

UCH-FC
Biotecnología
W 373
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL SECRETOMA DE
Acidithiobacillus ferrooxidans ATCC 23270 SOBRE SU VELOCIDAD DE
CRECIMIENTO**

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

Juan Pablo Weber Giménez

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

Enero 2014
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Juan Pablo Weber Giménez**.

“EFECTO DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL SECRETOMA DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 SOBRE SU VELOCIDAD DE CRECIMIENTO”

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

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

Firma manuscrita en tinta negra del Dr. Carlos A. Jerez Guevara, sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Julieta Orlando
Presidente Comisión:

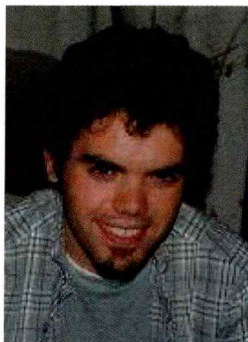
Firma manuscrita en tinta azul de la Dra. Julieta Orlando, sobre una línea horizontal.

Dr. Nicolás Guiliani
Evaluador:

Firma manuscrita en tinta azul del Dr. Nicolás Guiliani, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, 28 de Enero, 2014

BIOGRAFIA



Nací en el seno de una familia incipiente, por allá por la década de Los Prisioneros, los Creminos, la Cherry Cola y el Tata Colores. Recibí mi nombre por un Papa de ahora dudosa reputación, pero muy querido en su tiempo, que siempre lo muestran hablando en el Estadio Nacional cuando habla de no tener miedo, pero nunca cuando lo pifean. Crecí en varias comunas (y una región extra), viendo monos en la TV casi todo el día, o en su defecto jugando a la pelota en la plaza con mi camiseta del Colo-Colo. Me gustaba más ver TV y esperar a que dieran *Dragon Ball*. También de repente agarraba los atlas o las enciclopedias y me ponía a hojearlos. Leía a veces. Me gustaban más los colores brillantes. Salí de enseñanza media del Instituto Nacional, colegio que no sé por qué genera tanta nostalgia en sus ex-alumnos. Fui un alumno promedio. No me gustó mucho pasar por ahí, pero lo hecho, hecho está, y para aprender en la vida no hay que cometer los errores del pasado. Me fue bien en la PSU (ambas que di). En la U no tan bien. Me costó pero ya estoy terminando. Lo mejor que me dejó fue la oportunidad de realizar voluntariados y poder conocer una realidad que no se ve en la TV. Y cuando se ve, no se siente. Y cuando se siente, no es tan preocupante porque uno sabe que en menos de dos semanas se va para la casa. Ahora tengo otros objetivos que no se relacionan con lo que estudié.

A Priscilla
A mi familia
A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi polola, Priscilla, que en este último año y unos cuantos meses más ha estado apoyándome de forma incondicional en todos los aspectos de mi vida, a pesar de que ella ha tenido problemas difíciles de solucionar, entre los dos nos enfrentamos a las dificultades como un equipo. Nunca se me va a olvidar la maratón de maquetas. Te amo, Priscilla. Quiero agradecer a mi familia por la paciencia y soportarme el estrés que ha significado estos años de universidad. Agradecer a mis compañeros de clases que obviamente son considerados como mis amigos, con los que compartimos alegrías y alcohol en tantos carretes. Jaime, Bryan, Mauro, Morocco, Nico, Carlos, Yorka, Toya, Mary, Sofi, Vale, Marjo y Dani, ya casi no nos vemos las caras pero cada par de meses hacemos el esfuerzo jaja. Se les quiere montones. A mis compañeros de laboratorio, en especial a Claudio y a Arrhenius por las discusiones científicas y las palabras de apoyo en los momentos difíciles, cuando uno parece estar dando vuelta en círculos y no encuentra la salida del laberinto. Al profesor Jerez, que me soportó la demora en el seminario y que siempre salía de su oficina para conversar y relajarse por unos minutos. Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Biografía	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Índice de contenidos	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción.....	1
1.1 Hipótesis.....	13
1.2 Objetivos.....	13
2. Materiales y métodos.....	14
2.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	14
2.2 Monitoreo del crecimiento celular.....	14
2.3 Obtención de las proteínas extracelulares.....	14
2.4 Clonamiento y expresión de las proteínas heterólogas	15
2.5 Determinación del efecto de las proteínas seleccionadas.....	17
2.6 Análisis bioinformáticos	18
3. Resultados.....	20
3.1 Obtención de las proteínas del secretoma.....	20

3.2	Clonamiento y expresión recombinante de genes de interés.....	22
3.3	Determinación del efecto de las proteínas seleccionadas.....	27
3.4	Análisis bioinformáticos.....	28
3.4.1	Alineamiento de secuencias de AfPstS-1 y AfPstS-2.....	29
3.4.2	Modelamiento de la estructura de AfPstS-1 de <i>A. ferrooxidans</i> ..	30
3.4.3	Identificación de proteínas homólogas a AfPstS-1	33
3.4.4	Alineamientos de los contextos genómicos de los homólogos de <i>pstS1</i> y <i>pstS2</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	35
4.	Discusión	40
4.1	Obtención de las proteínas del secretoma	40
4.2	Clonamiento y expresión recombinante de genes de interés	42
4.3	Determinación del efecto de las proteínas seleccionadas.....	42
4.4	Análisis bioinformáticos.....	49
5.	Conclusiones	54
6.	Bibliografía	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Identificación de los componentes del secretoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en azufre elemental10
Tabla 2.	Secuencias de los partidores utilizados para amplificar los genes escogidos.....16
Tabla 3.	Presencia de PstS en las diferentes bacterias identificadas en las búsquedas de identidad de secuencia en las bases de datos disponibles.45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo propuesto para la oxidación del azufre por <i>A. ferrooxidans</i>	3
Figura 2.	Mecanismos de solubilización de los sulfuros metálicos.....	4
Figura 3.	NEPHGE bidimensional del extracto total de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 cultivado en azufre elemental y de su secretoma obtenido por TPP.....	8
Figura 4.	Efecto del extracto extracelular de <i>A. ferrooxidans</i> y de <i>A. thiooxidans</i> sobre el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i>	9
Figura 5.	Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 en medio 9K con perlas de azufre como sustrato.....	20
Figura 6.	Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes de proteínas del secretoma obtenida por TPP.....	21
Figura 7.	Ensayo funcional del extracto del secretoma.....	22
Figura 8.	Amplificación de los genes <i>pstS1</i> , AFE_0043 y <i>tth</i>	23
Figura 9.	Determinación de la direccionalidad de los insertos en el vector pGEM-T Easy.....	24
Figura 10.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la fracción total de <i>E. coli</i> posterior a la inducción de la expresión.....	25
Figura 11.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de los extractos solubles libres de células de <i>E. coli</i> posterior a la inducción de la expresión.....	26
Figura 12.	Ensayo de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de extractos proteicos de AFE_0043 y TTH.....	27

Figura 13.	Ensayo de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de extractos proteicos del secretoma, PstS1 y el control negativo.....	28
Figura 14.	Alineamiento de PstS-1 y PstS-2 de <i>A. ferrooxidans</i> con PstS de <i>E. coli</i>	30
Figura 15.	Modelo estructural de PstS-1 de <i>A. ferrooxidans</i> según el alineamiento con PstS-1 de <i>M. tuberculosis</i>	31
Figura 16.	Alineamiento estructural de PstS-1 con PstS-2 de <i>A. ferrooxidans</i>	32
Figura 17.	Distribución de carga en la superficie de PstS-1 de <i>A. ferrooxidans</i>	33
Figura 18.	Alineamiento múltiple de secuencias de PstS de diferentes bacterias con PstS-1 de <i>A. ferrooxidans</i> como referencia.....	34
Figura 19.	Alineamiento de contextos genómicos de diferentes bacterias con <i>pstS1</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 como referencia.....	37
Figura 20.	Alineamiento de contextos genómicos de diferentes bacterias con <i>pstS2</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 como referencia.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC : Casete de unión a ATP, por sus siglas en inglés "ATP binding cassette".
- ADN : Ácido Desoxirribonucleico
- AHL: Acil-homoserinas lactonas
- ATCC : Colección Americana de Cultivos Tipo, por sus siglas en inglés "American Type Culture Collection"
- ATP: Adenosín trifosfato
- COCHILCO: Comisión Chilena del Cobre
- PVDF: Polifluoruro de vinilideno
- IPTG: Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- LB: Luria-Bertani
- LPS: Lipopolisacáridos
- NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica, por sus siglas en inglés "National Center for Biotechnology Information"
- NEPHGE: Electroforesis en gradiente de pH sin alcanzar el equilibrio.
- PDB: Banco de Datos de Proteínas, por sus siglas en inglés "Protein Data Bank"
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés "Polymerase Chain Reaction"
- PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PQQ: Pirroloquinolina quinona

PRMM: Solución rojo de pirogalol-molibdato-metanol

QS: Quorum Sensing

TAT: Translocación por argininas-gemelas, por sus siglas en inglés "Twin-Arginine Translocation"

TCA: Ácido tricloroacético

TPP: Partición en tres fases, por sus siglas en inglés "Three Phase Partitioning"

TTH: Tetrionato hidrolasa

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

La minería es el pilar principal de la economía chilena ya que, según las estadísticas del Ministerio de Minería, al año 2013 el cobre y sus derivados representaba el 57% de las exportaciones nacionales. Debido a esto, se han hecho grandes esfuerzos por desarrollar sistemas que permitan un procesamiento eficaz y de bajo costo de los minerales en bruto en el ámbito de la minería del cobre. Uno de los sistemas desarrollados es la utilización de un consorcio bacteriano que es capaz de solubilizar el cobre presente en los minerales extraídos mediante el proceso conocido como biolixiviación. Una de las bacterias presentes en el consorcio bacteriano es *Acidithiobacillus ferrooxidans*, microorganismo que ha sido estudiado con el objetivo de comprender el rol que juega en la biolixiviación para poder potenciar su participación en ésta y así lograr que el proceso tenga nuevos niveles de eficacia. Previamente, se describió en nuestro laboratorio que un extracto del secretoma obtenido de un cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre es capaz de acortar la etapa de retraso del crecimiento al agregarse a otro cultivo inicial de la misma bacteria. El objetivo de este Seminario de Título fue identificar algunos de los componentes del secretoma que permitan reproducir este fenómeno. Para ello se seleccionaron proteínas individuales y específicas del secretoma de *A. ferrooxidans* para clonarlas y expresarlas en *Escherichia coli*. Estos extractos libres de células con proteínas de *A. ferrooxidans* se utilizaron para analizar su efecto sobre el crecimiento de *A. ferrooxidans*. Se encontró que la proteína del secretoma PstS-1 generó un efecto

sobre el crecimiento similar al obtenido con el secretoma completo. Esta proteína posiblemente forma parte del regulón *Pho* implicado en la captación de fosfato inorgánico, como en otros organismos acidófilos y neutrófilos. Posee una estructura globular similar a su homólogo de *Mycobacterium tuberculosis* con la que comparte una alta identidad, sobretodo en el sitio de unión a fosfato que está conservado. A futuro será interesante realizar experimentos para lograr establecer el efecto de PstS-1 en el crecimiento de *A. ferrooxidans* en minerales sulfurados de cobre como la calcopirita, y la posibilidad de un desarrollo aplicable en la biominería.

ABSTRACT

The mining industry represents the most important income for the Chilean economy, with copper and its derivatives accounting for 57% of all Chilean exports. For this reason, a great effort has been made to develop of systems allowing an efficient processing of ores at low cost in the realm of copper mining. One of the developed systems is the utilization of a bacterial consortium that is capable of copper solubilization from the ores extracted from the mines, in a process known as bioleaching. One of the bacteria present in this consortium is *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a microorganism that has been studied to understand its role in the bioleaching process, and then to potentiate its activity in copper solubilization to new levels of efficiency. Previously, in our laboratory was described that an *A. ferrooxidans* secretome extract obtained from a culture grown in elemental sulfur is capable of shortening the lag phase when added to an initial culture of the same bacteria. The aim of this work was to identify the secretome components that allow to reproduce this phenomenon. Individual and specific proteins of the secretome from *A. ferrooxidans* were selected to clone and express them in *Escherichia coli*. These cell-free extracts containing the overexpressed proteins were used to analyze its effect on the growth of *A. ferrooxidans*. It was found that the secretome protein PstS-1 generated an effect on growth similar to that obtained with the full secretome. This protein possibly belongs to the *Pho* regulon involved in inorganic phosphate uptake, as in other acidophilic and neutrophilic organisms. It has a globular structure similar

to its homologous of *Mycobacterium tuberculosis* with which shares a high identity, particularly in the phosphate binding site that is conserved. It will be interesting to conduct future experiments to determine the effect of PstS-1 in the growth of *A. ferrooxidans* in sulphide minerals like chalcopyrite and the possibility to develop an application to biomining.

1. INTRODUCCIÓN

La minería es el mayor pilar económico del país, en donde las exportaciones de cobre han sido la principal fuente de ingresos nacionales durante las últimas décadas. Se calcula que para el año 2013, Chile tendrá una producción de 5,53 millones de toneladas métricas de cobre mina, representando un aumento de 98.000 toneladas métricas respecto al año 2012, y para 2014 se prevé un volumen de 5,69 millones de toneladas métricas de cobre mina, lo que se traduce en un crecimiento de 2,9% respecto a lo estimado para el presente año (COCHILCO, 2013a). Este incremento de la producción se asocia a la gran inversión tanto privada como pública, estimada en cerca de US\$ 55.000 millones para el período comprendido entre los años 2013 y 2017, la cual va acompañada de desarrollo científico que se traduce en la aplicación de nuevas tecnologías que irán en beneficio de una producción más eficiente, segura y con menor riesgo ambiental (COCHILCO, 2013b).

Al día de hoy, la gran mayoría de los metales son obtenidos y refinados desde los minerales en bruto mediante el proceso de pirometalurgia, procedimiento que funciona a base de la utilización del calor y que además requiere altos niveles de metales en los minerales, por lo que su utilización con minerales de baja ley resulta no rentable.

Debido a esto, surge la necesidad de desarrollar nuevas metodologías que apoyen el desarrollo de la industria cuprífera, otorgando mayor eficiencia e inocuidad al medio ambiente. De estas necesidades nace la biolixiviación, en donde se convierten los minerales insolubles, como un sulfuro metálico a su forma soluble: el sulfato metálico, e

involucra agentes biológicos como intermediarios para la solubilización del cobre (Rawlings, 2002), el cual se recupera mediante una electro obtención eficiente a partir de minerales de cobre de baja ley (Jerez, 2011; 2013).

En la actualidad los procesos de biominería involucran la oxidación de metales pesados presentes en sulfuros metálicos como la piritita (FeS_2) y la calcopirita (CuFeS_2) y la mayoría de las operaciones comerciales de biolixiviación se llevan a cabo por consorcios de diversas bacterias acidófilas y quimiolitotóxicas, entre las cuales se encuentran *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*, entre otras bacterias acidófilas pertenecientes al género *Acidiphilum* y arqueas (Rawlings y Kusano, 1994).

A. ferrooxidans es reconocida como la primera bacteria descubierta capaz de oxidar minerales, oxidando tanto el hierro como los compuestos reducidos de azufre presentes en los minerales (Rawlings, 2002). *A. ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa, un miembro del subgrupo de las γ -proteobacterias, con un pH de crecimiento óptimo entre 1,5 y 2,5. Para la obtención de energía puede utilizar la oxidación aeróbica del ion ferroso Fe(II) , azufre elemental, compuestos de azufre parcialmente oxidados (Pronk y col., 1990), hidrógeno molecular (Dobner y col., 1990) y ácido fórmico (Pronk y col., 1991).

Debido a esto es importante el estudio de las vías metabólicas y energéticas relacionadas con el crecimiento y las adaptaciones fisiológicas de *A. ferrooxidans*, puesto que se le considera como uno de los miembros más importantes del consorcio presente en los procesos de biolixiviación (Rawlings y Kusano, 1994).

Según un modelo de la oxidación del azufre que se desarrolla en el espacio periplasmático propuesto con anterioridad (Rohwerder y Sand, 2007), el azufre elemental (S_8) es transportado hacia el espacio periplasmático por medio de proteínas que poseen grupos tioles ($R-SH$) capaces de reaccionar con el azufre, para luego ser oxidado por una azufre dioxigenasa (SDO), dando sulfito como producto, el cual es oxidado a sulfato por una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SAR), que muy posiblemente usa citocromos como aceptores de electrones. El sulfuro libre es oxidado a azufre elemental separadamente por una deshidrogenasa que usa quinonas comoceptor de electrones (SQR) que en condiciones abióticas reacciona con sulfito y produce tiosulfato, que por una tiosulfato:quinona oxidoreductasa (TQO) es transformada a tetrationato, que es hidrolizado por una enzima tetrationato hidrolasa (TTH) dando como productos azufre elemental y sulfato (Fig.1).

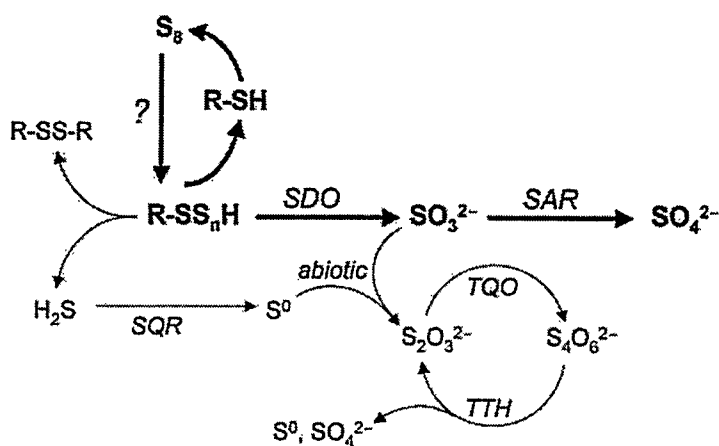


Figura 1. Modelo propuesto para la oxidación del azufre por *A. ferrooxidans* (Rohwerder y Sand, 2007).

Se han propuesto dos mecanismos para la disolución de sulfuros metálicos mediada por bacterias: el mecanismo indirecto y el directo (Tuovinen, 1990). En el

mecanismo indirecto son los iones férricos los que disuelven el mineral. Sin embargo, se han planteado dos diferentes vías por las cuales este mecanismo ocurriría: i) la vía del tiosulfato; y ii) la vía de los polisulfuros (Fig. 2) (Schippers y Sand, 1999).

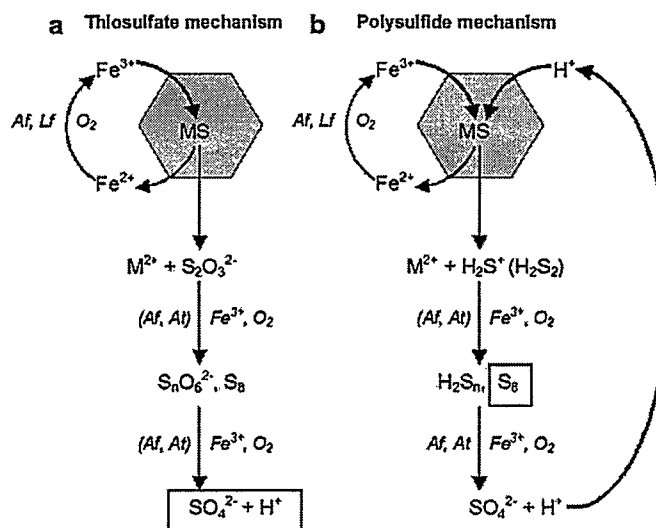


Figura 2. Mecanismos de solubilización de los sulfuros metálicos (MS). *Af*: *A. ferrooxidans*, *Lf*: *L. ferrooxidans*, *At*: *A. thiooxidans* (Vera y col., 2013).

En la vía del tiosulfato, la solubilización del metal ocurre luego del ataque de los iones férricos al sulfuro metálico, generándose tiosulfato como principal intermediario y sulfato como producto final. Este mecanismo ocurre sobre sulfuros metálicos insolubles en ácido e implica la solubilización del metal gracias al ataque combinado de iones férricos y protones, siendo el intermediario principal el azufre elemental que luego puede ser oxidado a sulfato por microorganismos oxidadores de azufre como *A. thiooxidans* y *Acidithiobacillus caldus*. El ion ferroso generado puede ser reoxidado a ion férrico por microorganismos como *A. ferrooxidans* o bacterias de los géneros *Leptospirillum* o *Sulphobacillus*. Este proceso se asocia a la oxidación de sulfuros

metálicos solubles en ácido como la esfalerita (ZnS), calcosina (Cu₂S) o galena (PbS). Otro papel asociado a los microorganismos es proporcionar el ácido sulfúrico, de modo que los protones faciliten la oxidación del hierro(II) y lo mantengan en forma férrica a fin de que éste realice el ataque oxidativo en contra del mineral (Schippers y Sand, 1999; Crundwell, 2003).

En el mecanismo directo, la bacteria ataca el mineral enzimáticamente, para lo cual necesita de la estrecha interacción y de la adherencia del microorganismo al sustrato sólido, de manera que la adherencia es un paso previo al proceso de oxidación (Brierley, 1978). Se ha visto que *A. ferrooxidans* se adhiere a la superficie de varios sustratos sólidos como azufre (Espejo y Romero, 1987; Ceskova y col., 2002) y sulfuros metálicos (Devasia y col., 1993; Myerson y Kline, 1983).

Para el desarrollo de la biolixiviación, uno de los pasos críticos es la adherencia bacteriana al sustrato sólido, donde juegan un papel importante las interacciones hidrofóbicas (Devasia y col., 1993; Solari y col., 1992) tanto como las hidrofílicas (Ohmura y col., 1993). Particularmente para las bacterias Gram-negativas, participan protagónicamente en la adherencia los lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa y las proteínas que son parte del secretoma bacteriano, en donde la mayoría de las proteínas destinadas a abandonar el citoplasma, una vez que su estructura primaria ha sido sintetizada, son reconocidas para la exportación gracias a un péptido señal en su extremo N-terminal por el sistema de secreción Sec, cuyos componentes se encuentran altamente conservados (Tjalsma y col., 2000). El perfil de proteínas en la superficie celular en *A. ferrooxidans* está determinado principalmente por la diferencia de los sustratos de medio del cultivo y por otros factores como temperatura, pH, osmolaridad,

etc. (Amaro y col., 1993; Arredondo y col., 1994). El cambio de las proteínas superficiales puede ser regulado por un mecanismo elaborado para adaptarse a la utilización del sustrato, sin estar éste bien identificado (Arredondo y col., 1988; Amaro y col., 1992; Ohmura y col., 1996).

Se sabe que las proteínas extracelulares bacterianas cumplen funciones trascendentales como son la provisión de nutrientes, adherencia a sustratos, comunicación célula-célula, desintoxicación, virulencia, etc. (Antelmann y col., 2001). El secretoma por definición comprende a las proteínas secretadas y su maquinaria de secreción (Tjalsma y col., 2000), siendo las proteínas secretadas aquellas que son exportadas desde el citoplasma al medio extracelular. Diversos resultados apoyaron la idea que la información para el destino subcelular de las proteínas estaba provisto por su composición de aminoácidos (Nakashima y Nishikawa, 1994; Schneider, 1999).

Las proteínas una vez sintetizadas pueden ser destinadas a varios compartimentos subcelulares dependiendo de la presencia o no del péptido señal en el extremo N-terminal y de señales de retención específicas. La mayoría de las proteínas bacterianas destinadas a abandonar el citoplasma se exportan a través del sistema Sec (Secretary), cuyos componentes se encuentran altamente conservados (Tjalsma y col., 2000). Muchas de estas proteínas inmaduras exportadas se sintetizan como precursores con su péptido señal en el extremo N-terminal, los cuales son reconocidos por factores solubles específicos para su transporte y translocación a través de la membrana. Luego de esta translocación, el péptido señal es removido, lo cual resulta en la liberación de la proteína desde la membrana, adquiriendo inmediatamente después de esto su conformación final (Antelmann y col., 2001).

Se han reportado otros mecanismos para la exportación de algunas proteínas como las señales de secreción del sistema TAT (Twin Arginine Translocation) que transporta proteínas ya plegadas (Berks y col., 2005), señales de lipoproteínas y transportadores ABC (ATP Binding Cassette) (Fekkes y Driessen, 1999). También se ha identificado un sistema para la exportación de proteínas desde el citoplasma que se denominó Sistema de Secreción tipo No Clásico (Bendtsen y col., 2005).

Watt y colaboradores (2005) afirman que existen dos grupos de proteínas secretadas, luego de analizar el proteoma de la bacteria fitopatogénica Gram-negativa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100: i) las proteínas activamente secretadas que comprenden enzimas extracelulares y proteínas que unen nutrientes y apéndices celulares, siendo su secreción y síntesis regulada por la densidad celular o el sustrato y, ii) proteínas que cumplen su función en el citoplasma y que no son activamente secretadas pero que son liberadas al espacio extracelular por lisis o bien otro mecanismo desconocido. Junto con esto proponen que la presencia de proteínas de la membrana externa en el espacio extracelular puede deberse a que algunas proteínas no se insertan bien en la membrana o que existe una digestión parcial por parte de proteasas. Algunas funciones encontradas en este proteoma extracelular son: adquisición de elementos traza, enzimas degradativas, enzimas metabólicas, chaperonas y proteínas de membrana externa.

Previamente, en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, se caracterizó de forma parcial el secretoma de un cultivo de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en condiciones aeróbicas con azufre elemental como sustrato, el cual fue obtenido por medio del

proceso de partición en tres fases (TPP por sus siglas en inglés: Three Phase Partitioning) (Jerez y Pagliai, 2009) (Fig. 3).

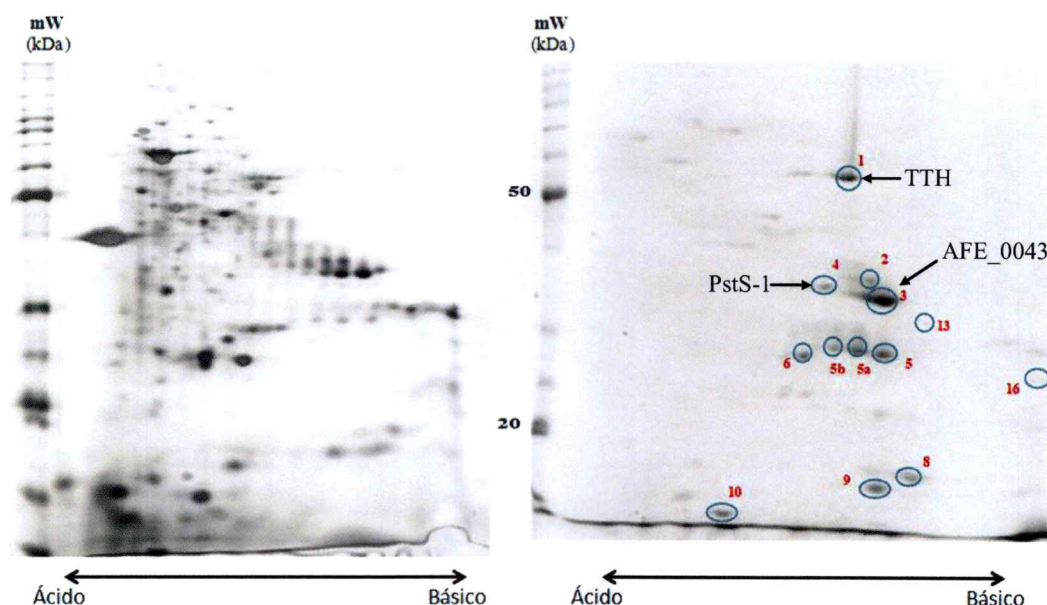


Figura 3. NEPHGE bidimensional del extracto total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 cultivado en azufre elemental (izquierda) y de su secretoma obtenido por TPP (derecha) (Jerez y Pagliai, 2009). Detalle en Tabla 1.

El método TPP es un procedimiento que utiliza sulfato de amonio como agente cosmotrópico, ya que actúa como promotor aniónico del orden y estructura del agua, para realizar un *salting out* de las proteínas en solución, disminuyendo su solubilidad como resultado de la competencia por las moléculas de solvatación entre los iones de sal adicionados y los otros solutos disueltos. A altas concentraciones de sal, muchos de los iones adicionados se encuentran rodeados por moléculas de agua, por lo que el solvente remanente es insuficiente para disolver otros solutos, resultando en la precipitación de las proteínas. Estos iones, que disminuyen la solubilidad de las proteínas, estabilizan su estructura nativa por lo que las proteínas precipitadas no se desnaturalizan (Bohinsky,

1978). En una segunda instancia, la partición en tres fases usa un solvente orgánico C₄ o C₅ (preferentemente *t*-butanol) para realizar la separación de las proteínas en la solución acuosa, terminando éstas en la interfase entre la fase acuosa y la orgánica (Dennison y col., 1997).

Se ha descrito además que los extractos de proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* y de *A. thiooxidans* posee un efecto estimulante al ser inoculado en un cultivo temprano de *A. ferrooxidans*, ya que aceleran el crecimiento, acortando la etapa de retardo desde cuatro a menos de un día, o incluso eliminándola del crecimiento (Fig. 4) (Jerez y Pagliai, 2009). Recientemente se publicó un estudio mostrando un efecto similar sobre el crecimiento de cultivos de *A. thiooxidans*, en donde la Licanantasa, un componente del secretoma, disminuye la etapa de retardo del crecimiento y aumenta la tasa de biolixiviación de cobre desde minerales de calcopirita en cultivos mixtos de *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* (Bobadilla y col., 2010).

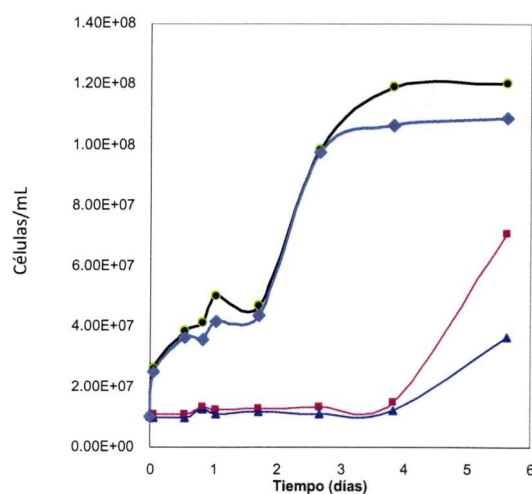


Figura 4. Efecto del extracto extracelular de *A. ferrooxidans* y de *A. thiooxidans* sobre el crecimiento de *A. ferrooxidans* (Jerez y Pagliai, 2009). Triángulos azules: Control sin proteínas añadidas. Cuadrados rosados: Extracto de secretoma de *E. coli*. Círculos negros: Extracto de secretoma de *A. thiooxidans*. Rombos celestes: Extracto de secretoma de *A. ferrooxidans*.

Para la caracterización del secretoma de *A. ferrooxidans* se separaron las proteínas mediante electroforesis bidimensional y se extrajeron del gel de poliacrilamida para su secuenciación e identificación en las bases de datos disponibles (Tabla 1). De estas proteínas, se escogieron las dos que presentan mayor abundancia en el secretoma que son las codificadas por los genes *ttH* (AFE_0029) y AFE_0043, y una de las de menor abundancia que corresponde al producto de *pstSI* (AFE_1939).

Tabla 1. Identificación de los componentes del secretoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental (Jerez y Pagliai, 2009).

Mancha	Marco abierto de lectura	Descripción disponible en NCBI
1	AFE_0029	Tetrationato hidrolasa
2	AFE_0018	Proteína con dominio LysM
3	AFE_0043	Proteína periplasmática de unión a soluto, putativa
4	AFE_1939	Transportador ABC de fosfato, proteína de unión a fosfato periplasmática PstS
5	AFE_0522	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa, tipo-PPIC
5	AFE_1478	Proteína FixC
5a	AFE_0522	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa, tipo-PPIC
5b	AFE_0522	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerasa, tipo-PPIC
6	AFE_0042	Proteína con dominio de secuencia de señal de vía Tat (twin-arginine translocation)
8	AFE_0042	Proteína con dominio de secuencia de señal de vía Tat (twin-arginine translocation)
9	AFE_3146	Rusticianina
10	AFE_0543	Chaperonina, 10 kDa (groES)
13	AFE_1498	Transportador ABC , proteína periplasmática de unión a soluto, putativa
16	AFE_0006	Proteína chaperona de pilus, putativa

El producto del gen *pstSI*, PstS-1 (AfPstS-1), tiene un peso molecular de 37,8 kDa y junto con AfPstS-2 han sido postuladas como proteínas de unión a fosfato inorgánico, y en ambos casos pertenecerían al sistema de transporte específico de alta afinidad de fosfato inorgánico Pst (Vera y col., 2003). Se ha estudiado la involucración del sistema Pst en los procesos de colonización llevados a cabo por otros microorganismos, como por ejemplo *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa*, en donde la ausencia de PstS afecta directamente la virulencia de estos patógenos al verse comprometida la habilidad para formar biopelículas o adherencia a las células objetivo (O'May y col., 2009; Zaborina y col., 2008). En *E. coli* los genes del sistema Pst (*pstA*, *pstB*, *pstC* y *pstS*) se inducen como parte de la respuesta del regulón Pho a las bajas concentraciones de fosfato circundante, en donde el sensor PhoR fosforila al regulador transcripcional PhoB, que se une a secuencias conocidas como cajas-pho río arriba de los genes que pertenecen al regulón para así inducir su expresión (Makino y col., 1994; Torriani-Gorini, 1994; Wanner, 1996). En *A. ferrooxidans* el sistema Pst pertenecería a un regulón Pho putativo similar al descrito en *E. coli*, y sus genes aparentemente están dispuestos en dos operones: *pstS1C1C2* y *phoBR-pstS2C2AB-phoU-ppx*, siendo el primer operón una posible duplicación génica truncada del segundo (Vera y col., 2003; Vera, 2006).

AFE_0043 sería el producto del gen hipotético anotado homónimamente y tiene un peso molecular de 36,7 kDa. En nuestro conocimiento no existen estudios de su caracterización, pero es posible que sea una proteína de unión a sulfato y pertenezca al sistema de incorporación de dicho compuesto, según alineamientos realizados con la base de datos disponible en BLASTp.

El gen *tth* codifica para la síntesis de la proteína tetrionato hidrolasa o TTH, con un peso molecular de 53,1 kDa, y posee un dominio de unión al cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ), que ya se ha caracterizado como una proteína periplasmática en *A. ferrooxidans* (Chi y col., 2007). En *A. ferrooxidans* se ha encontrado la TTH en el sobrenadante de cultivos de este microorganismo crecido en tiosulfato en condiciones limitantes de oxígeno (Beard y col., 2011). También se ha reportado la extrusión de TTH por la arquea *Acidianus hospitalis*, que resulta en unas estructuras tipo-cremallera al ser vistas al microscopio electrónico. Dicha extrusión se ha relacionado con condiciones de estrés, cuyos niveles disminuyen a niveles no detectables cuando el arqueón se adapta a las nuevas condiciones del medio (Kuprovic y col., 2012).

Con los antecedentes anteriores, surge la interrogante de si las proteínas extracelulares escogidas desde los genes bidimensionales son capaces de reproducir, de forma parcial o total, el efecto observado previamente al utilizar un extracto de secretoma de *A. ferrooxidans*, al facilitar el crecimiento bacteriano sobre el azufre elemental en cultivos iniciales. Esto nos ayudaría a determinar de forma preliminar las proteínas extracelulares que cumplen un rol en las primeras etapas del crecimiento de un cultivo, sea por la facilitación de la adherencia al sustrato o por cumplir algún rol metabólico.



1.1 Hipótesis

La inoculación de extractos de *E.coli* que contienen proteínas recombinantes del secretoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 generan un efecto sobre el cultivo de *A. ferrooxidans* en azufre, acortando la etapa de retardo del crecimiento bacteriano.

A. Objetivos:

a. General.

- Determinar el efecto de la inoculación de extractos de *E. coli* que contienen proteínas sobreexpresadas del secretoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental como sustrato, sobre un cultivo inicial de dicha bacteria.

b. Específicos:

- Reproducir el efecto del secretoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental sobre la velocidad de crecimiento de un cultivo inicial de la misma bacteria en un medio con azufre como sustrato.
- Estudiar el efecto en el crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 al inocular un extracto total libre de células de *E. coli* que contenga proteínas del secretoma de *A. ferrooxidans* expresadas de forma recombinante.
- Realizar una caracterización bioinformática de las proteínas estudiadas que causen un efecto detectable durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* para conocer su interacción con el medio y el contexto genómico en el que se induce su síntesis.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, la cual se creció aeróbicamente a 30 ° C con agitación a 150 rpm en el medio 9K modificado según el sustrato a oxidar. Para el crecimiento en azufre elemental, el medio contenía 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,04 g/L de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ y 50 g/L de perlas de azufre esterilizadas previamente, ajustando luego el pH a 2,5 con ácido sulfúrico concentrado (Amaro y col., 1991).

2.2 Monitoreo del crecimiento celular

El crecimiento de *A. ferrooxidans* utilizando perlas de azufre como sustrato se siguió mediante el conteo celular del sobrenadante de cultivo para establecer la fase de crecimiento en la que se extrajeron las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo. Esto se realizó con una cámara de Petroff-Hausser mediante la visualización con el microscopio óptico OLYMPUS BX50. La concentración de células se obtuvo dividiendo el promedio de células contadas en cada celda por el volumen que contiene una celda, que corresponde a 5×10^{-8} mL. No se determinaron las células adheridas a las perlas de azufre.

2.3 Obtención de proteínas extracelulares

Las proteínas a estudiar se obtuvieron desde el sobrenadante de un cultivo de *A. ferrooxidans*, para lo cual éste se creció hasta la fase exponencial tardía. Este sobrenadante de cultivo se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min a 4 ° C, luego de lo cual se filtró a través de una membrana GV Durapore PVDF (Millipore) con un tamaño de poro de 0,22 µm para descartar el resto de las células no separadas durante la centrifugación.

El método empleado para concentrar proteínas desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* corresponde a la partición en tres fases. El volumen de sobrenadante se saturó al 75 % agregando sulfato de amonio, a temperatura ambiente. Esta solución se dejó agitando durante 30 min para luego agregar 2/5 del volumen inicial de *n*-butanol (Dennison y col., 1997). La mezcla se agitó durante 2 min y se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente. Luego se recuperó la fase intermedia generada por este procedimiento y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min para separar la fase acuosa y la fase orgánica. El precipitado obtenido se secó a temperatura ambiente para luego ser solubilizado en un volumen de sales del medio 9K. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas mediante el ensayo de Bradford usando albúmina de suero de bovino como estándar. Las proteínas del secretoma se separaron y se visualizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5% (Laemmli, 1970) teñidos con nitrato de plata (Rabilloud y col., 1988; Shevshenko y col., 1996).

2.4 Clonamiento y expresión de proteínas heterólogas

Los genes escogidos se amplificaron desde ADN genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 con los partidores diseñados en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología para este estudio y que son especificados en la Tabla 2. Los partidores sentido incluyen un sitio de restricción para *XhoI* y *NdeI*, y una secuencia de Shine-Dalgarno (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los partidores utilizados para amplificar los genes escogidos.

Partidor	Secuencia 5' - 3'
AFE_0043FwXho	<i>CTCGAGATAAAAGGAGAATATACATATGAAAAAAGTAAAACGCTG</i>
AFE_0043Rv	TTATTTGCCCGTGTACGGCTTG
pstsFwXho	<i>CTCGAGATAAAAGGAGAATATACATATGAAGAAAGAAGTAACACGTAGTG</i>
pstsRvPst	TACTGAATTTCCGCGATCTGC
tethFwXho	<i>CTCGAGATAAAAGGAGAATATACATATGCCAAGTATTGTACGTAAC</i>
tethRvPst	CTAACTGCCATGGCTTATCGTTTTTAG

Con subrayado se destaca la secuencia de Shine-Dalgarno. Los sitios de restricción de *XhoI* y *NdeI* se destacan en cursiva y negrita, respectivamente.

Los productos de PCR obtenidos se purificaron desde un gel de agarosa (E.Z.N.A. Gel Extraction Kit) y se ligaron con el vector pGEM-T Easy (Invitrogen). Para esto se tomaron 5 ng de ADN plasmidial, 10 ng de producto de PCR, Buffer de ligación 1X, 1 µL de ligasa y agua bidestilada hasta completar 6 µL. La reacción se realizó a 4 ° C durante toda la noche. Con el producto de ligación se procedió a la transformación de la cepa One Shot TOP10 de *Escherichia coli* (Invitrogen) por golpe de calor. Se tomaron 5 µL del producto de ligación y 50 µL de células y se incubaron en hielo durante 30 min. Posteriormente se incubó a 42 ° C durante 45 s y luego en hielo por 5 min. Después se agregaron 250 µL de medio LB (10 g de triptona, 5 g de extracto

de levadura y 10 g de NaCl en 1 L de H₂O) a temperatura ambiente y se incubó a 37 ° C con agitación suave durante 1 h. Luego se tomaron alícuotas de 50 µL y 200 µL y se sembraron en placas de Petri con medio agar-LB suplementado con ampicilina 100 mg/L, 40 µL de X-Gal e IPTG 1 mM y se dejaron incubando a 37 ° C durante toda la noche. De las colonias obtenidas se eligieron las de color blanco y se hizo un análisis de orientación del inserto por medio de PCR, utilizando un partidor en sentido del gen y otro en antisentido (5'- TCACACAGGAAACAGCTATG -3') que cubre la secuencia del vector. El PCR de colonia para AFE_0043 no dió resultados positivos, por lo que los vectores se extrajeron y analizaron por digestión enzimática con *NdeI* según indicaciones del fabricante.

Los plasmidios que presentaron el inserto en el sentido deseado se extrajeron por miniprep (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit I, Omega). Los que contenían las secuencias de *pstS1* y *ttH* se digirieron con *XhoI* y *PstI*, y los que contenían a AFE_0043 fueron digeridos con *XhoI* y *EcoRI*, según las indicaciones del fabricante (New England Biolabs). El vector pTrcHis2A (Invitrogen) se digirió con las enzimas correspondientes para cada gen. Los productos de la digestión se sometieron a una reacción de ligación y con dicho producto se transformó *E. coli* TOP10 como se describió previamente. La inducción de la expresión se realizó con IPTG 3 mM durante toda la noche a 20 ° C y 150 rpm.

Los cultivos se sedimentaron por centrifugación a 16000 g durante 2 min. El sedimento se lavó una vez con Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Luego se resuspendió en dicho tampón y se agregó PMSF 1 mM. Se sonicó en hielo en lapsos ON y OFF de 30 s por un

tiempo total de 10 min. Posteriormente se centrifugó a 16000 g durante 25 min y se recuperó el sobrenadante.

2.5 Determinación del efecto de las proteínas seleccionadas

Los ensayos se realizaron agregando proteínas del secretoma resolubilizado (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o extracto total libre de células de *E. coli* (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a las perlas de azufre esterilizadas previamente. Para esto, las perlas se incubaron con 156 μg de proteínas del extracto de *E. coli* o 312 μg de proteínas del secretoma, y el volumen se ajustó a 250 μL , y se mantuvieron a 30 ° C durante 2 h con agitación a 250 rpm. Posteriormente se agregaron 6 mL de las sales de medio 9K y se inoculó un concentrado de *A. ferrooxidans* para dar 10^7 células/mL.

2.6 Análisis bioinformáticos

El modelamiento estructural de la proteína AfPstS-1 se realizó con el servidor Swiss-Model (Peitsch, 1995; Arnold y col., 2006; Kiefer y col., 2009) utilizando PstS-1 de *M. tuberculosis* (MtPstS-1) como templado (Código PDB: 1PC3) y se visualizó en PyMOL (Schrödinger, LLC., 2013). Para el modelamiento de AfPstS-2 se utilizó el mismo procedimiento con PstS de *E. coli* (EcPstS) como templado (Código PDB: 1IXH). Los cálculos del potencial electrostático de superficie se hicieron por medio del servidor PDB2PQR (Dolinsky y col., 2004; Dolinsky y col., 2007) y se visualizaron por APBS (Baker y col., 2001) en el programa VMD (Humphrey y col., 1996). Se realizó una búsqueda con BLASTp utilizando la secuencia de AfPstS-1 (Código UniProt: B7JC36) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Debido al gran número de secuencias

homólogas encontradas se utilizaron las que tuviesen un porcentaje de identidad mínimo de 50% con AfPstS-1, con las que se realizó un alineamiento de secuencia con ClustalW editado con BoxShade, y un alineamiento de contextos genómicos con las secuencias obtenidas que estaban disponibles en la base datos de Absynte (Despalins y col., 2011).

3. RESULTADOS

3.1 Obtención de las proteínas del secretoma

Una parte importante del desarrollo de este Seminario de Título fue obtener las proteínas purificadas del secretoma para determinar su posible función individual en comparación con el secretoma total. Se procedió a repetir el proceso realizado previamente en el laboratorio con la técnica de la partición en tres fases ya descrita. Para esto, se cultivó *A. ferrooxidans* hasta su fase exponencial tardía, donde la densidad celular alcanza aproximadamente $2 \cdot 10^8$ células/mL, ya que en fase estacionaria existe una mayor tasa de lisis celular (Fig. 5). En la figura 6 se observa la separación de las proteínas presentes en el extracto del secretoma mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Se aprecia el perfil proteico obtenido desde un cultivo en azufre.

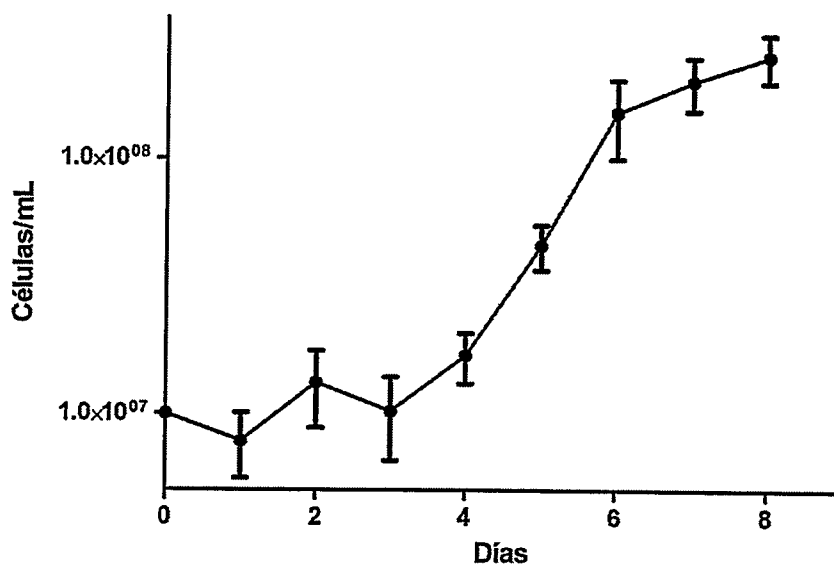


Figura 5. Crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en medio 9K con perlas de azufre como sustrato. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes y su desviación estándar.

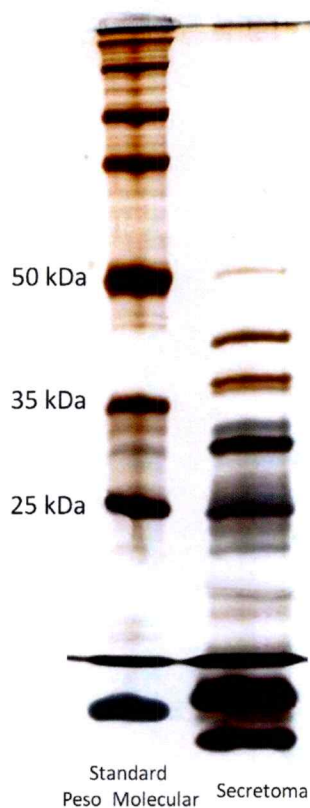


Figura 6. Separación de las proteínas del secretoma de *A. ferrooxidans* mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12,5% en condiciones desnaturalizantes. Se aplicó una carga de 1 μ g de proteínas del secretoma obtenido por partición en tres fases.

Posteriormente, aplicando el extracto del secretoma desde el inicio a un cultivo de *A. ferrooxidans* se reprodujo el efecto observado anteriormente en el laboratorio, en donde se elimina la fase de retardo del crecimiento presente en los primeros tres días y se obtiene un mayor número de células al inicio del crecimiento, eliminando la etapa de retardo (Fig. 7). Esto permitió utilizar el extracto del secretoma como un control positivo en los ensayos de detección de un posible efecto de las proteínas del secretoma que se realizaron posteriormente.

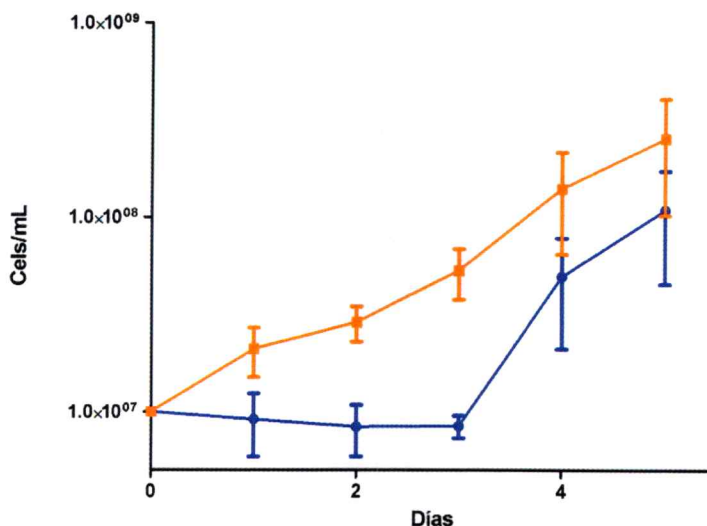


Figura 7. Ensayo del efecto que posee un extracto del secretoma de *A. ferrooxidans* sobre el crecimiento de este microorganismo en perlas de azufre elemental. Control sin secretoma: azul; Secretoma 50 µg/mL: naranja. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes y su desviación estándar.

3.2 Clonamiento y expresión recombinante de genes de interés

Al analizar los geles bidimensionales del secretoma (Fig. 3), se hace notoria la abundancia de ciertas proteínas por sobre otras. Entre las proteínas más abundantes se eligieron dos, con el razonamiento de que éstas podrían ser las más importantes en el desarrollo de *A. ferrooxidans*, y además se eligió una de entre las de menor abundancia, que podría cumplir algún rol facilitando el crecimiento de la bacteria durante el período de cultivo. Las proteínas elegidas fueron: AfPstS-1 (AFE_1939), tetracionato hidrolasa (TTH; AFE_0029) y la codificada por el gen AFE_0043. En la figura 8 se muestra la amplificación de dichos genes realizada mediante PCR seguida de la separación de los productos obtenidos mediante electroforesis en un gel de agarosa.

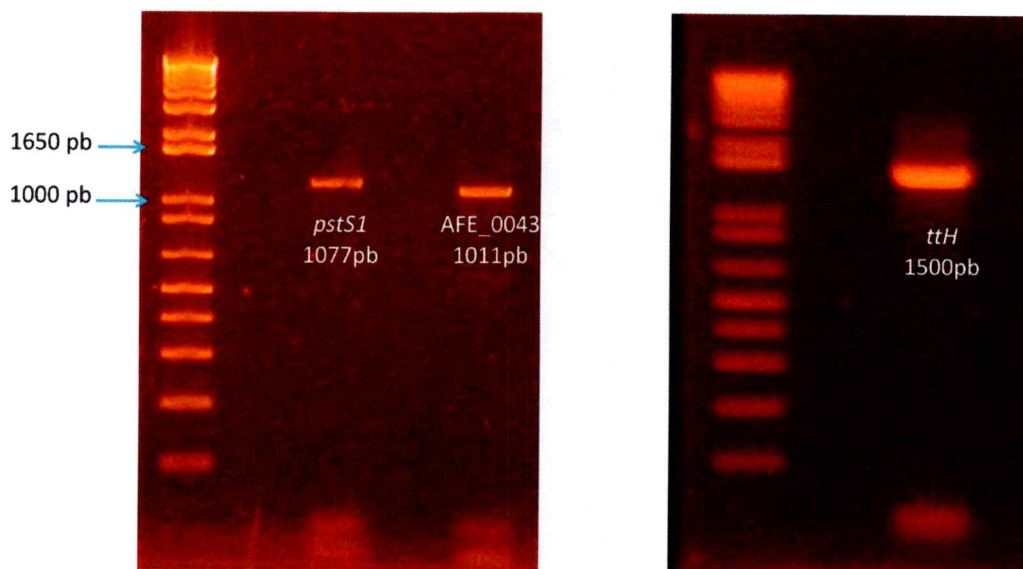


Figura 8. Amplificación de los genes *pstS1*, *AFE_0043* y *ttH*. En cada carril del gel de agarosa al 1,5% se aplicaron 5 μ L del producto de PCR. Las bandas de ADN amplificado se visualizaron por tinción con Gel Red en dilución 1:10.000 (Life Sciences). Se utilizaron 5 μ L del marcador de ADN 1 kb Plus (Invitrogen).

Luego de purificar los productos de PCR desde el gel de agarosa, éstos se ligaron en el vector pGEM-T Easy y se transformó con ellos *E. coli* TOP10. Al obtener una serie de clones, se realizaron ensayos de PCR de colonia con la finalidad de identificar los clones que poseen el vector con el inserto en el sentido deseado. Tanto *pstS1* como *ttH* mostraron un fragmento del tamaño esperado, indicando una orientación correcta (Fig. 9A). Como el PCR de colonia no resultó positivo para el gen *AFE_0043*, se decidió realizar cultivos de noche con los diferentes clones obtenidos y extraer el plasmidio por medio de una miniprep, la cual posteriormente se digirió con *NdeI*. Los clones que presentaron el inserto en el sentido requerido liberaron una banda de tamaño similar al gen, 1011 pb, luego del corte con la enzima de restricción (Fig. 9B).

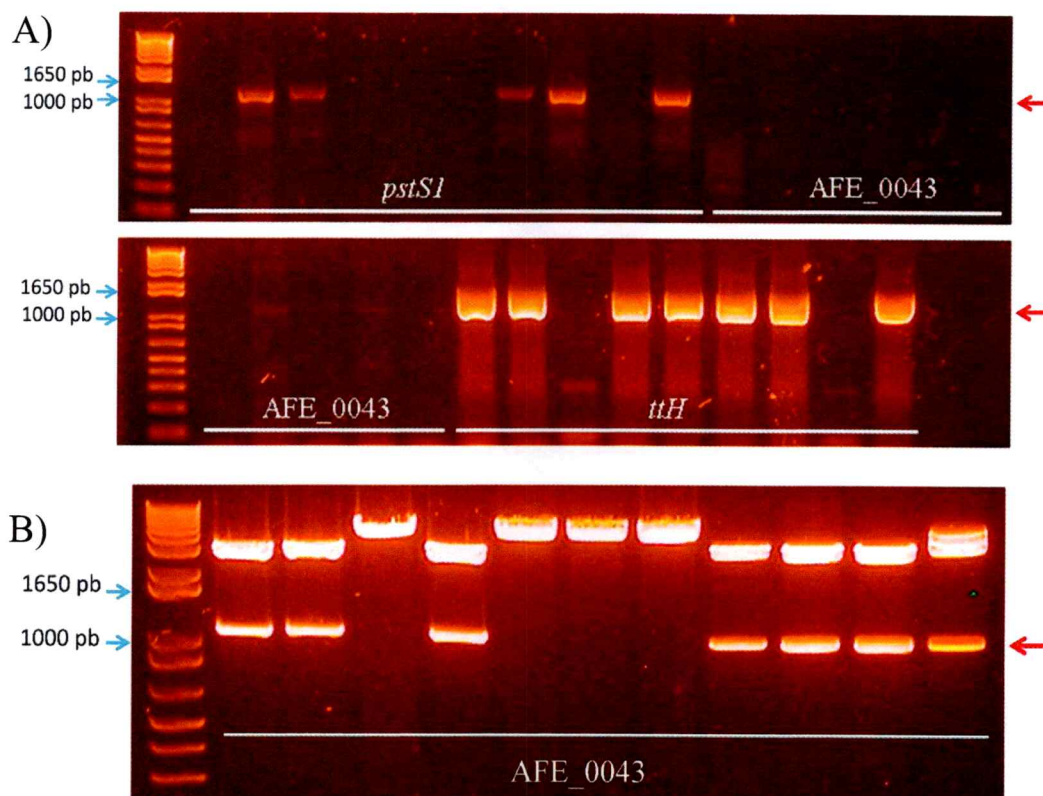


Figura 9. Determinación de la direccionalidad de los insertos en el vector pGEM-T Easy. A) PCR de colonia para *pstS1*, AFE_0043 y *ttH*. B) Digestión enzimática con *NdeI* para AFE_0043. Las flechas rojas indican los tamaños esperados para *pstS1* y *ttH* en A) y para el fragmento liberado que contiene AFE_0043 en B). Se utilizaron 5 μ L del marcador de ADN 1 kb Plus (Invitrogen).

Se eligieron clones que poseían el inserto en el sentido deseado, y se sometieron a digestión enzimática. Los vectores que poseían los genes *pstS1* y *ttH* se digirieron con *XhoI* y *PstI*, y el que contenía a AFE_0043 con *XhoI* y *EcoRI*. Simultáneamente se digirió el vector de expresión pTrcHis2A con dichas enzimas. Posterior a la ligación de los fragmentos con los vectores linearizados, se realizó la inducción de la expresión heteróloga, y se analizó la fracción completa del cultivo de noche para observar las bandas mediante una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (Fig. 10).

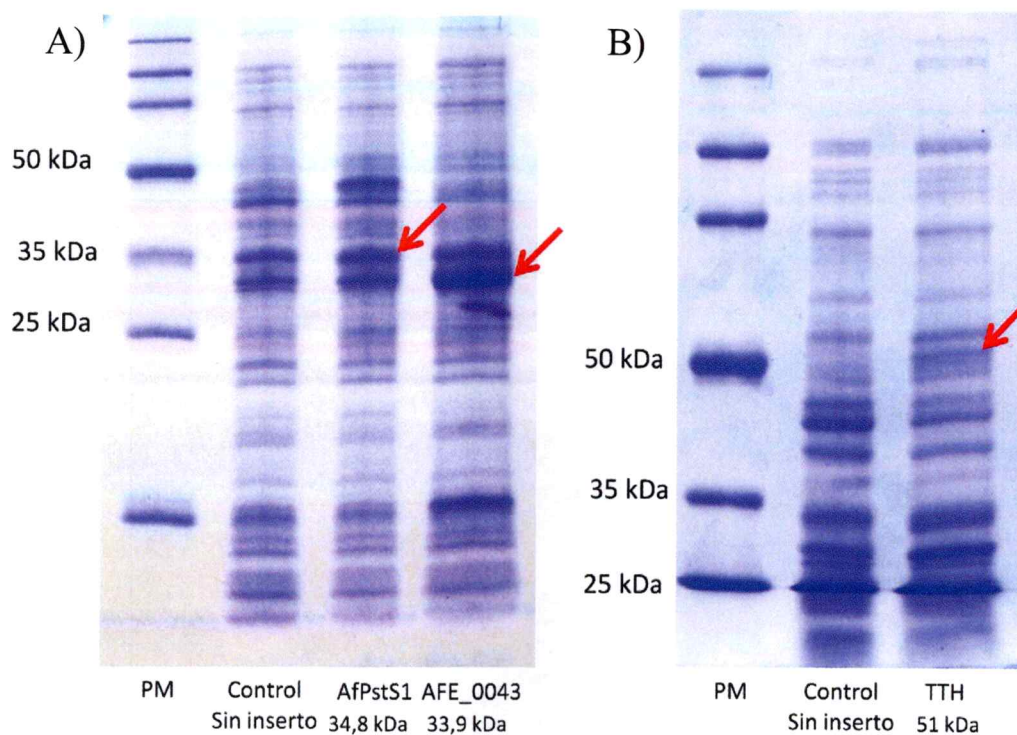


Figura 10. Expresión de AfPstS-1, AFE_0043 y TTH en *E. coli*. Luego de inducir la expresión de los genes en *E. coli*, se solubilizó la fracción celular total en tampón de muestra. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes. A) Gel de poliacrilamida al 15% con AfPstS-1 y AFE_0043. B) Gel de poliacrilamida al 10% con TTH. Las flechas indican las bandas correspondientes en el peso molecular esperado. PM: Peso molecular.

Se aprecian claramente las bandas de proteínas codificadas por los genes *tetH* y AFE_0043 en el peso molecular esperado. Sin embargo, es difícil distinguir la banda correspondiente a AfPstS-1, debido a la presencia de una banda de un tamaño muy similar en el perfil proteico de *E. coli* con la que comigra (Fig. 10A). La diferencia de peso con el indicado previamente en la introducción para las tres proteínas da cuenta de la escisión del péptido señal, ya que los genes fueron clonados incluyendo ésta sección y estaría siendo procesado por el sistema de secreción Sec de *E. coli*.

Posterior al análisis de la fracción completa de *E. coli*, fue necesario corroborar que las proteínas en estudio estaban presentes de forma soluble. Para esto se hizo un cultivo de noche al que se le añadió el inductor y luego de cosechar las células por centrifugación éstas se sometieron a sonicación para lisarlas. Después, de separar los restos celulares por medio de centrifugación, el sobrenadante conteniendo la fracción soluble se analizó mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Nuevamente, las proteínas TTH y la codificada por AFE_0043 fueron identificables en la fracción soluble por su tamaño esperado. No obstante, en este caso no fue posible distinguir la proteína AfPstS-1 debido a la presencia de otra banda con un peso muy similar con la que comigra (Fig. 11).

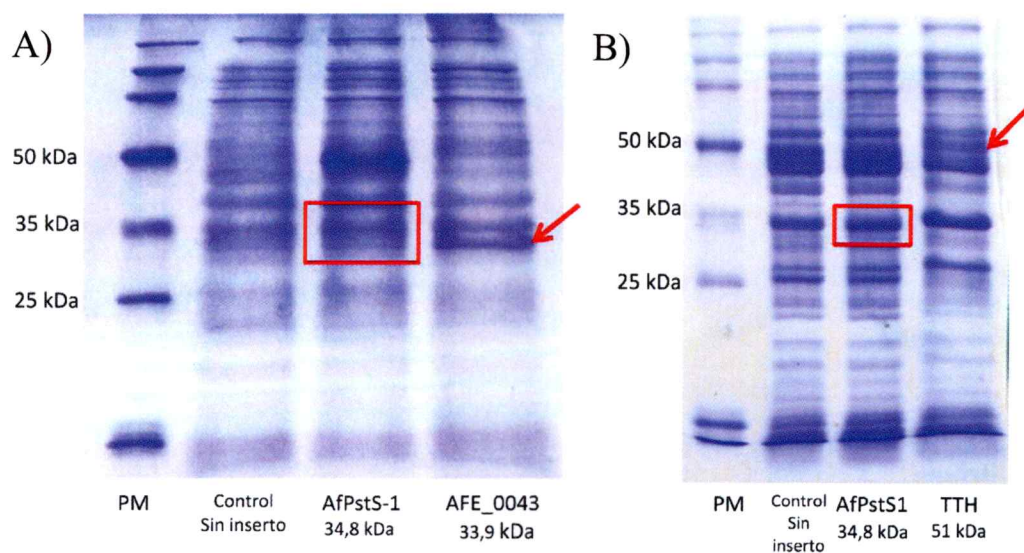


Figura 11. Análisis de la presencia de proteínas recombinantes de *A. ferrooxidans* sobreexpresadas en los extractos solubles libres de células de *E. coli* sometidas a la inducción de la expresión. A) AfPstS-1 y AFE_0043. B) AfPstS-1 y TTH. El rectángulo rojo indica la zona en la que AfPstS-1 debería estar presente. Las flechas indican la banda correspondiente en el peso esperado.

3.3 Determinación del efecto de las proteínas seleccionadas

Los ensayos funcionales muestran el efecto obtenido de cada fracción soluble sobre el crecimiento de *A. ferrooxidans* en perlas de azufre. Se observa que los extractos que contienen la proteína TTH o la codificada por AFE_0043 no generaron un efecto en el crecimiento al ser comparadas con un control negativo como lo es el extracto de la fracción soluble de *E. coli* cuyo vector no posee un inserto (Fig. 12).

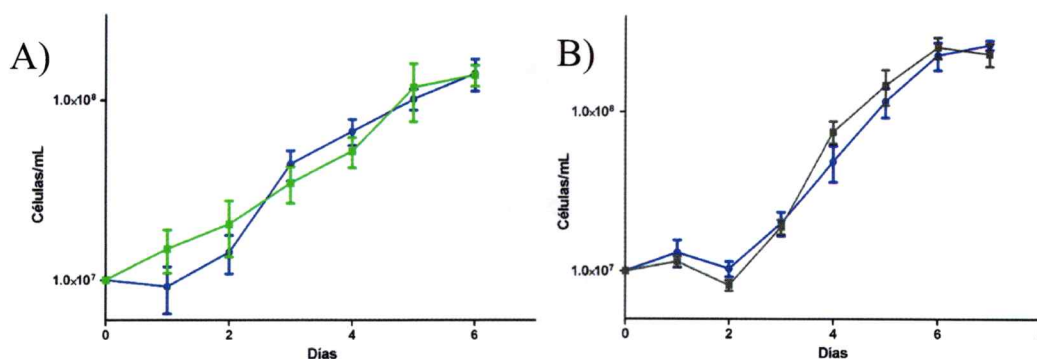


Figura 12. Ensayo de crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia de extractos proteicos con AFE_0043 (A) y TTH (B), a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cada uno. Control de vector sin inserto: azul; AFE_0043: verde; TTH: gris. Se graficó el promedio de tres ensayos independientes y su desviación estándar.

Sin embargo, el crecimiento observado con el extracto que contenía AfPstS-1 presentó una diferencia clara al compararlo con el control negativo, y además mostró gran similitud con un control positivo como lo es el extracto del secretoma de *A. ferrooxidans* obtenido desde azufre. El cultivo con AfPstS-1 mantiene una densidad celular mayor que la del control sin inserto hasta la fase exponencial tardía de crecimiento. Además, se puede ver que el control negativo posee efecto de forma intrínseca si se compara con un cultivo al cual no se le agrega extracto total (Fig. 13).

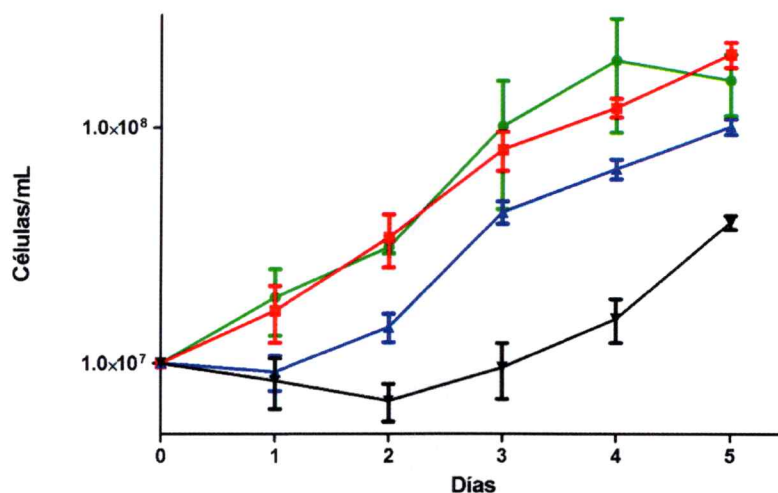


Figura 13. Ensayo de crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia de extractos proteicos del secretoma (verde), AfPstS-1(rojo) y el control negativo sin inserto (azul) a 25 $\mu\text{g/mL}$ cada uno. En negro se muestra un crecimiento sin agregar proteínas como control. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes y su desviación estándar.

3.4 Análisis bioinformáticos

3.4.1 Alineamiento de secuencias de AfPstS-1 y AfPstS-2

AfPstS-1 es una proteína de unión a fosfato que forma parte del sistema de captación de fosfato de alta afinidad (Pst) perteneciente al regulón *Pho* putativo de *A. ferrooxidans*, y cuya expresión sería inducida en condiciones limitantes de fosfato (Vera y col., 2003). En el caso de *A. ferrooxidans* hay dos proteínas PstS, pero este número varía según el microorganismo estudiado. Por ejemplo, *E. coli* posee una sola proteína anotada como PstS, y una búsqueda de identidad de secuencia en su proteoma no otorga otras proteínas que se le asemejen en porcentaje de identidad.

Por otro lado, *M. tuberculosis* cuenta con tres proteínas anotadas como PstS (PstS-1, PstS-2 y PstS-3), que cumplen el mismo papel que las identificadas en

E. coli, según estudios de identidad de secuencia y funcionalidad (Chang y col., 1994; Lefèvre y col., 1997), pero en este caso se ha descrito que PstS-1 de *M. tuberculosis* también actúa como factor de virulencia en el proceso de colonización del hospedero, siendo secretada al exterior de la bacteria (Espitia y col., 1992; Lefèvre y col., 1997).

Con el propósito de indagar en las características de AfPstS-1 como la única proteína de las ensayadas que otorga un efecto detectable, se realizó una serie de análisis bioinformáticos que permitieran inferir el posible papel de esta proteína tanto en *A. ferrooxidans* como en otros microorganismos.

En primer lugar, un alineamiento de la secuencia aminoacídica de AfPstS-1 con AfPstS-2 y EcPstS permite determinar que el sitio de unión a fosfato de AfPstS-1 está conservado en relación a lo descrito para EcPstS y para AfPstS-2 (Luecke y Quioco, 1990; Vera y col., 2003). Los aminoácidos conservados en AfPstS-1 que pertenecerían al sitio de unión a fosfato son Thr12, Ser41, Asp59, Arg139, Ser143 y Gly144. AfPstS-1 y EcPstS comparten un 33,6 % de identidad, y entre AfPstS-1 y AfPstS-2 ésta es de 32,6 %. El porcentaje de identidad entre AfPstS-2 y EcPstS es de 50%, por lo que ésta sería la equivalente al homólogo en *E. coli* (Vera y col., 2003) (Fig. 14).

```

A.ferr1 1 APTISLLEITGSLILYPLENLVPEVHTKMNFGIQITIQGTGSGGIGIEAISGVAQIGASDAYMSLACIKKHPNLLNIPLAI
A.ferr2 1 ---ETISAAGGTAIYVLSKWAETPKOKI-GIMVNYQAIIGSGGGIAQIKAKTVAFNSMPLQPFVYLNKIQ-LVQFPFVI
E.coli 1 --EASLTGAGATFPAPVNAKWADTYQKET-GNKVNYQGIGSSGGVQIANTVDFGASDAPLSDEKLAQEG-LFQEFVI
          * * *
A.ferr1 81 SIQMNYNVPGINNVHKLISSEVLAGIYSGKITTWDDAAIAKLNPGIKLENHKLIEVHRTDGSGLTFEFTYISDTTFAW
A.ferr2 76 IETTPVNVNPGIKRPELTFNGAVLTGIYLGKIKKNDAAIADLNKGVHLEDNNITVVHRSDGSGTTFNETNYLAKVSPFW
E.coli 77 GGVVIAVNIPLGKSGELVLDKTLGDIYLGKIKKWDEFAIAKLNPGIKLESQNIIVVRRADGSGTSEVFTSYLAKVNEEW
          * * *
A.ferr1 161 SNSVGYSTFVSWPAVPGGIGAEGNFGVQAIKTTFYGIAYIGISWKRPEEAPHLEMMLENRAGFVLEPTVANAKAAAGE
A.ferr2 156 KRFVGDNIIVSWPVG---VGGKGNAGVAAVVQRIPGAIGYVEYAYAK---ENHMAVCKMINAAGKVVAFDLATFQAAAAN
E.coli 157 KNNVGTGSTVKNPLG---LGGKGNIGIAAFVQRIPGAIGYVEYAYAK---QNNLAYTKLISAEKGKVSPTENEFANAAGK
A.ferr1 241 MVKKTPEERISLIVYAPGASSYPIINYEYALVSHTEPAEAVATAMKFLNWAIDPKGGVAPFIFTAVNIVPLPDSAAKLS
A.ferr2 230 ADFTKVEDFYVILTNQPGACSWPISAAITYILMRQDAHKTVN-AGVLKFAKWEITAP--QAQAEARGLDVIPLKKTITVQI
E.coli 231 ADWS--KTAAQLITNCKCEDAWPIHSTFELIHKDQKKEEGTEVLKFEFLWAYKT----CAIQANLLDYASLPDSVVEQV
A.ferr1 321 RKQIAEIQ-----
A.ferr2 307 EAYWRNIGQ-----
E.coli 305 RAAWRNPKDSSGKPLY

```

Figura 14. Alineamiento de AfPstS-1 y AfPstS-2 con EcPstS. Los asteriscos denotan los aminoácidos pertenecientes al sitio de unión a fosfato descrito previamente (Luecke y Quioco, 1990) (Rojo: conservado en todas las proteínas; Azul: conservado solo en AfPstS-2; Verde; no conservado). *A.ferr1*: PstS-1 de *A. ferrooxidans*; *A.ferr2*: PstS-2 de *A. ferrooxidans*; *E.coli*: PstS de *E. coli*.

3.4.2 Modelamiento de la estructura de AfPstS-1

Gracias a la disponibilidad de una estructura cristalográfica del llamado antígeno-b o PstS-1 de *M. tuberculosis* (MtPstS-1) que ya ha sido reportada (Vyas y col., 2003) y que se ha demostrado que se secreta a la superficie celular (Espitia y col., 1992) y al medio extracelular (Lefèvre y col., 1997) y que posee un porcentaje de identidad de 51% con su homólogo de *A. ferrooxidans*, fue posible realizar un alineamiento estructural de ambas proteínas a través del servidor Swiss-Model (Peitsch, 1995; Arnold y col., 2006; Kiefer y col., 2009) (Fig. 15). Se puede notar que AfPstS-1 posee una estructura globular conformada por dos dominios principales, constituida tanto por hélices- α como por sábanas- β (Fig. 15 A y B). Se observa que los residuos aminoacídicos del sitio de unión a fosfato mencionados previamente coinciden con lo visto estructuralmente, pero según lo reportado en la estructura cristalográfica, el

homólogo de *M. tuberculosis* posee nueve residuos que participan en la unión a fosfato, los cuales están completamente conservados en AfPstS-1 y mantienen el ligando en el interior de la proteína sin acceso al exterior.

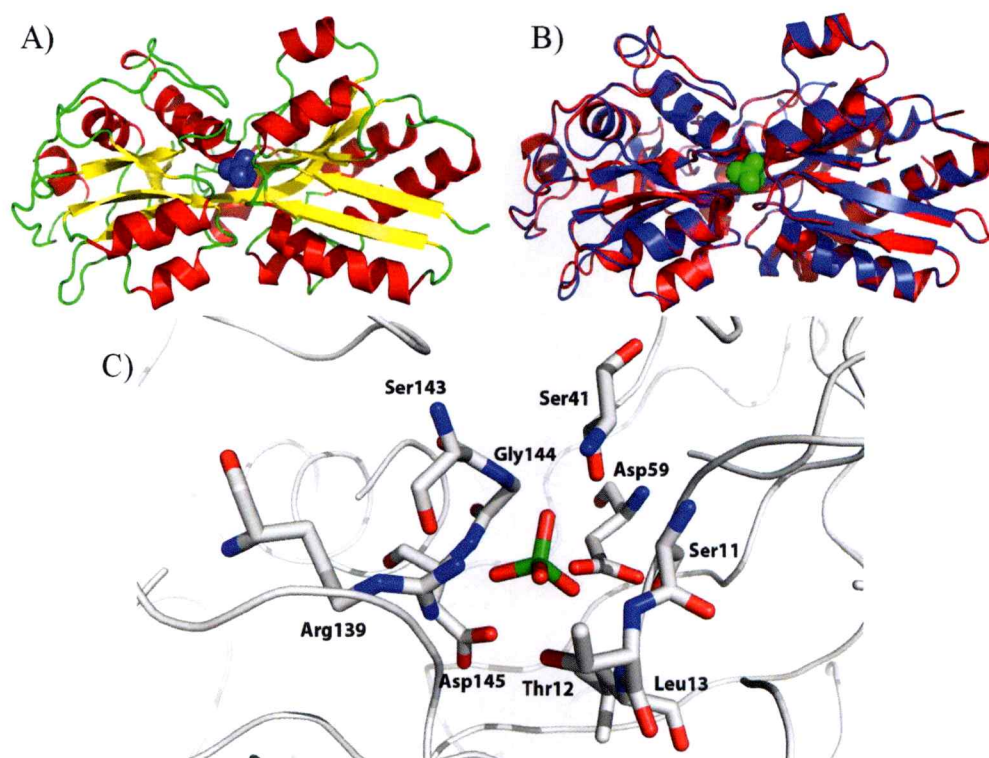


Figura 15. Modelo estructural de AfPstS-1 según el alineamiento con MtPstS-1. A) Estructura terciaria coloreada según estructuras secundarias (Hélices- α : rojo; Sábanas- β : amarillo; Fosfato inorgánico: azul). B) Alineamiento estructural entre ambas PstS-1 (*A. ferrooxidans*: azul; *M. tuberculosis*: rojo; Fosfato inorgánico: verde). C) Modelamiento del sitio de unión a fosfato de AfPstS-1 coloreada según sus elementos (Nitrógeno: azul; Oxígeno: rojo; Carbono: blanco; Fósforo: verde). Los residuos están identificados según la secuencia de AfPstS-1 y se han removido zonas de la cadena de carbonos para facilitar la visualización del sitio de unión.

Además se realizó un alineamiento estructural de AfPstS-1 con el modelo obtenido para AfPstS-2 desde su propio alineamiento *in silico* con la estructura cristalográfica de EcPstS (Código 1XIH) y se alinearon en el programa PyMOL. Se

observa que las estructuras secundarias mantienen su posición sin grandes diferencias entre ambas proteínas, a pesar de poseer una identidad sólo del 32,6% (Fig. 16).

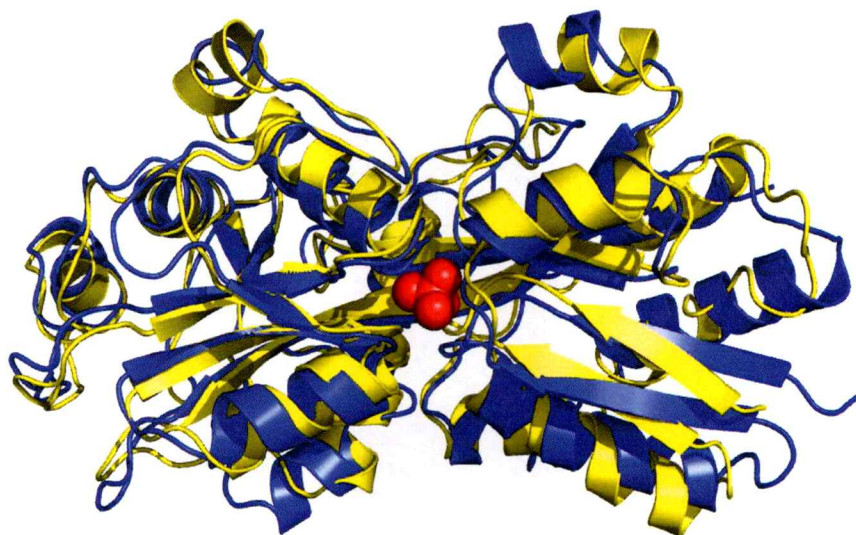


Figura 16. Alineamiento estructural de AfPstS-1 (azul) con AfPstS-2 (amarillo). La molécula de fosfato (rojo) corresponde a la estructura estimada para PstS-1.

El cálculo del potencial electrostático de la superficie de AfPstS-1 expuesta a un pH de 2,5 muestra el grado de protonación que tiene la proteína, siendo la carga electropositiva la que se encuentra con mayor uniformidad en la superficie. A pH neutro se deja en evidencia la diferencia de carga que existe entre la zona de acceso al sitio de unión y su parte posterior. La zona de acceso tiene un pequeño parche con carga electronegativa, con pequeñas porciones que muestran carga neutra. Al contrario, la zona posterior muestra una carga electropositiva más distribuida (Fig. 17).

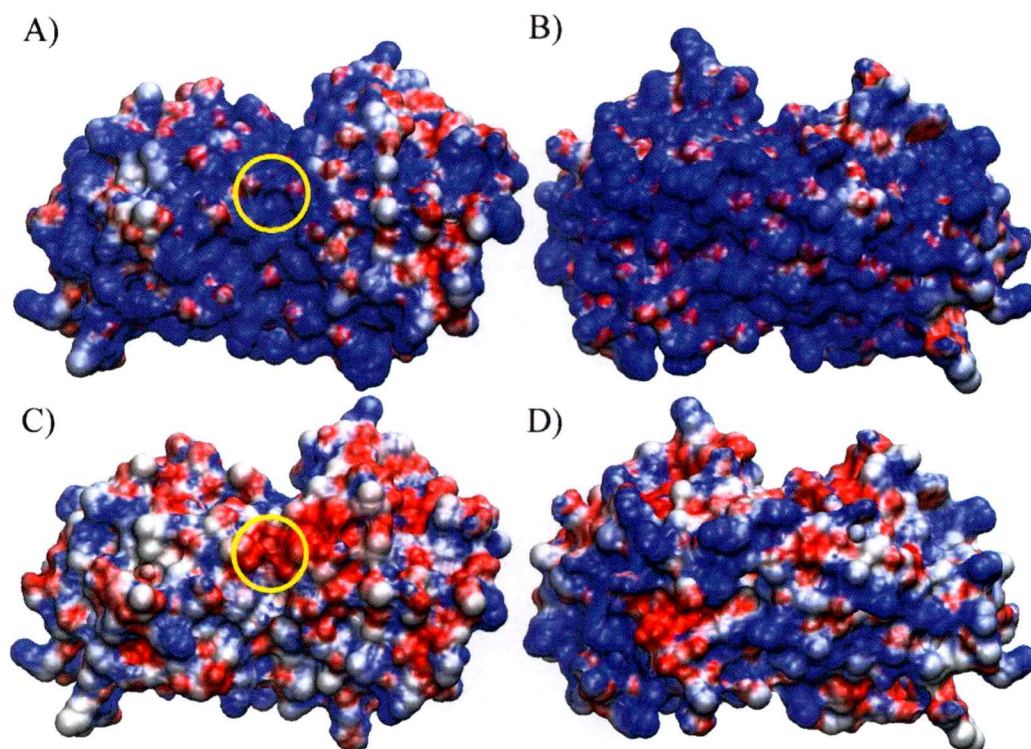


Figura 17. Distribución de la carga en la superficie de AfPstS-1. A) Zona de acceso al sitio de unión a fosfato a pH 2,5. B) Zona posterior a pH 2,5. C) Zona de acceso al sitio de unión a fosfato a pH 7. D) Zona posterior a pH 7. A) y C) El círculo en amarillo indica la posición del sitio de unión a fosfato, que se encuentra en el interior de la proteína. Carga positiva: azul. Carga negativa: rojo.

3.4.3 Identificación de proteínas homólogas a AfPstS-1

Posteriormente, se realizó una búsqueda por medio de BLASTp dentro de la base de datos disponible, con el objetivo de buscar proteínas homólogas a AfPstS-1 en otros organismos previamente anotados, y para un análisis de alineamiento de secuencia se eligieron homólogos con un porcentaje de identidad mayor al 50%, pero incluyendo EcPstS para analizar la conservación del sitio de unión a fosfato. Los homólogos están, en su gran mayoría, en microorganismos acidófilos, con la excepción de *M. tuberculosis*. En éstos se observa que la conservación del sitio de unión a fosfato sigue la tendencia

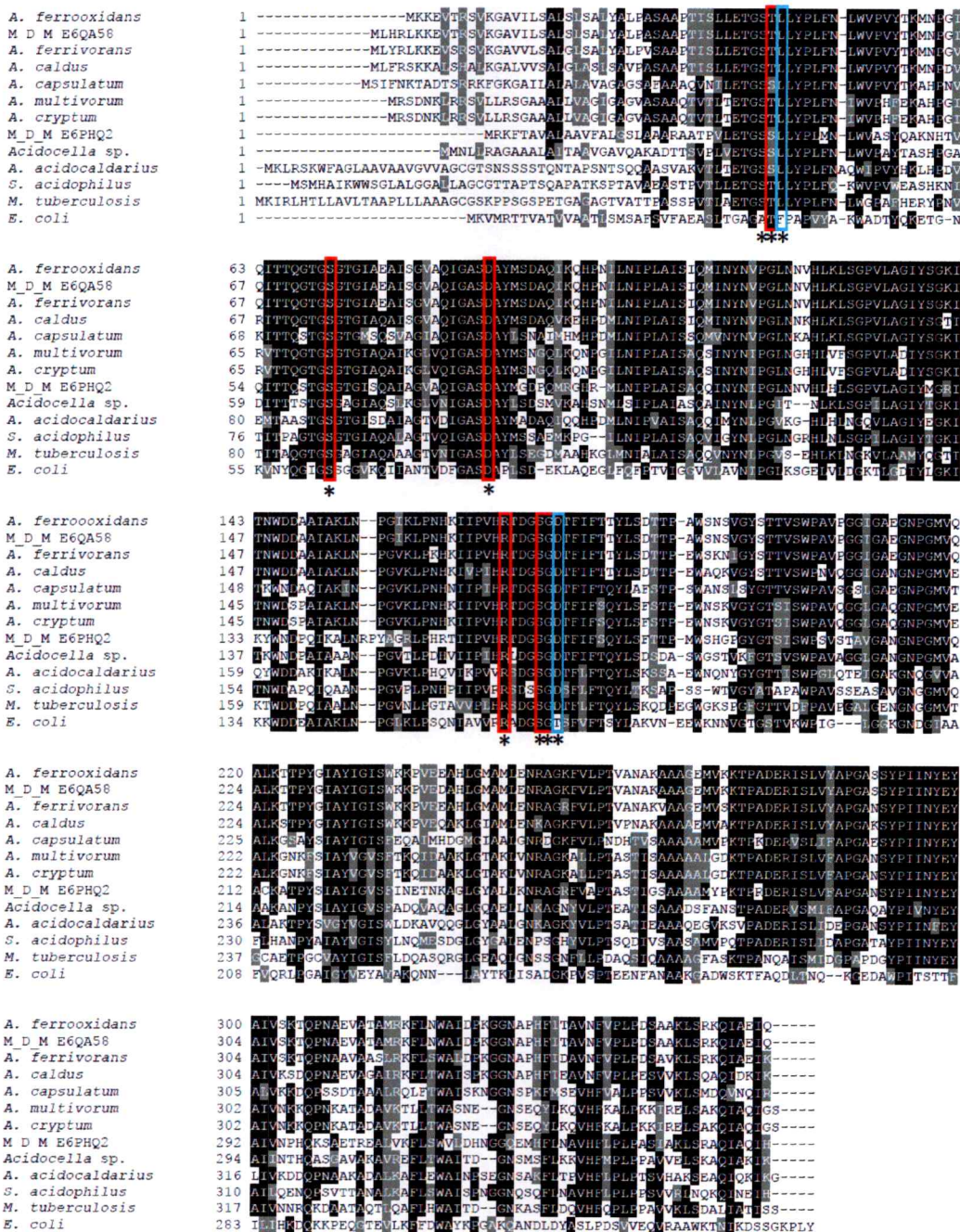


Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias de PstS de bacterias diferentes. Los residuos aminoacídicos presentes en el sitio de unión de MtPstS-1 se denotaron con un asterisco, y los de EcPstS con rectángulos rojos (conservados) y celestes (no conservados). M_D_M: drenaje ácido de mina.

tanto de PstS-1 de *A. ferrooxidans* como de *M. tuberculosis*, conservándose los nueve residuos del sitio de unión descritos para esta última, y al mismo tiempo, manteniéndose seis de los ocho aminoácidos del sitio de unión de EcPstS, salvo el caso de Thr10, que es reemplazada por serina en algunas especies (Fig. 18). En la secuencia de AfPstS-2 (Fig. 14), Gly8 podría ser un residuo que está interactuando con el fosfato dentro del sitio de unión al igual de lo que sucede con Gly144 en AfPstS-1 (Fig. 15C), ya que según el alineamiento con esta última, Gly8 se encuentra en la misma ubicación que Ser11 (Fig. 14 y Fig. 15C), y según el análisis en conjunto con MtPstS-1 estaría formando un enlace con el fosfato. De esta forma, si se consideran los análisis de AfPstS-2 con sus homólogos en *M. tuberculosis* y *E. coli*, esta proteína tendría ocho residuos pertenecientes al sitio de unión, y AfPstS-1 tendría nueve.

3.4.4 Alineamientos de los contextos genómicos de los homólogos de *pstS1* y *pstS2* de *A. ferrooxidans*

Con las especies obtenidas desde la búsqueda en BLASTp, se realizó un alineamiento de los contextos genómicos mediante el programa Absynte, que permite ordenar los resultados del alineamiento de los contextos según el porcentaje de identidad de la zona adyacente al gen usado como referencia, centrándose en los genes *pstS1* y *pstS2* de *A. ferrooxidans*, con el objetivo de buscar microorganismos que potencialmente compartan la misma función para los genes estudiados. En el análisis del contexto genómico de *pstS1* (Fig. 19) se observa para los organismos acidófilos que río abajo se encuentran dos genes anotados como *pstC1* y *pstC2* que cumplirían el rol de permeasas de fosfato según lo anotado en el genoma disponible, y su disposición en el genoma

muestra que es posible que los tres genes estén formando un operón. En algunos organismos se aprecia que en vez de *pstC2* se encuentra *pstA*, que también tiene la función de permeasa. Por otro lado, *pstS* de *E. coli* se encuentra dentro del operón *pstSCAB-phoU*, algo que no ocurre para los otros organismos analizados (Figs. 19). Si se analizan los contextos genómicos alineados con *pstS2* como referencia (Fig. 20), se encuentra una zona cuya secuencia ha sido descrita previamente como un operón *Pho* putativo en *A. ferrooxidans*, que se asemeja al operón *pstSCAB-phoU* de *E. coli* (Vera y col., 2003) pero que incluye los genes *ppx*, *phoB* y *phoR*. Estos últimos genes en *E. coli* están presentes en otras zonas del genoma. En ambos alineamientos se obtiene un contexto genómico de *M. tuberculosis* que está centrado en *pstS1*, que aparece más abajo en el orden de porcentaje de identidad dentro de las especies, lo que significa que la identidad con el contexto de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 es menor si se toma como referencia *pstS2* que con el contexto de *pstS1* (Fig. 20). En el contexto genómico de *Sulfobacillus acidophilus* se encuentra río abajo de *pstS* el marco de lectura abierto TPY_2851. Este gen está anotado como una permeasa de aminoácidos, y no posee identidad de secuencia significativa (sobre 25%) con alguna de las proteínas de *A. ferrooxidans* anotadas como permeasas de fosfato.

De los organismos analizados en Absynte, todos poseen genes anotados como los reguladores del sistema *Pho*, *phoB* y *phoR*, pero se dan casos en los que esta situación no es evidente. Por ejemplo *A. capsulatum* no posee genes anotados como *phoB* o *phoR*, pero por alineamiento de secuencia con los genes de *A. ferrooxidans* y *E. coli* se identifican dos genes, ACP_0935 y ACP_0936, que podrían cumplir el rol de *phoB* y *phoR* respectivamente, y por su disposición en el genoma aparentan formar un operón.



Figura 20. Alineamiento de contextos genómicos utilizando *pstS2* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 como referencia. Modificado desde Absynthe.

S. acidophilus posee dos proteínas anotadas como PstS. La primera aparece anotada en las figuras 19 y 20. La segunda aparece anotada río abajo de los genes *vicR* y *phoR*. Según las características que muestra la base de datos de *vicR*, éste sería equivalente a *phoB*, y al igual que en el caso anterior, estarían formando un operón *phoBR*.

4. DISCUSIÓN

4.1 Obtención de las proteínas del secretoma

El presente Seminario de Título se realizó bajo el marco del estudio de las proteínas del secretoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*. La obtención de un extracto de las proteínas extracelulares se llevó a cabo según lo descrito anteriormente en nuestro laboratorio (Pagliai, 2007).

En dicha ocasión se estudiaron diferentes métodos para la obtención de proteínas del secretoma de *A. ferrooxidans*, considerando factores importantes que se hacen presentes con las características fisiológicas del microorganismo, tal como son la baja densidad celular que alcanza en su fase estacionaria, de aproximadamente $2 \cdot 10^8$ células/mL; el grado de acidez que posee el medio extracelular en el cual se desenvuelve, con un pH menor a 2,5; y la baja concentración de proteínas que son secretadas, aproximadamente 1,4 mg/L.

A pesar de existir múltiples métodos de precipitación de proteínas, son pocos los que permiten realizar un análisis de funcionalidad posterior a su obtención. Junto con el método TPP utilizado en la presente investigación, se estudiaron previamente los métodos de precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y con solución rojo de pirogalol-molibdato-metanol (PRMM), cuyos resultados fueron incompatibles con el objetivo de seguir un estudio funcional de las proteínas debido a que el producto es obtenido de forma desnaturalizada, o el rendimiento es demasiado bajo (Pagliai, 2007). El método TPP a pesar de que no consigue un alto rendimiento de extracción, permite

obtener proteínas en estado nativo, y recientemente se ha reportado que este método no afecta mayormente la estructura secundaria de las proteínas tratadas (Rather y Gupta, 2013), a pesar de que se podría considerar agresivo al tener factores como la saturación con sulfato de amonio, cosmotropía, aumento de la tensión superficial, exclusión y compactación, y en donde la fracción de proteínas es precipitada en la interfase generada entre la fracción acuosa y la fase orgánica. Junto con su simpleza, supone un procedimiento más conveniente si se compara con otros métodos más utilizados.

Al agregar un concentrado del secretoma obtenido a un cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, se logró reproducir el efecto observado previamente en el laboratorio, en donde la fase de retardo que es característica de los primeros días del crecimiento celular en microorganismos se elimina, ya que desde el primer día de monitoreo se cuenta una densidad celular mayor al inóculo inicial (Jerez y Pagliai, 2009). Este resultado sugiere que las proteínas del secretoma están involucradas en el proceso de crecimiento del cultivo, en donde podrían cumplir un papel metabólico, facilitar la adherencia sobre el sustrato, favorecer la formación de una biopelícula o por la captación de nutrientes en el sobrenadante del cultivo. La secuenciación de algunos de los componentes del secretoma realizada previamente (Jerez y Pagliai, 2009) muestra que éste está compuesto por proteínas que cumplen un variado espectro funcional como transporte de sustratos, rutas metabólicas, estructurales, etc. Sin embargo, al analizar un gel bidimensional en condiciones desnaturalizantes (Fig. 3), la presencia de algunas proteínas destaca sobre otras, insinuando que su función en el secretoma pudiese ser más importante para el crecimiento del cultivo. Con este criterio, se eligieron tres de las proteínas más representativas del sobrenadante de cultivo con el propósito de estudiarlas

de forma individual en ensayos funcionales. Estas proteínas son AfPstS-1, TTH y AFE_0043.

4.2 Clonamiento y expresión recombinante de genes de interés

La amplificación de los genes se realizó de forma de amplificar el gen completo, incluyendo el péptido señal y el codón de término de la transcripción y así sobreexpresar la proteína completa, evitando la fusión con el marcaje de polihistidina que el vector pTrcHis2A codifica en el extremo C-terminal para evitar posibles interferencias del epítipo al momento de detectar un posible efecto del extracto sobre el crecimiento. La inducción de la expresión de las proteínas entregó los resultados esperados para AFE_0043 y TTH, en donde se visualizaron las bandas de proteínas en el peso estimado según su secuencia en los geles de poliacrilamida posterior al procesamiento del péptido señal por parte de la maquinaria de secreción del sistema Sec de *E. coli*, tanto de la fracción total como de la fracción soluble del cultivo de inducción. Para AfPstS-1 el caso no es el mismo, ya que difícilmente se distingue la banda de la proteína al existir una proteína de *E. coli* con un peso similar a AfPstS-1. Sin embargo, el extracto total que contiene AfPstS-1 es el único que mostró un efecto en los ensayos para detectar un posible efecto de las proteínas individuales.

4.3 Determinación del efecto de las proteínas seleccionadas

Los ensayos realizados muestran que entre las tres proteínas escogidas desde el secretoma, sólo AfPstS-1 presentó un efecto en el crecimiento de los cultivos, eliminando la etapa de retraso que se da al comienzo del crecimiento bacteriano. En este

caso, se debe considerar la fase de retraso del cultivo al cual se le agregó el extracto total libre de células cuyo vector de expresión no contenía inserto y que se utiliza como control negativo, ya que se observa que este extracto tiene un efecto en el crecimiento al compararlo con un cultivo al que no se le agregó un extracto. Es posible que esto se deba a que dicho extracto de *E. coli* posee restos orgánicos como ADN, metabolitos y proteínas, que potencialmente resulten en una facilitación de la adherencia a las perlas de azufre o sean absorbidos por *A. ferrooxidans*, lo que haría que las bacterias del cultivo dedicasen su energía a otros procesos metabólicos como síntesis de ácidos nucleicos, enzimas y proteínas estructurales, permitiendo acortar la fase de retraso a un día. En condiciones normales de cultivo en donde existe un exceso de fosfato (sobre 1 mM), EcPstS es detectable en fracciones periplasmáticas (Willsky y Malamy, 1976), aunque estos niveles de expresión llegarían solo al 2% del máximo posible en condiciones de carencia de fosfato (Garen y Otsuji, 1964). La presencia de pequeñas cantidades de EcPstS en los extractos utilizados podría ser una de las causas por las que el control negativo ejerce un efecto sobre el crecimiento de *A. ferrooxidans*.

Se observó que AfPstS-1 eliminó la etapa de retraso del crecimiento, en la que el cultivo se desarrolló a la par con el control positivo de las proteínas del secretoma a una misma concentración de 25 µg/mL de cultivo y el conteo celular se mantuvo por sobre el control del vector sin inserto durante la mayor parte del transcurso del ensayo. Este resultado sugiere que AfPstS-1 podría cumplir un papel temprano en el desarrollo de la biopelícula sobre las perlas de azufre, donde posiblemente facilita la adherencia de las bacterias sobre el sustrato sólido o ejerce su función como captador de fosfato. Sin embargo, no podemos atribuirle la totalidad del efecto a AfPstS-1 ya que, como se

discutió previamente, el control con el vector sin inserto también posee un efecto intrínseco sobre el crecimiento. Previamente se han publicado estudios que dan cuenta de cambios en el proteoma y en la fisonomía de *A. ferrooxidans* cuando se cultiva en carencia de fosfato (Seeger y Jerez, 1992; Seeger y Jerez, 1993) y además se ha reportado que *A. ferrooxidans* sobreexpresa ambas PstS en carencia de fosfato, (Vera y col., 2003, Vera, 2006) y están presentes en el periplasma debido a que poseen un péptido señal del sistema Sec (Chi y col., 2007). Coincidentemente, *A. ferrooxidans* se adhiere más rápidamente al sustrato cuando es cultivado en condiciones limitantes de fosfato (Amaro y col., 1993), sugiriendo que puede existir una relación entre la AfPstS-1 extracelular y la adherencia al sustrato. Es posible que AfPstS-2 también tenga un rol en la adherencia al azufre, pero esta proteína no se encontró entre las que se eligieron para su identificación desde los geles bidimensionales del secretoma, por lo que no podemos asegurar la ausencia de esta proteína en el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*. Se ha demostrado que la carencia de fosfato en *A. ferrooxidans* induce la expresión del sistema de quorum sensing (QS) de tipo AI-1 canónico y funcional, a través del aumento de la transcripción de *afeI*, y por lo tanto, los niveles de acil-homoserinas lactonas (AHL) (Farah y col., 2005). Además, al añadir AHL de cadena larga a cultivos en azufre y pirita se incrementa la adherencia de *A. ferrooxidans* al sustrato sólido (González y col., 2012). Es posible que este sistema actúe de forma similar a lo descubierto en *P. aeruginosa*, donde el regulador transcripcional PhoB induce la expresión del sistema de QS en carencia de fosfato afectando su motilidad (Blush-Kadosh y col., 2013).

Existen numerosos reportes relacionando la carencia de fosfato en el medio y la sobreexpresión de proteínas del sistema Pst en otros organismos, las que resultan estar

involucradas en la adherencia durante el proceso de formación de biopelículas mientras ocurre la infección del hospedero, cuyas PstS o proteínas de anotación similar están expuestas en la Tabla 3.

Tabla 3. Presencia de PstS en las diferentes bacterias identificadas en las búsquedas de identidad de secuencia y en la base de datos del NCBI.

Espece	Proteínas anotadas como PstS	Proteínas con anotación similar ^b	Acceso
<i>A. ferrooxidans</i> 23270	2	-	YP_002426348.1; YP_002425864.1
<i>A. ferrivorans</i> SS3	-	2	YP_004783769.1; YP_004783991.1
<i>A. caldus</i> SM-1	2	-	YP_004748729.1; YP_004749082.1
<i>A. capsulatum</i> 51196	2	-	YP_002755580.1; YP_002755968.1
<i>A. multivorum</i>	-	1	YP_004284388.1
<i>A. cryptum</i> JF-5	-	1	YP_001235035.1
<i>Acidocella</i> sp.	-	1	WP_008494697.1
<i>A. acidocaldarius</i> Tc-4-1	-	1	YP_005518445.1
<i>S. acidophilus</i> TPY	1	1	YP_004720748.1; AEJ41005.1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	3	-	1PC3_A; YP_177769.1; YP_177768.1
<i>E. coli</i> K-12	1	-	NP_418184.1
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	1	2 ^b	NP_254056.1; NP_251238.1 ^b ; EHS36134.1 ^b
<i>B. subtilis</i> 168	1	-	NP_390378.1
<i>P. mirabilis</i> HI4320	-	1	YP_002152594.1
<i>S. mutans</i> UA159	-	1	NP_721524.1

^a Se incluyeron proteínas cuya anotación no las identifica directamente como PstS, pero sí como proteína de unión de fosfato. ^b Proteínas hipotéticas.

En la principal bacteria culpable de la caries dental, *Streptococcus mutans*, un sistema Pst intervenido al introducir una inserción en el gen *pstS* presenta un menor crecimiento y resulta en una menor capacidad para formar biopelículas, específicamente sobre una superficie abiótica con el objetivo de simular el esmalte dental, en condiciones de abundancia de fosfato inorgánico (Luz y col., 2012).

El homólogo de *pstS1* en *Pseudomonas aeruginosa* y en *Pseudomonas putida* forma parte de una serie de genes que se han asociado al proceso de adherencia a las células epiteliales del sistema gastrointestinal. En estos casos, una baja concentración de fosfato en el medio induce la formación de apéndices extracelulares independientes del pili, que están compuestos por PstS y otras macromoléculas, siendo esenciales en la adherencia a las células epiteliales y su posterior disrupción, y además estaría asociado al sistema alternativo de secreción de Tipo II Hxc, también inducible en carencia de fosfato (Zaborina y col., 2008; Duque y col., 2013). De forma interesante, PstS de *P. aeruginosa* posee un porcentaje de identidad demasiado bajo con AfPstS-1 para poder realizar un alineamiento de secuencia, y con AfPstS-2 tiene un 30% de identidad, pero ésta es cubriendo la mitad de la secuencia de AfPstS-2. Esto se repite con EcPstS, donde la identidad es aún menor, llegando al 22% con el homólogo de *P. aeruginosa*, pero cubriendo el 23% de la secuencia de la proteína de *E. coli*. Realizando búsquedas de secuencias en la base de datos con PstS de *P. aeruginosa*, se encuentran dos proteínas hipotéticas similares que han sido anotadas en la Tabla 3.

El homólogo PstS-1 de *Mycobacterium bovis* se encuentra presente tanto en el sobrenadante de cultivo como en la superficie celular en condiciones limitantes de fosfato (Lefèvre y col., 1997) e inclusive en condiciones normales de cultivo (Mattow y col., 2003) y la disrupción del gen provoca una baja en la virulencia de *M. tuberculosis* (Peirs y col., 2005).

En *Proteus mirabilis*, un patógeno del tracto urinario de los seres humanos, el sistema de transporte Pst es considerado un factor de virulencia (Jacobsen y col., 2008) y disrupciones en sus genes, específicamente *pstS* y *pstA*, resultan en que dichos mutantes

vean atenuada su capacidad de formación de biopelículas, proceso esencial en la infección, siendo más crítica la mutación en *pstS* (O'May y col., 2009).

En el caso de *Bacillus subtilis*, PstS se encuentra sobreexpresada en condiciones limitantes de fosfato, encontrándose tanto en el citoplasma como en el medio extracelular (Antelmann y col., 2000; Tjalsma y col., 2004).

Un caso de estudio indica que PstS no necesariamente está involucrada directamente en la adherencia de *E. coli*, específicamente de cepas enteropatógenicas, en donde se ha demostrado la implicancia del operón Pst en la adherencia a células epiteliales del sistema gastrointestinal. Aquí, cepas mutantes polares y no polares de *pstS*, mostraron diferentes grados de adherencia en los sistemas de estudio, siendo el mutante no polar, que presenta un sistema Pho en expresión constitutiva, el que mantenía los niveles de adherencia a niveles normales, indicando que en este microorganismo la unión a las células epiteliales depende de genes que se inducen gracias a la actividad del sistema Pst-Pho en condiciones limitantes de fosfato (Ferreira y Spira, 2008; Cheng y col., 2009).

AFE_0043 y TTH no mostraron un efecto en la etapa de retardo del crecimiento al ser comparadas con el control. Esto puede ser debido a que no cumplen un rol relevante en el crecimiento temprano sobre las perlas de azufre o el desarrollo de la biopelícula necesaria, a pesar de ser las proteínas en mayor proporción en el secretoma obtenido por la partición en tres fases.

Al ser AFE_0043 una proteína hipotética, no existen estudios específicos de su caracterización. Se realizó una búsqueda por medio de BLASTp dentro de la base de datos disponible, y se identificó la proteína putativa de unión a sulfato periplasmático de

A. ferrooxidans ATCC 53993 con un porcentaje de identidad del 100%. Previamente AFE_0043 había sido anotado putativamente como *modA1*, determinándose su sobreexpresión en cultivos con azufre o tiosulfato como sustrato al ser contrastados con cultivos en hierro (Ramírez y col., 2004; Acosta y col., 2005). Esta es la proteína más abundante detectada en el medio extracelular, sin embargo en la literatura no existen estudios que den cuenta de este fenómeno en *A. ferrooxidans* o en otros organismos. Si el rol de AFE_0043 es efectivamente la captación de sulfato en el medio extracelular, esta función podría verse opacada por el material intracelular proveniente de *E. coli* que podría tener la cantidad de sulfato suficiente para que la presencia de AFE_0043 sea irrelevante. Otras alternativas que expliquen por qué la proteína no genera un efecto detectable pueden ser que su plegamiento sea incorrecto durante la inducción de la expresión en *E. coli*, o que no cumpla un rol en la etapa de retardo del crecimiento de *A. ferrooxidans*.

Previamente, Kanao y colaboradores (2010) estudiaron el plegamiento de TTH expresada de forma recombinante con su estructura primaria madura, obtenida a partir de cuerpos de inclusión desde *E. coli*, en donde se determinó que en estas condiciones es necesario un pH ácido para obtener un plegamiento correcto de la proteína *in vitro*, lo que se condice con la acidez presente en el periplasma y el exterior de *A. ferrooxidans*. Por lo tanto, nos indica que a pesar de haber obtenido la proteína en el extracto soluble libre de células, es posible que su conformación estructural no sea la necesaria para tener actividad enzimática, y por ende, un efecto sobre el crecimiento. A pesar de lo anterior, en este trabajo TTH se expresó de forma completa, por lo que su péptido señal podría provocar que la proteína sea exportada al periplasma y sea plegada por medio del

sistema Sec de *E. coli*, pero llegando a una conformación inactiva. Se ha determinado la presencia de TTH periplasmática y extracelular en *A. ferrooxidans* cuando se desarrollan cultivos en tiosulfato, pirita o azufre (Chi y col., 2007; Jerez y Pagliai, 2009; Beard y col., 2011), en donde estaría participando en el metabolismo extracelular de compuestos sulfurados inorgánicos reducidos y describiéndose su actividad tanto en el interior como en exterior de la célula (Beard y col., 2011). En presencia de O₂, Fe³⁺ y pH ácido, se genera acumulación de tetrionato (Druschel y col., 2003), por lo que la bacteria sulfooxidante debería ser capaz de metabolizarlo por medio de TTH.

4.4 Análisis bioinformáticos

Siguiendo lo reportado previamente (Vera y col., 2003) un alineamiento entre las proteínas EcPstS, AfPstS-1 y AfPstS-2 muestra que los residuos aminoacídicos involucrados en la unión a fosfato inorgánico de AfPstS-1 se ven conservados con respecto a EcPstS, excepto por los residuos Phe11 y Thr141, al contrario de AfPstS-2, que no conserva sólo un residuo, Phe11. Sin embargo, AfPstS-2 posee el residuo Gly8 que comparte la misma ubicación que Ser11 en AfPstS-1 y además conserva Thr141 del homólogo de *E. coli*, lo que en conjunto significaría que posee ocho residuos en su sitio de unión a fosfato. Así, AfPstS-1 tendría nueve residuos interactuando con el fosfato, y AfPstS-2 tendría ocho. Esto podría significar que AfPstS-2 posee una menor afinidad por el fosfato. Además, el porcentaje de identidad entre AfPstS-1 y EcPstS es menor a la reportada con AfPstS-2. Según los porcentajes de identidad calculados, AfPstS-2 es el equivalente a PstS de *E. coli* y además ambas estarían presentes en un operón *Pho*.

La disponibilidad de una estructura cristalográfica de PstS-1 de *M. tuberculosis* permitió estimar la conformación tridimensional por un método *in silico* del homólogo de *A. ferrooxidans*. La completa conservación de los residuos del sitio de unión resulta interesante ya que está compuesto por una serie de cadenas laterales que forman un bolsillo altamente electropositivo, que se mantienen en la misma disposición en *A. ferrooxidans* y estarían formando los trece puentes de hidrógeno descritos en *M. tuberculosis* (Vyas y col., 2003). Al alinear los modelos obtenidos para AfPstS-1 y AfPstS-2 se observa cómo la posición de las estructuras secundarias se mantiene de forma similar en ambas proteínas, conservando la estructura terciaria sin que éstas tengan una alta identidad de secuencia (32,6%) y conservando su función de captar el fosfato circundante. Como ambos modelos son hechos *in silico*, no es posible asegurar la fidelidad de la alineación de dos estructuras teóricas.

La alta acidez del medio en el que se encuentra AfPstS-1 hace que ésta esté altamente protonada, pero sin llegar a un punto en el que su carga neta sea neutral, ya que su pI teórico es de 9,26. Esta alta protonación resulta en una carga electropositiva distribuida en toda la superficie proteica. Se podría razonar que una superficie cargada positivamente facilitaría la unión a un anión como lo es H_2PO_4^- , sin embargo, estudios hechos sobre EcPstS demuestran que esto no necesariamente es verdad, debido a que ensayos de afinidad hechos a pH básico (8 a 9,3) muestran que la proteína tiene una afinidad de un orden de magnitud diez veces mayor que a pH 4,5 (Ledvina y col., 1996; Yao y col., 1996).

Al realizar el cálculo a un pH neutro se puede observar que las cargas positivas y negativas sobre la superficie se presentan casi de manera uniforme, exceptuando un

parche de carga electronegativa en las proximidades del sitio de unión, que además posiblemente le permita al transportador de fosfato asociarse a las permeasas PstA o PstB presentes en la membrana interna, como se espera para su homólogo en *M. tuberculosis* (Vyas y col., 2003).

Es probable que al igual que en *M. tuberculosis* PstS-1 cumple un rol como factor de virulencia, se pueda establecer como un evento paralelo en *A. ferrooxidans* la unión al sustrato, aunque, no se ha demostrado que PstS-1 en *M. tuberculosis* participe directamente en la adherencia a las células epiteliales del aparato respiratorio, pero hay datos que sugieren que dicho ambiente es limitante en fosfato inorgánico (Rifat y col., 2009).

El alineamiento con la base de datos disponible permitió identificar homólogos de AfPstS-1 que compartieran una alta identidad con la proteína de estudio. De modo interesante, la gran mayoría de los homólogos comparten la característica de ser acidófilos (exceptuando el caso de *M. tuberculosis*), sugiriendo que las adaptaciones de la proteína al medio se mantienen de forma transversal en las especies identificadas, junto con que los nueve residuos descritos en *M. tuberculosis* se presentan completamente conservados para estas especies. Este resultado sugiere que estos microorganismos acidófilos podrían utilizar un mecanismo de unión al sustrato similar al de *A. ferrooxidans*.

Utilizando como referencia las especies encontradas en la búsqueda de la base de datos para PstS-1, se realizó un alineamiento de los contextos genómicos con la finalidad de identificar los genes que están en las proximidades de *pstS1* en *A. ferrooxidans* y estudiar la posibilidad de que éstos estén relacionados transcripcional

o funcionalmente. Río abajo de *pstS1* se encuentran *pstC1* y *pstC2*, que en la literatura están anotadas como permeasas de fosfato inorgánico y que serían los genes cuyos productos se encarguen de realizar el transporte de fosfato a través de la membrana interna. *pstS1C1C2* sería una duplicación truncada del operón *pstS2C2AB-phoU* canónico ubicado en otra zona del genoma (Vera, 2006). En otros organismos, *pstC2* está reemplazado por *pstA* que también está anotada como permeasa. Esto permite ver que los organismos acidófilos que se hallaron por medio de BLASTp podrían compartir la característica de poseer un operón putativo *pstS1C1C2* o *pstSCA*, que tal vez esté involucrado en la adherencia al sustrato como los resultados en *A. ferrooxidans* sugieren. El alineamiento, usando como referencia el gen *afpstS2* en los mismos microorganismos, muestra que el gen *pstS* de *E. coli*, dentro de su operón *pho*, tiene un porcentaje de identidad mayor con el contexto genómico de *afpstS2* comparado con el contexto de *afpstS1*, por lo que se sitúa más arriba en la lista de genomas. Previamente (Vera, 2006) se estudió la inducción de los genes del regulón *Pho* en situación de carencia de fosfato en un medio con tiosulfato como sustrato, a través de macroarreglos de ADN. Se encontró que los genes *pstC2*, *pstA*, *pstS1*, *phoU*, *phoB* presentan niveles de transcrito mayores de tres veces en la condición de carencia de fosfato, en donde los niveles de transcrito de *pstS1* son los que muestran mayor inducción. Cuando se realizaron experimentos en un medio sin fosfato, los genes *pstS1*, *pstS2*, *pstC1*, *pstC2* y *pstA* presentaron un aumento de la transcripción de más de tres veces comparada con la presencia de fosfato. Nuevamente, *pstS1* fue el gen que presentó el mayor aumento en sus niveles de transcrito. Junto con estos resultados, se realizó un PCR en tiempo real para analizar el nivel de expresión de *pstS1* y *pstS2* en medios con tiosulfato o ión

ferroso como sustrato, encontrándose nuevamente con altos niveles de inducción de *pstS1* por sobre los de *pstS2*. Esto llevó a la conclusión de que el aumento de los niveles de transcrito de *pstS1* es independiente de la fuente de energía utilizada por *A. ferrooxidans* cuando ésta se enfrenta a una carencia de fosfato. Cabe destacar que la notación utilizada en este trabajo es la que se encuentra actualmente en la base de datos del NCBI, y no la utilizada previamente (Vera y col., 2003; Vera, 2006).

Con estos alineamientos se identifican genes putativos que podrían ser los sistemas de transporte de fosfato cuando éste se encuentra en bajas concentraciones en el medio, conservándose en organismos acidófilos y neutrófilos, y que además posiblemente estén involucrados en la adherencia a superficies de forma similar a los microorganismos mencionados previamente. Muchos de los microorganismos identificados con proteínas PstS, tales como *A. ferrivorans*, *A. caldus*, *A. capsulatum*, *A. cryptum*, *A. multivorum* y *S. acidophilus* se han encontrado en drenajes ácidos de mina o son capaces de participar en procesos de biolixiviación (Escobar y col., 2013; Dopson y Lindström, 1999; García-Moyano y col., 2007; Kishimoto y col., 1991; Liljeqvist y col., 2012; Wakao y col., 1994).

5. CONCLUSIONES

1. La proteína AfPstS-1, que forma parte del secretoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, al ser agregada a cultivos iniciales de dicha bacteria creciendo en azufre elemental, acorta la etapa de retardo al inicio del crecimiento. Esto se condice con lo descrito previamente para esta bacteria y para *P. aeruginosa*, sugiriendo que AfPstS-1 podría actuar como intermediario entre la bacteria y su sustrato.
2. TTH y AFE_0043 no tuvieron un efecto detectable en el modelo de estudio utilizado.
3. Las estructuras terciarias de AfPstS-1 y AfPstS-2 son altamente conservadas con las de su homólogo de *M. tuberculosis*. El sitio de unión a fosfato de AfPstS-1 también presenta alta identidad con el de otras proteínas PstS homólogas de microorganismos acidófilos.
4. Otras especies acidófilas que se han encontrado en procesos de biolixiviación de minerales sulfurados, también poseen proteínas ortólogas a PstS-1 con contextos genómicos semejantes, por lo que esta proteína podría cumplir una función similar en todos estos microorganismos que viven en ambientes parecidos.
5. Como proyección de estos estudios será importante el estudio futuro del efecto de PstS-1 en *A. ferrooxidans* crecido sobre minerales para establecer su posible aplicación en biominería.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta M, Beard S, Ponce J, Vera M, Mobarec JC y Jerez CA. 2005. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS* **9**: 13-29.
- Amaro A, Chamorro D, Seeger M, Arredondo R, Peirano I y Jerez CA. 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**: 910-915.
- Amaro AM, Seeger M y Jerez CA. 1992. Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **98**: 29-33.
- Amaro AM, Seeger M, Arredondo R, Moreno M y Jerez CA. 1993. The growth conditions affect *Thiobacillus ferrooxidans* attachment to solids. In: Torma AE, Apel ML, Brierley CL (Eds.), *Biohydrometallurgical Technologies II*. TMS, Warrendale, 577-585.
- Antelmann H, Scharf C y Hecker M. 2000. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J. Bacteriol.* **182**: 4478-4490.
- Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, van Dijk JM y Hecker M. 2001. A proteomic view on genome based signal peptide predictions. *Genome Res.* **11**: 1484-1502.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, y Schwede T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**: 195-201.
- Arredondo R, Toledo H, Peirano I, Chamorro D y Jerez CA. 1988. Studies of the stress response in chemolithotrophic acidophilic bacteria. *Biochem. Int.* **17**: 989-999.
- Arredondo R, García A y Jerez CA. 1994. The partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its attachment to solids. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2846-2851.
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ y McCammon JA. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 10037-10041.

- Beard S, Paradela A, Albar JP y Jerez CA. 2011. Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in thiosulfate under oxygen-limiting conditions generates extracellular sulfur globules by means of a secreted tetrathionate hydrolase. *Front. Microbiol.* **2**: 79-89.
- Bendtsen JD, Kierner L, Fausbøll A y Brunak S. 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol.* **5**: 58-71.
- Berks B, Palmer T y Sargent F. 2005. Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:174-181.
- Blus-Kadosh I, Zilka A, Yerushalmi G y Banin E. 2013. The effect of *pstS* and *phoB* on quorum sensing and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* 2013 **8**:e74444.
- Bobadilla R, Levican G y Parada P. 2010. *Acidithiobacillus thiooxidans* secretome containing a newly described lipoprotein Licanantase enhances chalcopyrite bioleaching rate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**: 771-780.
- Bohinsky R. 1978. Proteínas. Bioquímica. Fondo Educativo Interamericano S.A. Estados Unidos de América. 111-152.
- Brierly JA. 1978. Thermophilic iron-oxidizing bacteria found in copper leaching dumps. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 523-525.
- Ceskova P, Mandl M, Helanova S y Kasparovska J. 2001. Kinetics studies on elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: sulfur limitation and activity of free and adsorbed bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **78**: 24-30.
- Comisión Chilena del Cobre, COCHILCO. 2013a. Informe Tendencias del Mercado del Cobre, Abril - Junio 2013. www.cochilco.cl/archivos/Trimestral/20130717114159_Informe%20Tendencias%20%20abril-%20junio%202013%20Versi%C3%B3n%20final%202013.pdf
- Comisión Chilena del Cobre, COCHILCO, Dirección de Estudios. 2013b. Inversión en la Minería Chilena, Cartera de Proyectos 2013-2021. http://www.cochilco.cl/descargas/estudios/tematico/inversion/INVERSIONES_MIN_2013.pdf
- Chang Z, Choudhary A, Lathigra R y Quijoch FA. 1994. The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269**: 1956-1958.
- Cheng C, Tennant SM, Azzopardi KI, Bennett-Wood V, Hartland EL, Robins-Browne RM y Tauschek M. 2009. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by

atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* **77**: 1936-1944.

Chi A, Valenzuela L, Beard S, Mackey AJ, Shabanowitz J, Hunt DF y Jerez CA. 2007. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomic analysis. *Mol. Cell Proteomics.* **6**: 2239-2251.

Crundwell FK. 2003. How do bacteria interact with minerals? *Hydrometallurgy.* **71**: 75-81.

Dennison D y Lovrien R. 1997. Three phase partitioning: concentration and purification of proteins. *Prot. Exp. Pur.* **11**: 149-161.

Despalins A, Souhir M y Jacques O. 2011. Absynte: a web tool to analyze the evolution of orthologous archaeal and bacterial gene clusters. *Bioinformatics.* **27**: 2905-2906.

Devasia P, Natarajan KA, Sathyanarayana DN y Rao Gr. 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4051-4055.

Dobner E, Huber H y Stetter KO. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidezer. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2922-2923.

Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA y Baker NA. 2004. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**: 665-667.

Dolinsky TJ, Czodrowski P, Li H, Nielsen JE, Jensen JH, Klebe G y Baker NA. 2007. PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations. *Nucleic Acids Res.* **35**: 522-525.

Dopson M y Lindström EB. 1999. Potential role of *Thiobacillus caldus* in arsenopyrite bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 36-40.

Druschel GK, Hamers RJ y Banfield JF. 2003. Kinetics and mechanism of polythionate oxidation to sulfate at low pH by O₂ and Fe³⁺. *Geochim. Cosmochim. Acta.* **67**: 4457-4469.

Duque E, de la Torre J, Bernal P, Molina-Henares MA, Alaminos M, Espinosa-Urgel M, Roca A, Fernández M, de Bentzmann S y Ramos JL. 2013. Identification of reciprocal adhesion genes in pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas*. *Environ. Microbiol.* **15**: 36-48.

Escobar B, Bravo D, Jaque I, Collari A y Vargas T. 2013. Bioleaching of sulphide minerals with *Sulfobacillus acidophilus* at 45°C. *Adv. Ma. Res.* **825**: 284-287.

- Espejo RT y Romero P. 1987. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1907-1912.
- Espitia C, Elinos M, Hernandez-Pando R y Mancilla R. 1992. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect. Immun.* **60**: 2998-3001.
- Farah C, Vera M, Morin D, Haras D, Jerez CA y Guiliani N. 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7033-7040.
- Fekkes P y Driessen AJ. 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 161-173.
- Ferreira GM y Spira B. 2008. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. *Microbiol.* **154**: 2025-2036.
- García-Moyano A, González-Toril E, Aguilera A y Amils R. 2007. Prokaryotic community composition and ecology of floating macroscopic filaments from an extreme acidic environment, Río Tinto (SW, Spain). *Syst. Appl. Microbiol.* **30**: 601-614.
- Garen A y Otsuji N. 1964. Isolation of a protein specified by a regulator gene. *J. Mol. Biol.* **8**: 841-852.
- González A, Bellenberg S, Mamani S, Ruiz L, Echeverría A, Soulère L, Doutheau A, Demergasso C, Sand W, Queneau Y, Vera M y Guiliani N. 2013. AHL signaling molecules with a large acyl chain enhance biofilm formation on sulfur and metal sulfides by the bioleaching bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**:3729-3737.
- Humphrey W, Dalke A y Schulten K. 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics.* **14**: 33-38.
- Jacobsen SM, Lane MC, Harro JM, Shirliff ME y Mobley HLT. 2008. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **52**: 180-193.
- Jerez CA. 2011. Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. *En: Murray Moo-Young (ed.), Comprehensive Biotechnology. Segunda edición. Volumen 3 pp. 717-729. Elsevier, Amsterdam.*

Jerez CA. 2013. The use of extremophilic microorganisms in the industrial recovery of metals. *En: Om V. Singh (ed.), Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications.* pp. 319-334. Wiley, New Jersey.

Jerez CA y Pagliai F. 2009. Solicitud de Patente INAPI, N° 1831-2009.

Kanao T, Matsumoto C, Shiraga K, Yoshida K, Takada J y Kamimura K. 2010. Recombinant tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* requires exposure to acidic conditions for proper folding. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**: 43-47.

Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L y Schwede T. 2009. The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res.* **37**: 387-392.

Kishimoto N, Kosako Y y Tano T. 1991. *Acidobacterium capsulatum* gen. nov., sp. nov.: an acidophilic chemoorganotrophic bacterium containing menaquinone from acidic mineral environment. *Curr. Microbiol.* **22**: 1-7.

Kuprovic M, Peixeiro N, Bettstetter M, Rachel R y Prangishvili D. 2012. Archaeal tetrathionate hydrolase goes viral: secretion of a sulfur metabolism enzyme in the form of virus-like particles. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5463-5465.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.

Ledvina PS, Yao N, Choudhary A y Quioco FA. 1996. Negative electrostatic surface potential of protein sites specific for anionic ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6786-6791.

Lefèvre P, Braibant M, de Wit L, Kalai M, Röeper D, Grötzinger J, Delville JP, Peirs P, Ooms J, Huygen K y Content J. 1997. Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **179**: 2900-2906.

Liljeqvist M, Rzhapishevskaya OI y Dopson M. 2012. Gene identification and substrate regulation provide insights into sulfur accumulation during bioleaching with the psychrotolerant acidophile *Acidithiobacillus ferrivorans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 951-957.

Luecke H y Quioco FA. 1990. High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature.* **347**: 402-406.

Luz DE, Nepomuceno RSL, Spira B y Ferreira RCC. 2012. The Pst system of *Streptococcus mutans* is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces. *Mol. Oral. Microbiol.* **27**: 172-181.

Makino K, Amemura M, Kim S, Nakata A y Shingawa H. 1994. Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. En: Torriani-Gorini A, Yagil E y Silver S. (eds.), Phosphate in Microorganisms. pp. 5-12. ASM Press, Washington, D.C.

Mattow J, Schaible UE, Schmidt F, Hagens K, Siejak F, Brestrich G, Haeselbarth G, Müller EC, Jungblut PR y Kaufmann SH. 2003. Comparative proteome analysis of culture supernatant proteins from virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and attenuated *M. bovis* BCG Copenhagen. Electrophoresis. **24**: 3405-3420.

Myerson AS y Kline P. 1983. The adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid particles. Biotechnol. Bioeng. **25**: 1669-1676.

Nakashima H y Nishikawa K. 1994. Discrimination of intracellular and extracellular proteins using aminoacid composition and residue-pair frequencies. J. Mol. Biol. **238**: 54-61.

Ohmura N, Tsugita K, Koizumi JI y Saiki H. 1996. Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. **178**: 5776-5780.

O'May GA, Jacobsen SM, Longwell M y Stoodley P. 2009. The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. Microbiology. **155**: 1523-1535.

Pagliai F. 2007. Evaluación de tres diferentes métodos para la obtención de las proteínas extracelulares de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Seminario de Título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Peirs P, Lefe P, Boarbi S, Wang XM, Denis O, Braibant M, Pethe K, Loch C, Huygen K y Content J. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* with disruption in genes encoding the phosphate binding proteins PstS1 and PstS2 is deficient in phosphate uptake and demonstrates reduced in vivo virulence. Infect. Immun. **73**: 1898-1902.

Peitsch MC. 1995. Protein modeling by E-mail. Na. Biotechnol. **13**: 658-660.

Pronk JT, Meulenberg R, Hazeu Z, Bos P y Kuenen JG. 1990. Oxidation of inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. FEMS Microbiol. Rev. **75**: 293-306.

Pronk JT, Meijer W, Hazeu W, van Dijken JP, Bos P y Keunen JG. 1991. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 2057-2062.

Rabilloud T, Carpentier G y Tarroux P. 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. Electrophoresis. **9**: 288-291.

Ramírez P, Guiliani N, Valenzuela L, Beard S y Jerez CA. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4491-4498.

Rather GM y Gupta MN. 2013. Three phase partitioning leads to subtle structural changes in proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* **60**: 134-140.

Rawlings DE. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **6**: 65-91.

Rawlings DE y Kusano T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**: 39-55.

Rifat D, Bishai WR y Karakousis PC. 2009. Phosphate depletion: a novel trigger for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *J. Infect. Dis.* **200**: 1126-1135.

Rohwerder T y Sand W. 2007 Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Eng. Life. Sci.* **4**: 301-309.

Schippers A y Sand W. 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms: via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 319-321.

Schneider G. 1999. How many potentially secreted proteins are contained in a bacterial genome? *Gene.* **237**: 113-121.

Seeger M y Jerez CA. 1992. Phosphate limitation affects global gene expression in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.* **10**: 227-237.

Seeger M y Jerez CA. 1993. Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**: 37-42.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O y Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**: 850-858.

Schrödinger, LLC. 2013. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.6.

Solari JA, Huerta G, Escobar B, Vargas T, Badilla-Ohlbaum R y Rubio J. 1992. Interfacial phenomena affecting the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to sulfide minerals surfaces. *Colloids Surf.* **69**: 159-166.

Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, Bron S y van Dijk JM. 2000. Signal peptide-dependant protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 515-547.

Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois F, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, Dubois JF y van Dijk JM. 2004. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretoma. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 207-233.

Torriani-Gorini A. 1994. The Pho regulon of *Escherichia coli*. *En: Torriani-Gorini A, Yagil E y Silver S. (eds.), Phosphate in Microorganisms.* pp. 1-4. ASM Press, Washington, D.C.

Tuovinen O. 1990. Biological fundamentals of mineral leaching processes. *Microbial mineral recovery.* pp. 55-77. McGraw-Hill Book Co., New York, NY.

Vera M, Guiliani N y Jerez CA. 2003. Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* **17**: 125-132.

Vera M. 2006. Metabolismo del fosfato en *Acidithiobacillus ferrooxidans*: caracterización de un posible regulón Pho. Tesis para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Vera M, Schippers A y Sand W. 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 7529-7541.

Vyas NK, Vyas MN y Quijcho FA. 2003. Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure.* **11**: 765-774.

Wakao N, Nagasawa N, Matsuura T, Matsukura H, Matsumoto T, Hiraishi A y Shiota H. 1994. *Acidiphilium multivorum* sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium from pyritic acid mine drainage. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **40**: 143-159.

Wanner B. 1996. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. *En: Neidhardt R et al., (eds.), Escherichia coli and Salmonella, Molecular and Cellular Biology.* pp. 1357-1381. ASM Press, New York.

Watt SA, Wilke A, Patschkowski T y Niehaus K. 2005. Comprehensive analysis of the extracellular proteins from *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100. *Proteomics.* **5**: 153-167.

Willisky GR y Malamy MH. 1976. Control of the synthesis of alkaline phosphatase and the phosphate-binding protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **127**: 595-609.

Yao N, Ledvina PS, Choudhary A y Quioco FA. 1996. Modulation of a salt link does not affect binding of phosphate to its specific active transport receptor. *Biochemistry*. **35**: 2079-2085.

Zaborina O, Holbrook C, Chen Y, Long J, Zaborin A, Morozova I, Wang Y, Turner JR y Alverdy JC. 2008. Structure – function aspects of PstS in multi-drug – resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*. **4**: 43-57.