 de la cadena acilo, el que puede formar un oxianión durante la reacción de acilación del SAM. En el modelo de Afel, los aminoácidos S101, R102 y F103 también forman un "β-bulge" en el medio de la hoja β₄, el que podría tener funciones catalíticas similares a los "β-bulges" de Esal y LasI.

Es esperable que tanto el sitio catalítico como el sitio de unión a SAM se encuentren altamente conservados en proteínas I. El SAM es un sustrato común para todas las proteínas I y, por lo tanto, los aminoácidos que conforman su sitio de unión deben compartir un alto grado de similitud. A diferencia del SAM, las acil-ACPs son sustratos que poseen una región constante (ACP) y una variable (la cadena acilo), por lo que es posible que el sitio de unión a las acil-ACPs sea conservado en la región que interactúa con la parte protéica de acil-ACP y en algún grado distinto en la región que alberga la cadena acilo.

Las ACPs son transportadores universales de intermediarios acilados fundamentales en la síntesis de ácidos grasos. En bacteria, las ACPs son proteínas pequeñas que constan de aproximadamente 80 residuos de aminoácidos, cuya estructura primaria, secundaria y terciaria está altamente conservada (Byers y Gong, 2007). Los genomas bacterianos pueden poseer varios genes que codifiquen para ACPs. Tal es el caso de *P.aeruginosa*, donde se han caracterizado tres ACPs (ACP1, ACP2 y ACP3) (Raychaudhuri y col., 2004). Mediante ensayos de actividad con la sintasa de AHLs RhII se ha demostrado que, a pesar de la alta similitud que

existe entre ACPs, las proteínas I poseen cierta preferencia por algunas de ellas. Así por ejemplo, dentro de las tres ACPs de *P. aeruginosa*, ACP1 y ACP2 son los mejores sustratos para RhII en la síntesis de AHLs (Raychaudhuri y col., 2004). El genoma de *A. ferrooxidans* indica la presencia de dos genes que codificarían para ACPs, AFE_1148 y AFE_2243. Si bien las secuencias aminoacídicas de las proteínas que codificarían ambos genes comparten un alto grado de similitud con ACP1 y ACP2, AFE_1148 destaca con tener 70,7% y 47,6% de identidad con ACP2 y ACP1, respectivamente.

La alta similitud que comparten las ACPs de diferentes organismos hace pensar que su estructura terciaria muy probablemente es equivalente (Byers y Gong, 2007). En general, las ACPs constan de 3 hélices α largas ($\alpha1$, $\alpha2$ y $\alpha4$) y una corta ($\alpha3$). En el inicio de la hélice $\alpha2$ se encuentra el motivo conservado DSL, el cual es reconocido por fosfopanteteinil transferasas durante el traspaso de este grupo prostético a la ACP, donde el residuo de serina (S35 en ACP de *E. coli*) de este motivo es responsable de unir covalentemente la fosfopanteteina. Debido a su carácter ácido, las ACPs son proteínas sumamente flexibles. No obstante, estas proteínas pueden alcanzar cierta estabilidad por la coordinación de ciertos iones y por interacciones aminoácido-aminoácido y aminoácido-cadena acilo. De hecho, hay evidencias que revelan que por lo menos los primeros 6 u 8 carbonos de esta cadena están dentro de la cavidad que forman las hélices $\alpha2$, $\alpha3$ y $\alpha4$ (Mayo y Prestegard, 1985; Byers y Gong, 2007).

Hasta la fecha existen pocos cristales de ACPs bacterianas unidos al grupo prostético de fosfopanteteina y cadena acilo. La estructura de la ACP de *E. coli*, cuyo código de entrada en PDB es 1L0I, muestra una cadena acilo de 4 carbonos unida a la fosfopanteteina. Esta proteína comparte un alto grado de identidad y similitud con ACP1 de *P. aeruginosa* y AFE_1148 de *A. ferrooxidans*, por lo que proponemos que sus estructuras terciarias deben ser similares. De

hecho, la proteína Afel de *A. ferrooxidans* sobreexpresada en *E. coli* es capaz de utilizar ACPs de esta última bacteria como sustrato para la síntesis de AHLs (Farah y col., 2005).

Es conocido que las ACPs interactúan con una gran diversidad de proteínas gracias a su hélice $\alpha 2$, llamada "hélice de reconocimiento" (Byers y Gong, 2007). Se ha demostrado que dos residuos de aspartato (D35 y D38) que flanquean la serina (S36) responsable de la unión de fosfopanteteína, juegan un rol fundamental en la interacción electrostática entre las ACPs y otras proteínas. En LasI, se ha propuesto que residuos positivos ubicados en la hélice $\alpha 7$ estarían interactuando con la hélice $\alpha 2$ de ACP cargada negativamente (Gould y col., 2004). Por analogía, es posible atribuirle esta función a la hélice $\alpha 7$ de Afel, puesto que esta también posee residuos positivos (R152 y R156).

Si bien hay evidencia de que un residuo aminoacídico puede ser responsable de discriminar entre acil-ACPs con diferentes largos cadenas (Brader y col., 2005), la teoría de que este tipo de selección esté dada por el rol estérico de un bolsillo o cavidad, la cual involucra un conjunto de aminoácidos, parece ser más probable (Watson y col., 2002; Gould y col., 2004). Debido a la alta similitud estructural que hay entre aciltransferasas y proteínas I es que se ha propuesto que el sitio de unión de la cadena acilo es un bolsillo formado por las hojas $\beta 4$ y $\beta 5$ (Watson y col., 2002; Gould y col., 2004). Mientras que el modelamiento de 3-oxo- C_6 -fosfopanteteína en Esal muestra que el sitio de unión a la cadena acil sería una cavidad paralela y adyacente a la hoja $\beta 4$ (figura 4A), el modelamiento de 3-oxo- C_{12} -fosfopanteteína en LasI revela que si bien el sitio de unión a la cadena acilo comienza contiguo al " β -bulge" de la hoja $\beta 4$, continúa perpendicular a esta última estructura a lo largo de la hélice $\alpha 7$, pudiendo limitar finalmente con la hélice $\alpha 8$ (figura 4B).

A diferencia de los modelamientos realizados en Esal y Lasl, el análisis de “docking” realizado sobre Afel se efectuó sólo con la cadena acilo y no con acil-fosfopanteteina. Esto, junto con el alineamiento que muestra la figura 5, permitió proponer un nuevo posible sitio de unión a la cadena acilo correspondiente al motivo estructural [β 4-lazo- α 6] (sitio II, figura 6B). En esta tesis investigamos la participación del lazo ubicado entre la hoja β 4 y la hélice α 6 en la síntesis de AHLs mediante mutaciones sitio-dirigidas sobre Afel. La mayoría de las mutaciones se hicieron sobre aminoácidos no conservados, los cuales no han sido sujetos de investigación en trabajos anteriores. Todas las mutantes construidas son capaces de sintetizar AHLs, indicando que el sitio catalítico sigue activo. No obstante, existen diferencias en el patrón y, aparentemente, en la abundancia relativa de las AHLs producidas por las sintasas mutantes (figura 9).

Escisiones de 4 y 5 aminoácidos en la región del lazo ubicado entre la hélice α 6 y la hoja β 4 resultan en la disminución o pérdida de la producción de AHLs de cadena larga [figura 9A, mutantes Afel_{M1} (Δ AKMP), Afel_{M2} (Δ QAKM) y Afel_{M3} (Δ QAKMP)]. Es posible que la reducción de la disponibilidad espacial de la cavidad que forma el motivo [β 4-lazo- α 6] sólo permita entonces recibir acil-ACPs con cadena acilo mediana o corta. Por otra parte, el pequeño ensanchamiento de las manchas correspondientes a AHLs con largo de cadena mediana sugiere, en acuerdo con lo desarrollado anteriormente, un posible aumento en la producción de AHLs con este largo de cadena acilo. Ambos resultados apoyan nuestra hipótesis inicial de que la disponibilidad espacial del motivo [β 4-lazo- α 6] está involucrada en la selección del tamaño de la cadena acilo.

La mutante de escisión para 8 aminoácidos, Afel_{M4} (Δ LNGQAKMP), muestra sólo una mancha correspondiente a AHLs de cadena corta (figura 9B) lo que también está de acuerdo con la hipótesis planteada. Sin embargo, la evidente disminución del área de esta mancha en relación con la sintasa silvestre hace sospechar que esta mutación podría estar afectando negativamente la estructura de la proteína, disminuyendo la producción de todo el repertorio de

AHLs sin importar el tipo de cadena acilo. En cualquier caso, la diferencia entre los perfiles de AHLs producidos por este mutante y los producidos por los mutantes de escisión de 4 y 5 aminoácidos no se explica por una posible función individual específica llevada a cabo por los aminoácidos Leu-108, Asn-109 y/o Gly-110 [figura 9B, mutantes Afel_{M5} (Δ L), Afel_{M6} (Δ N), Afel_{M7} (Δ G) y Afel_{M8} (Δ LNG)]. Por lo tanto, la disminución de la producción de AHLs se debe a la ausencia conjunta de los 8 aminoácidos en el motivo [β 4-lazo- α 6]. El perfil de AHLs producido por el mutante Afel_{M7} (Δ G) muestra la presencia de AHLs de cadena larga, mediana y corta, en niveles más altos que los observados para la proteína silvestre, observándose incluso lo que pudiese ser una C₁₀-HSL (flecha negra, 9B). Este fenómeno es difícil de explicar ya que el aminoácido escindido, glicina, es pequeño volumétricamente hablando y su ausencia no debería afectar en demasía a la cavidad del motivo [β 4-lazo- α 6].

Los resultados obtenidos con la sustitución del motivo [β 4-lazo- α 6] de Afel por los presentados en Expl, Esal y Rhll apoyan el rol estérico que cumpliría este motivo. La proteína Esal de *P. stewartii* produce AHLs de cadena corta (3-oxo-C₆-HSL) y su motivo estructural [β 4-lazo- α 6] está interrumpido por la hélice α 5 (figura 4A). En el mutante Afel_{M10} (Esal) se escindieron la misma cantidad de aminoácidos que la que se incorporaron (tabla 5). Precisamente, estos aminoácidos incorporados son los que forman la hélice α 5 en Esal. Sugerimos que esta estructura acortaría espacialmente la cavidad y le otorgaría rigidez, volviéndola menos apropiada para encajar acil-ACPs de cadena larga.

En distintas cepas de *E. carotovora* se han descrito dos tipos de Expl. Una de estas es capaz de sintetizar mayoritariamente 3-oxo-C₈-HSL y la otra 3-oxo-C₆-HSL. La sustitución que posee el mutante Afel_{M9} (Expl) fue diseñada a partir de la secuencia aminoacídica de Expl perteneciente a *E. carotovora* EC CFBP 6272, la cual produce 3-oxo-C₈-HSL como el mayoritario. En el ensayo en CCF se observa la producción AHLs de cadena corta y mediana

(figura 9A). La sustitución incluye todos los aminoácidos pertenecientes al lazo e incluso residuos pertenecientes a la hélice $\alpha 6$. El alto porcentaje de similitud de secuencia entre Esal y Expl (43% identidad, 74% similitud) permite predecir la formación de la hélice $\alpha 5$ entre la hoja $\beta 4$ y la hélice $\alpha 6$ para Expl, por lo que atribuimos el cambio de abundancia relativa de AHLs al mismo fenómeno que se observa en el mutante Afel_{M10} (Esal), es decir, la disminución de la disponibilidad espacial en el motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$].

RhII de *P. aeruginosa* produce AHLs de cadena corta (C₄-HSL). Para poder simular el lazo de RhII en Afel, la construcción del mutante Afel_{M11} (RhII) constó de la escisión de 16 aminoácidos y la incorporación de sólo 6. El ensayo en CCF indica la pérdida de la producción de AHLs de cadenas largas y medianas correlacionándose con la producción descrita para RhII.

Los cambios en los perfiles de AHLs producidos por estos tres mutantes de sustitución pueden ser atribuidos a la reducción del tamaño del motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$] en comparación con Afel silvestre. Sin embargo, la mantención de la producción de C₈-HSL por parte de Afel_{M10} (Esal) y de C₆-HSL por parte de Afel_{M9} (Expl) y Afel_{M11} (RhII), indica que las características estructurales para selección de la longitud de la cadena acilo no parecen estar presentes en su totalidad en la disponibilidad espacial del motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$].

El cristal de LasI muestra que el bolsillo de unión a la cadena acilo podría limitar con la hélice $\alpha 8$ (figura 4B), la cual también jugaría un rol similar en Esal. En el modelo de Afel la hélice $\alpha 8$ está ausente, por lo que es fácil imaginar que si Afel utilizara el sitio de unión propuesto para la unión de cadena acilo en LasI (sitio I), esta cavidad permitiría encajar cadenas acilo independiente de su longitud, algo que parece lógico en una sintasa de AHLs de cadena larga como Afel. Estructuras de *N*-aciltransferasas de levaduras cristalizadas en presencia de acil-CoA (1IID y 1IYK) muestran similitud estructural con proteínas I a lo largo de la región [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$ -

lazo- $\beta 5$] (figura 10 A y B). Al igual que Afel, estas aciltransferasas tampoco poseen la hélice $\alpha 8$, sin embargo, la parte acilada de la CoA limita con el lazo ubicado entre la hélice $\alpha 6$ y la hoja $\beta 5$.

Tomando esto en cuenta, se diseñaron mutantes de sustitución que pudiesen disminuir el espacio que deja disponible esta cavidad. Las proteínas mutantes poseen sustituciones que involucran los aminoácidos G138 y A139, presentes en el vértice de la cavidad formada por la hélice $\alpha 6$ y la hoja $\beta 5$, y V135 y A134, ubicados hacia el final de la hélice $\alpha 6$ (figura 10 C y D).

Aunque todas estas mutantes disminuyen de manera evidente la producción de AHLs de cadena larga, es muy posible que se esté afectando la producción del repertorio completo de AHLs, algo similar a lo observado en el mutante Afe_{M4} (LNGQAKMP). La mutante que se ve menos afectada es Afel_{M12} (G). Esto se puede explicar porque la cadena lateral de leucina que reemplaza a la glicina 138 se orienta hacia afuera de la proteína (figura 10 D). Por el contrario, el resto de las mutantes [Afel_{M13} (A), Afel_{M14} (GA), Afel_{M15} (VGA) y Afel_{M16} (AVGA)] poseen por lo menos una leucina cuya cadena lateral se orienta hacia dentro de la cavidad formada por la hélice $\alpha 6$ y la hoja $\beta 5$, lo que podría afectar en demasía el plegamiento de Afel (figura 10 D).

Estos resultados no nos permiten apoyar ni descartar el sitio I propuesto por Gould y colaboradores como posible sitio de unión a la cadena acilo. En parte, esto se debe a la metodología utilizada para detectar la señal de AHLs. La técnica de detección mediante biosensor es una técnica cualitativa que tiene la ventaja de asegurar que las AHLs detectadas poseen actividad biológica, sin embargo, este ensayo no permite cuantificar la concentración de las AHLs en los extractos, entregando información sólo acerca de la presencia o ausencia de un tipo de AHL y de una relación de mayor o menor cantidad considerando el área de la mancha detectada en la CCF. En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis deben ser comprobados mediante la detección y cuantificación de las distintas AHLs producidas por los

distintos mutantes de Afel mediante, por ejemplo, HPLC acoplada a espectrometría de masas (Gould y col., 2006).

No obstante, los mutantes de escisión desarrollados durante este trabajo sugieren que la longitud del lazo comprendido entre la hoja $\beta 4$ y la hélice $\alpha 6$ y el volumen asociado al motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$] están involucrados en la selección del largo de la cadena acilo presente en acil-ACPs. Considerando el alto grado de similitud entre las ACPs de distintas bacterias Gram-negativas y en la capacidad de Afel de sintetizar AHLs utilizando acil-ACPs de *E. coli*, creemos que la interacción de estas proteínas es de carácter electrostático y que involucra los residuos D34 y D38 de la hélice $\alpha 2$ de la ACP y los residuos R152 y R156 de la hélice $\alpha 7$ de Afel (figura 11). Este modo de interacción ya ha sido propuesto con anterioridad para LasI (Gould y col., 2004). Para que esta interacción sea posible, la fosfopanteteina acilada debería ubicarse hacia el lado opuesto de la hélice $\alpha 7$ de Afel, es decir, orientada hacia el motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$]. Así mismo, para que el C1 de la cadena acilo se posicione cerca del sitio activo, la acil-fosfopanteteina debe pasar a través del motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$]. Mientras que este grupo prostético podría alojarse en la zona cercana al β -bulge, concordando con el sitio propuesto para fosfopanteteina en la estructura cristalina de Esal (Watson y col. 2002), la cadena acilo podría ubicarse dentro del motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$], tal y como lo muestra el "docking" de una cadena de 14 carbonos sobre Afel (figura 6A).

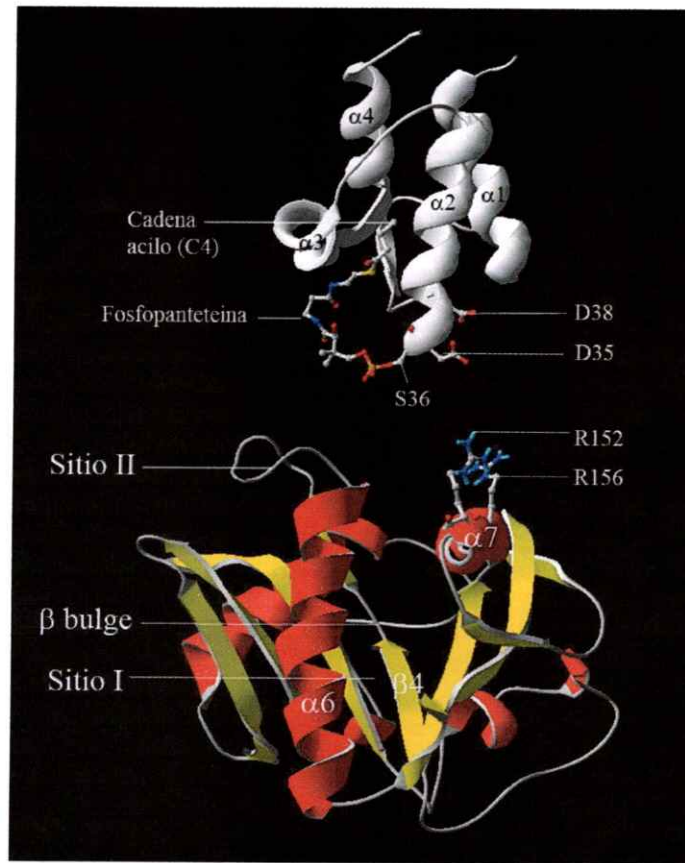


Figura 13. Modelo propuesto para la interacción entre acil-ACPs y Afel. En gris se muestra la ACP de *E. coli* (1L0I), destacándose el residuo de serina 36 unido al grupo prostético de fosfopanteteina y los residuos de aspartato 34 y 38 los que podrían interactuar con las argininas 152 y 156 de Afel.

6. Conclusiones

1.- La técnica de mutación sitio-dirigida independiente de ligasa, SLIM, resulta ser una herramienta simple y útil para el estudio de la participación de motivos particulares y/o aminoácidos puntuales en la función que desempeñan proteínas como las sintasas de AHLs. Como resultado de este trabajo se logró la construcción de 16 plasmidios que contienen genes mutantes para el gen *afel*. Cada gen fue exitosamente expresado en *E. coli* y las distintas versiones mutantes de la proteína Afel muestran actividad AHLs sintasa.

2.- El lazo ubicado entre la hoja $\beta 4$ y la hélice $\alpha 6$ de Afel participa en la síntesis de AHLs, aparentemente, en la selección del sustrato acil-ACP. Probablemente la longitud de este lazo, y por consiguiente, el espacio disponible en el motivo [$\beta 4$ -lazo- $\alpha 6$] podría discriminar entre acil-ACPs con diferente largo de cadena acilo.

3.- Metodologías más precisas son necesarias para la validación del modelo propuesto, poniendo especial énfasis en la técnica de cuantificación de AHLs. No obstante, los resultados de este trabajo junto con la literatura referente al sustrato acil-ACP, permiten proponer al sitio II de Afel como un nuevo sitio de unión y selección para la cadena acilo, y a la hélice $\alpha 7$ como responsable de la interacción con la hélice $\alpha 2$ de ACPs.

7. Referencias

- Banderas, A. 2008. Desarrollo de herramientas para monitorear la expresión del gen *afel* de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sus productos. Seminario de título. Departamento de Biología. Facultad de ciencias. Universidad de Chile.
- Byers D.M., Gong H. 2007. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Biochem. Cell Biol.* **85**:649-62.
- Bertani, I. y Venturi, V. 2004. Regulation of the N-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA. *Appl Environ. Microbiol.* **70**: 5493-502.
- Brader, G., Sjoblom, S., Hyytiainen, H., Sims-Huopaniemi, K. y Palva, E.T. 2005. Altering substrate chain length specificity of an acylhomoserine lactone synthase in bacterial communication. *J. Biol. Chem.* **280**: 10403-9.
- Cao, J.G. y Meighen, E.A. 1993. Biosynthesis and stereochemistry of the autoinducer controlling luminescence in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **175**: 3856-62.
- Chilton, M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P., Nester, E.W. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**:3672-6.
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L. y Hughson, M.F. 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature.* **415**: 545-9.
- Chiu, J., March, P.E., Lee, R. y Tillett, D. 2004. Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic. Acids. Res.* **32**: e174.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. y Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-8.
- Eberhard, A. 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* **109**: 1101-5.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. y Poole, K. 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **180**: 5443-7.
- Farah, C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A. y Guilian, N. 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7033-40.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. y Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**: 269-75.
- Gonzalez, J.E. y Marketon, M.M. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol Rev* **67**: 574-92.
- Gould, T.A., Schweizer, H.P. y Churchill, M.E. 2004. Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserinelactone synthase LasI. *Mol. Microbiol.* **53**: 1135-46.

- Gould, T.A., Herman, J., Krank, J., Murphy, R.C., y Mair Churchill, M. 2006. Specificity of Acyl-Homoserine lactone synthases examined by mass spectrometry. *J. bacteriol.* **188**: 773-783.
- Gray, K.M. y Garey, J. R. 2001. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**: 2379-87.
- Hanzelka, B.L. y Greenberg, E.P. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 5291-4.
- Hanzelka, B.L., Stevens, A.M., Parsek, M.R., Crone, T.J. y Greenberg, E.P. 1997. Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J. Bacteriol.* **179**: 4882-7.
- Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J. H., Gehrke, T. y Sand, W. 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* *Hydrometallurgy* **8**:3245-3254.
- Hastings, J.W. y Nealson, K.H. 1977. Bacterial bioluminescence. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 549-95.
- Higgins, D.A., Pomianek, M.E., Kraml, C.M., Taylor, R.K., Semmelhack, M.F. y Bassler, B.L. 2007. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature*. **450**: 883-6.
- Huber, B., Riedel, K., Hentzer, M., Heydorn, A., Gotschlich, A., Givskov, M., Molin, S. y Eberl, L. 2001. The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**: 2517-28.
- Kaplan, H.B. y Greenberg, E.P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**: 1210-4.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M. y Kjelleberg, S. 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **186**: 692-8.
- Laue, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F. y Williams, P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the Rhizobium small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** (Pt 10): 2469-80.
- Lazdunski, A.M., Ventre, I. y Sturgis, J.N. 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev. Microbiol.* **2**: 581-92.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski-Dye, F., Williams, P., Downie, J.A. 2000. The regulatory locus cinRI in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol. Microbiol.* **37**:81-97.
- Luo, Z.Q., Clemente, T.E. y Farrand, S.K. 2001. Construction of a derivative of *Agrobacterium tumefaciens* C58 that does not mutate to tetracycline resistance. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **14**: 98-103.
- Mayo, K.H. y Prestegard, J.H. 1985. Acyl carrier protein from *Escherichia coli*. Structural characterization of short-chain acylated acyl carrier proteins by NMR. *Biochemistry* **24**: 7834-8.

- More, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. y Winans, S.C. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**: 1655-8.
- Nealson, K.H. y Hastings, J.W. 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* **43**: 496-518.
- Nealson, K.H. y Markovitz, A. 1970. Mutant analysis and enzyme subunit complementation in bacterial bioluminescence in *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* **104**: 300-12.
- Parsek, M.R., Schaefer, A.L. y Greenberg, E.P. 1997. Analysis of random and site-directed mutations in *rhII*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Mol. Microbiol.* **26**: 301-10.
- Parsek, M.R. y Greenberg, E.P. 1999. Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Methods Enzymol.* **310**: 43-55.
- Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr. y Greenberg, E.P. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 4360-5.
- Pearson, J.P., Van Delden, C. y Iglewski, B.H. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**: 1203-10.
- Pronk, J.T., Meulenberg, R., van den Berg, D.J., Batenburg-van der Vegte, W., Bos, P. y Kuenen, J.G. 1990. Mixotrophic and Autotrophic Growth of *Thiobacillus acidophilus* on Glucose and Thiosulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3395-3401.
- Rawlings, D. E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:65-91.
- Raychaudhuri A., Jerga A., y Tipton P. 2004. Chemical Mechanism and Substrate Specificity of RhII, an Acylhomoserine Lactone Synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry.* **44**: 2974-2981.
- 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.
- Ruiz, L. M., Gonzalez, A., Frezza, M., Soulere, L., Queneau, Y., Doutheau, A., Rohwerder, T., Sand, W., Jerez, C. A., y Guillani N. 2007. Is the quorum sensing type AI-1 system of *Acidithiobacillus ferrooxidans* involved in its attachment to mineral surfaces? *Adv. Mater. Res.* **20-21**:345-349.
- Sakuragi, Y. y Kolter, R. 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**: 5383-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Eberhard, A. y Greenberg, E.P. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. *J. Bacteriol.* **178**: 2897-901.
- Shaw, P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Jr., Rinehart, K.L. y Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* **94**: 6036-41.

- Schubert, H.L., Blumenthal, R.M., y Cheng, X. 2003. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 329–35.
- Sitnikov, D.M., Schineller, J.B. y Baldwin, T.O. 1995. Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol. Microbiol.* **17**: 801-12.
- Taga, M.E. y Bassler, B.L. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100 Suppl 2**: 14549-54.
- Val, D.L. y Cronan, J.E., Jr. 1998. In vivo evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. *J. Bacteriol.* **180**: 2644-51.
- Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., von Bodman, S.B. y Churchill, M.E. 2002. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol. Cell.* **9**: 685-94.
- Waters C. M. y Bassler B. L. 2005. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:319–46.
- Winans, S.C. y Bassler, B.L. 2002. Mob psychology. *J. Bacteriol.* **184**: 873-83.