

UCH-FC
Biotecnología
F219

C.1 ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



“Caracterización del Quorum Sensing de tipo AI-1 en *Acidithiobacillus ferrooxidans*”

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

CAROLINA ISABEL FARAH CHANGKUON

Dr. Nicolás Guiliani Guerin
Director de Memoria de Título

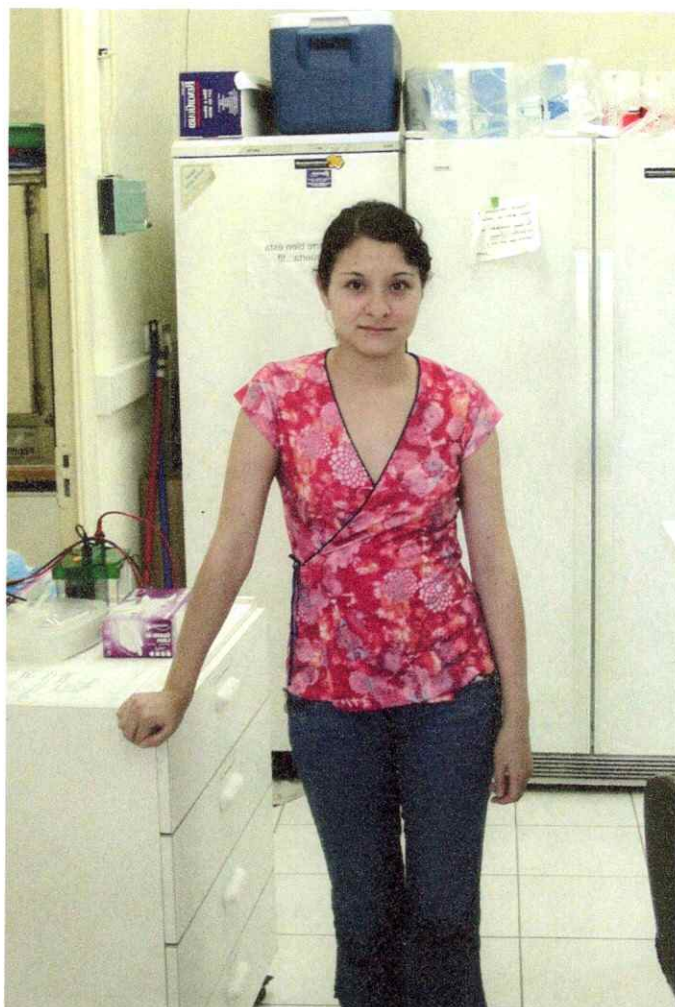
Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Presidente Comisión

Dr. Marcelo Baeza Cancino

Santiago de Chile, 10 de marzo 2006





“Los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran, sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez”.

Gabriel García Márquez.

Agradecimientos

Al finalizar mi memoria de título deseo agradecer a las siguientes personas:

Al Dr. Nicolás Guiliani por haberme recibido como parte de su grupo de trabajo y por supervisar mi memoria de título.

Al Dr. Carlos Jerez por permitirme trabajar en su laboratorio y transmitirme su gran entusiasmo por la investigación.

Al Dr. Canals por su valiosa ayuda en bioestadística.

Al Sr. Juan Araos por el gran apoyo que representa con su invaluable trabajo.

A mis compañeros y ex-compañeros de laboratorio, Sergio Álvarez, Francisco Chávez, Álvaro Orell, Lissette Valenzuela, Mario Vera, Francisco Remonsellez, Felipe Gordillo, Claudio Navarro, Lina Ruiz, Simón Beard, Álvaro Banderas, Susana Valenzuela y José Ponce por su ayuda y los momentos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco especialmente a mis padres Hugo y María Elena, a mi hermano Hugo y a mi abuelita Piedad, por su amor y apoyo. A Mauricio Acosta por su paciencia, amor, apoyo y sobre todo por darme una nueva visión acerca de mi vida. Al Dr. Roberto Fasani por ayudarme a reencontrar el camino cuando me perdía.

Agradezco también a mis profesores que me entregaron sus conocimientos y pasión por la ciencia. A mis compañeros de la Universidad, Paula, Pabla, Karina, Claudia, Karen y Mario, por su ayuda y amistad.

Y a mis amigos, Macarena, Francisco, Marcelo, Siori, Soledad, Jaime, Cristián, Benjamín, Santiago, Felipe, María teresa, Rodrigo y Andrea por los buenos momentos compartidos y por dejarme ver un mundo más diverso.

Y por último a aquello que hace que todos estemos aquí.





I. Índice.

I.	Índice.....	i
II.	Índice de Tablas.....	v
III.	Índice de Figuras.....	vi
IV.	Lista de Abreviaturas.....	viii
1.	Resumen.....	1
2.	Summary.....	3
3.	Introducción.....	5
3.1.	Quorum Sensing.....	5
3.2.	Quorum Sensing de tipo AI-1.....	6
3.2.1.	Familia de Proteínas R.....	8
3.2.2.	Familia de Proteínas I.....	10
3.2.3.	Autoinductor.....	12
3.2.4.	Otras HSL sintasas.....	13
3.3.	Regulación del sistema I/R.....	14
3.3.1.	Aspectos generales.....	14
3.3.2.	Regulación del sistema I/R en <i>Vibrio fischeri</i>	14
3.3.3.	Regulación del sistema I/R en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
3.3.4.	Regulación del sistema I/R en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
3.4.	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	15
3.4.1.	Características generales.....	15
3.4.2.	<i>A. ferrooxidans</i> y Quórum Sensing de tipo AI-1.....	16

3.5.	Hipótesis.....	18
3.6.	Objetivos.....	18
3.6.1.	Objetivo general.....	18
3.6.2.	Objetivos específicos.....	18
4.	Materiales y métodos.....	19
4.1.	Cepas, medios y condiciones de cultivo.....	19
4.2.	Monitoreo del crecimiento celular.....	19
4.3	Extracción de AHLs desde el medio de cultivo de <i>A. ferrooxidans</i>	20
4.4	Técnicas de Biología Molecular.....	20
4.4.1.	Extracción de DNA genómico.....	20
4.4.2.	Extracción de DNA plasmidial.....	21
4.4.3.	Chequeo y cuantificación de Ácidos Nucleicos.....	21
4.4.4.	Digestión con enzimas de restricción y purificación de los fragmentos digeridos.....	21
4.4.5.	Ligación.....	22
4.4.6.	Transformación.....	22
4.4.7.	PCR en colonia.....	22
4.4.8.	Secuenciación.....	24
4.5.	Purificación de AfeR y generación de anticuerpos.....	24
4.5.1.	Inducción de la expresión de afeR.....	24
4.5.2.	Purificación de cuerpos de inclusión.....	24
4.5.3.	Purificación de AfeR por electroelución.....	25
4.5.4.	Cuantificación de AfeR.....	25
4.5.5.	Secuenciación de AfeR recombinante.....	26

4.5.6. Generación de anticuerpos policlonales para AfeR.....	26
4.5.7. Limpieza del suero policlonal de conejo.....	26
4.6. Detección de AfeR mediante Western blot.....	27
4.7. Detección del mRNA del par <i>afeI/R</i> por RT-PCR y cuantificación del mRNA de <i>afeI</i> y <i>afeR</i> durante la curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i>	27
4.7.1. Extracción de RNA.....	27
4.7.2. Síntesis de cDNA.....	28
4.7.3. PCR.....	29
4.7.4. PCR en tiempo real.....	29
4.7.4.1. Fundamentos teóricos.....	29
4.7.4.2. Curva de calibración.....	31
4.7.4.3. Cuantificación de mRNA.....	32
5. Resultados.....	34
5.1 Caracterización de las AHLs producidas por <i>A. ferrooxidans</i>	34
5.2. Estudio de la expresión del par génico <i>afeI/R</i> mediante RT-PCR.....	35
5.3. Cuantificación del mRNA de <i>afeI</i> y <i>afeR</i> durante la curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> mediante PCR en tiempo real.....	36
5.3.1. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para <i>afeR</i> y <i>afeI</i>	36
5.3.2. Curvas de calibración y determinación de la eficiencia de amplificación de <i>afeI</i> y <i>afeR</i> por PCR en tiempo real.....	38
5.3.3. Cuantificación de los niveles de mRNA de <i>afeI</i> y <i>afeR</i> durante la curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i>	39
5.4. Estudio de la expresión de AfeR mediante Western blot.....	41



5.4.1	Producción de anticuerpos policlonales contra AfeR.....	41
5.4.1.1.	Purificación y digestión de los plásmidos pET y pCRNT-TOPOafer19.....	41
5.4.1.2.	Transformación.....	42
5.4.1.3.	Sobreexpresión y purificación de AfeR en <i>E. coli</i>	43
5.4.1.4.	Generación de anticuerpos contra AfeR.....	44
5.4.2.	Estudio de la expresión de AfeR mediante Western blot.....	45
6.	Discusión.....	47
7.	Conclusiones.....	52
8.	Referencias.....	53
9.	Anexo.....	60



II. Índice de tablas

Tabla 1.

Partidores usados en la clonación de <i>afeR</i> , análisis de RT-PCR y cuantificación de los niveles de mRNA de <i>afeI</i> y <i>afeR</i>	23
--	----



III. Índice de Figuras

Figura 1.	
Organización genética y estructural del operón <i>lux</i>	7
Figura 2.	
Diagrama del complejo ternario [TraR/AI] ₂ TraBox.....	10
Figura 3.	
Estructura cristalina de LasI.....	12
Figura 4.	
Ilustración de los distintos tipos de AHLs.....	13
Figura 5.	
Locus genético del QS de tipo AI-1 en <i>A. ferrooxidans</i>	17
Figura 6.	
Principios del uso del SYBR Green.....	30
Figura 7.	
Producción de AHLs por <i>A. ferrooxidans</i> crecido en azufre durante la curva de crecimiento.....	34
Figura 8.	
Estudio de la transcripción los genes <i>afeI</i> , <i>orf3</i> y <i>afeR</i> en <i>A. ferrooxidans</i>	35
Figura 9.	
PCR en tiempo real de los genes <i>afeR</i> y <i>afeI</i>	37
Figura 10.	
Curvas de calibración para los genes <i>afeR</i> y <i>afeI</i>	38



Figura 11.

Cuantificación de los niveles de mRNA de *afeI* y *afeR* durante las distintas fases del crecimiento bacteriano.....40

Figura 12.

Electroforesis de la digestión de pET y pCRNT-TOPO*afeR*19 con *NdeI* y *HindIII*.....42

Figura 13.

Análisis de la orientación de *afeR* mediante PCR en colonia.....43

Figura 14.

Sobreexpresión y purificación de la proteína AfeR en *E. coli*.....44

Figura 15.

Análisis de la especificidad de los anticuerpos contra AfeR.....45



IV. Lista de Abreviaturas

AI Autoinductor

AHL Acil-Homoserina Lactona

Acil-ACP Proteína transportadora de grupos acil.

Amp Ampicilina.

BSA Albumina bovina.

CAPS Ácido 3-(Ciclohexilamino)-1-propanosulfónico.

CAP Proteína receptora de cAMP.

Cp "Crossing point".

dXTP Deoxinucleótidos trifosfato.

DMSO Dimetil sulfóxido.

D.O. Densidad óptica.

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético.

EPS Exopolisacáridos.

IPTG Isopropil tio- β -D-galactósido.

LB Medio de cultivo Luria-Bertani.

LCFMS LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I.

ORF Marcos abierto de lectura.

Pb Pares de bases.

PVDF Fluoruro de polivinilideno.

QS Quorum Sensing

SAM S-Adenosilmetionina.

SDS Dodecil sulfato de sodio.

TAE Solución amortiguadora tris-acetato EDTA.

T_m Temperatura de hibridación.

1. Resumen.

El "Quorum Sensing" (QS) es un sistema de comunicación bacteriana que controla la expresión de ciertos genes en función del tamaño poblacional. Existen varios tipos de sistemas de QS. El sistema más generalizado en bacterias Gram negativa es el QS de tipo AI-1, en el cual están involucradas dos familias proteicas. Una es la familia R, compuesta por factores transcripcionales cuya actividad depende de acil-homoserina lactona (AHL) o autoinductor de tipo 1. La otra es la familia I, compuesta por sintasas de AHL. Las AHLs son moléculas orgánicas pequeñas que se acumulan en el medio a medida que la población bacteriana aumenta. Cuando se alcanza una concentración umbral de AHL, esta se une a los reguladores R, que regulan la transcripción de sus genes blancos. En nuestro laboratorio se analizó por métodos bioinformáticos la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y se descubrió dos marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para dos proteínas que presentan una similitud de 60 % y 64% con las proteínas BveI y BveR de *Burkholderia cepacia* que son miembros de las familias I/R del sistema QS de tipo AI-1. A estos ORFs los denominamos *afeI* y *afeR*. Estos antecedentes dieron indicios de la existencia de un sistema de QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*. Se decidió determinar si efectivamente este sistema se encontraba en *A. ferrooxidans* porque en otras bacterias Gram negativas el QS de tipo AI-1 está implicado en el desarrollo de la biopelícula que es muy importante en el proceso de lixiviación de minerales que realiza *A. ferrooxidans*. Para esto se realizó el análisis de extractos de sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans* para detectar si este microorganismo produce AHLs. También se hicieron estudios de RT-PCR para ver si los genes *afeI* y *afeR* se expresan. Adicionalmente para caracterizar el sistema se

llevaron a cabo estudios de la transcripción de *afeI* y *afeR* durante la curva de crecimiento bacteriano.

Se observó que *A. ferrooxidans* produce AHLs y que los genes *afeI* y *afeR* se transcriben. Estos hechos sugieren que existe un sistema de QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*.

Los estudios por PCR en tiempo real de la variación en la expresión del par génico *afeI/afeR* en función de las distintas fases del crecimiento bacteriano dieron como resultado que la expresión de *afeI* aumenta en la fase estacionaria temprana y estacionaria tardía del crecimiento con respecto a la fase exponencial media, mientras que la expresión de *afeR* no varía a lo largo de la curva de crecimiento.

2. Summary.

Quorum Sensing (QS) is a bacterial communication system where gene expression is under control of cell density. There are several types of QS systems. The most common system in Gram negative bacteria is the QS type AI-1. Two protein families are involved in this system: The R protein family composed of transcriptional regulators whose activity depends on the acyl-homoserine lactone (AHL) or autoinducer type 1 (AI-1) and the I protein family composed of proteins which produce AHLs. The rise of AHLs concentration is proportional to an increase in population. When the concentration of AHLs reaches the threshold, the AI interacts with its respective R regulator and the transcription of target genes is regulated. In our laboratory through bioinformatics methods, we discovered two open reading frames (ORFs) inside the genome sequence of *A. ferrooxidans* ATCC23270 encoding for two putative proteins which exhibit 60% and 64% similarity to BveI and BveR from *Burkholderia cepacia*. BveI and BveR are members of I/R protein families. These ORFs were called *afeI* and *afeR*. The results found suggest that *A. ferrooxidans* should have a QS type AI-1. As the QS type AI-1 regulates the biofilm formation in many Gram negative bacteria and biofilm is important for bioleaching process we decided study if the QS type AI-1 mediated by *afeI* and *afeR* is present in *A. ferrooxidans*. We analyzed supernatant extracts of *A. ferrooxidans* cultures through reverse phase liquid chromatography fit with mass spectrometry to check if *A. ferrooxidans* produce AHLs. Moreover the expression of *afeI* and *afeR* was investigated through RT-PCR. The results shows that *A. ferrooxidans* produce AHLs and the genes *afeI* and *afeR* are transcribed in *A. ferrooxidans*. These results reveal that *A. ferrooxidans* should have a QS type AI-1.

In addition Real Time PCR experiments revealed that the transcriptional level of *afeI* increased in early and late stationary phases with respect to middle exponential phase while the expression of *afeR* appeared invariable in all growth phases.

3. Introducción.

3.1. Quorum Sensing.

Las bacterias se comunican unas con otras mediante señales químicas que permiten sincronizar actividades de grupo. El "Quorum Sensing" (QS) es un tipo de comunicación bacteriana en que se producen y liberan pequeñas moléculas llamadas autoinductores (AI) que se acumulan en el medio incrementándose su concentración a medida que la población crece. Cuando se alcanza una concentración umbral de AI, las células detectan estas moléculas y regulan la expresión genética en función de la densidad poblacional (Miller y Bassler, 2001).

En el QS de bacterias Gram positiva las moléculas que actúan como autoinductores son pequeños péptidos modificados que se exportan vía transportadores ABC. Para regular la expresión genética estos péptidos se unen a una proteína kinasa sensora activándola. Esta proteína kinasa pertenece a un sistema de dos componentes por lo que transfiere la información sensorial activando a un regulador transcripcional (mediante fosforilación), que se encarga de regular la transcripción de los genes blanco (Miller y Bassler, 2001).

En bacterias Gram negativa la molécula autoinductora es una molécula del tipo acil-homoserina lactona (AHL). Esta molécula es detectada y su información es transferida a través de un sistema de dos componentes en un sistema de QS híbrido ó más frecuentemente, es detectada por un regulador transcripcional específico que reconoce a la AHL en el interior de la célula y controla la expresión génica, siendo este el sistema de QS de tipo AI-1 que esta presente en la mayor parte de las bacterias Gram negativa (Miller y Bassler, 2001; Waters y Bassler, 2005).

Además, existe otro tipo de sistema QS que se encuentra tanto en bacterias Gram positiva como en Gram negativa y está involucrado en la comunicación interespecífica. Este sistema se denomina QS de tipo AI-2, debido a que la molécula señal se designa como AI-2. Esta molécula es del tipo furanosil borato diéster. Fue originalmente identificada en *Vibrio harveyi* y su producción depende de LuxS, proteína que está ampliamente conservada en bacterias Gram positiva y Gram negativa (Chen y col., 2002).

3.2. Quorum Sensing de tipo AI-1.

El QS de tipo AI-1 se descubrió en la bacteria luminiscente marina *Vibrio fischeri*, que vive de forma planctónica y en asociación simbiótica con el calamar *Euprymna scolopes*, donde coloniza el órgano de luz y crece a expensas de los nutrientes proporcionados por el calamar. A cambio *V. fischeri* produce luz, que el calamar usa para protegerse de la depredación (Waters y Bassler, 2005).

La generación de luz depende de un regulón compuesto por el gen *luxR*, que codifica para el regulador transcripcional que detecta AI-1, y el operón *lux* que contiene al gen *luxI*, que codifica para la sintasa de AI-1, los genes *luxA* y *luxB* que codifican para las subunidades α y β de la luciferasa, y los genes *luxC*, *luxD* y *luxE*, que codifican polipéptidos involucrados en la síntesis del aldehído, sustrato de la luciferasa (Choi y Greenberg, 1991) (Fig. 1a).

En *V. fischeri* el operón *lux* está regulado por el QS de tipo AI-1 (Fuqua y col., 1994). En esta bacteria LuxI produce N-3-(oxo-hexanoil) homoserina lactona (3-oxo-C₆-AHL), que se acumula en el medio extracelular a medida que la población crece. Cuando alcanza una concentración umbral de 5 a 10 nM, el 3-oxo-C₆-AHL entra a la célula y se une a la

proteína LuxR, la cual se une a la región promotora del operón *lux* y activa la expresión de los genes *luxICDABE*.

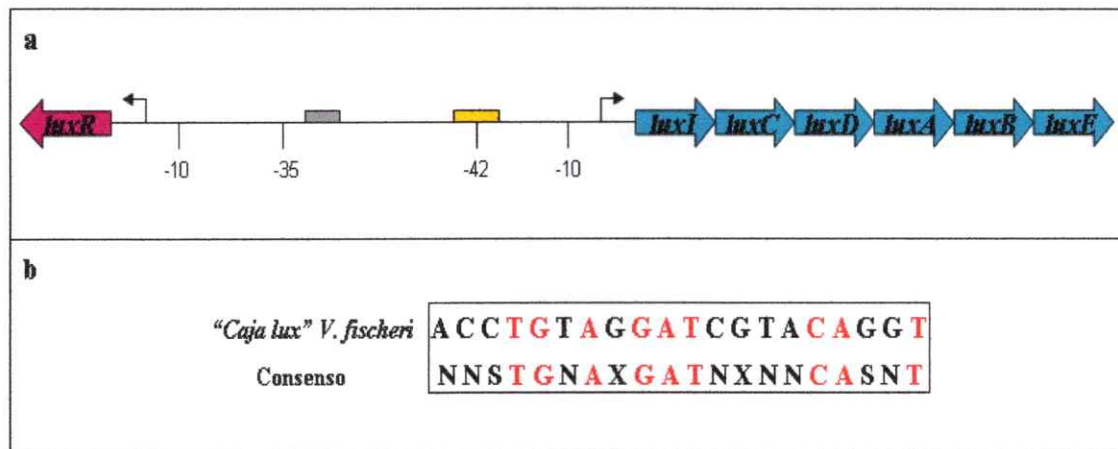


Figura 1. Organización genética y estructural del operón *lux*. a) Loci *lux*: Está formado por dos unidades que se transcriben divergentemente, el operón *lux* (flechas turquesas) y el gen *luxR* (flecha morada). En el espacio intergénico están presentes una “caja *lux*” (cuadro amarillo) río arriba del gen *luxI* y un sitio de unión para CAP (cuadro gris). b) Caja *lux*: La secuencia superior es la “caja *lux*” de *V. fischeri* y la secuencia inferior representa la secuencia consenso (Dunny y Winans, 1999). (Abreviaturas del consenso N = A, T, C o G. S = C o G. X = N o un gap en la secuencia).

El sistema QS de tipo AI-1 de *V. fischeri* conformado por el par LuxI/R es considerado el sistema canónico para este tipo de comunicación en bacterias Gram negativa. En los últimos años se ha identificado proteínas homólogas al par LuxI/R en más de 70 especies de bacterias Gram negativa (Henke y Bassler, 2004).

Las proteínas que sintetizan las AHLs están conservadas evolutivamente y conforman la familia I de sintasas de AI-1. Las proteínas que actúan como elementos de respuesta específica para estos AI-1 forman otro grupo conservado evolutivamente denominado familia R de reguladores transcripcionales. El par genético I/R está ligado física y funcionalmente, formando un cassette regulatorio que coevoluciona (Gray y Garey, 2001).

Entre las bacterias Gram negativa que tienen un sistema de QS tipo A-1 se incluyen las proteobacterias púrpuras fototrópicas, vibrios marinos, bacterias de la rizósfera y patógenos oportunistas de plantas y animales. En estos microorganismos el QS regula múltiples funciones tales como la síntesis de exoenzimas, conjugación, síntesis de exopolisacáridos (EPS), producción de antibióticos, luminiscencia y formación de biopelículas (Gray y Garey, 2001; Pirhonen y col., 1993; Fuqua y Winans, 1994; Marketon y col., 2003; Dunlap, 1999; McGowan y col., 2005; Davies y col., 1998).

3.2.1. Familia de Proteínas R.

La familia de proteínas R son miembros de la familia de reguladores transcripcionales UphA/FixJ, sin embargo, las proteínas R solo tienen similitud en el dominio de unión a DNA con los miembros de esta familia, por lo que forman una subfamilia aparte (Sitnikov y col., 1995).

Estructuralmente las proteínas R están compuestas por dos dominios funcionales. El dominio carboxilo terminal que contiene un motivo de unión a DNA y el dominio amino terminal que posee el sitio de unión para la AHL (Miller y Bassler, 2001).

El sitio en el DNA al que las proteínas R se unen es una secuencia que se caracteriza por ser palindrómica y corta, de longitud variable. El primer sitio descrito fue el sitio de unión de LuxR al promotor del operón *lux* en *V. fischeri*. Este sitio es una secuencia palindrómica de 20 pb denominada "caja *lux*". Producto del alineamiento de la secuencia de la "caja *lux*" con otras regiones promotoras de genes regulados por proteínas de la familia R se estableció una secuencia consenso para el sitio de unión de estas proteínas (Dunny y Winans, 1999) (Fig. 1b).

La mayor parte de las proteínas R descritas son activadores transcripcionales. La actividad de estas proteínas es dependiente de AI-1, ya que en ausencia de AI-1 la región amino terminal enmascara al dominio carboxilo terminal impidiendo que la proteína se una al DNA. Cuando la AHL se une a su sitio, la proteína cambia de conformación y es capaz de unirse al DNA y activar la transcripción (Miller y Bassler, 2001; Choi y Greenberg, 1991). Se han descrito algunos casos en que miembros de la familia R actúan como represores (Egland y Greenberg, 2000; Von Bodman y Farrand, 1995; Homg y col., 2002). En éste caso la dependencia de la actividad con respecto a la AHL no tiene un mecanismo conocido. Se cree que estas proteínas se unen al DNA en ausencia de AHL reprimiendo la expresión de los genes blanco y cuando el AI está presente estas proteínas se liberan del DNA permitiendo la expresión de los genes reprimidos (Homg y col, 2002; Von Bodman y col., 2003).

Existen evidencias genéticas de que los miembros de la familia R se encuentran como monómeros en ausencia de AHL y funcionan como dímeros cuando están unidos a la AHL (Zhao-Qing y col., 2000). Esto fue confirmado con los reportes de la estructura cristalina de TraR de *Agrobacterium tumefaciens* unido a su ligando el 3-oxo-C₈-AHL y a su sitio de unión en el DNA (Vannini y col., 2002; Zhang y col., 2002). Se observó que TraR es un dímero asimétrico, en el que cada monómero une una molécula de autoinductor (Fig. 2). El monómero de TraR está conformado por el dominio amino terminal de unión a ligando (aminoácidos 1 a 162) que consiste en sábanas β rodeadas de seis hélices α en donde el AI esta profundamente insertado entre las sábanas β y las tres hélices α superiores en una cavidad hidrofóbica, y el dominio carboxilo terminal de unión a DNA que tiene una estructura "hélice-vuelta-hélice" (HTH) (Vannini y col, 2002).

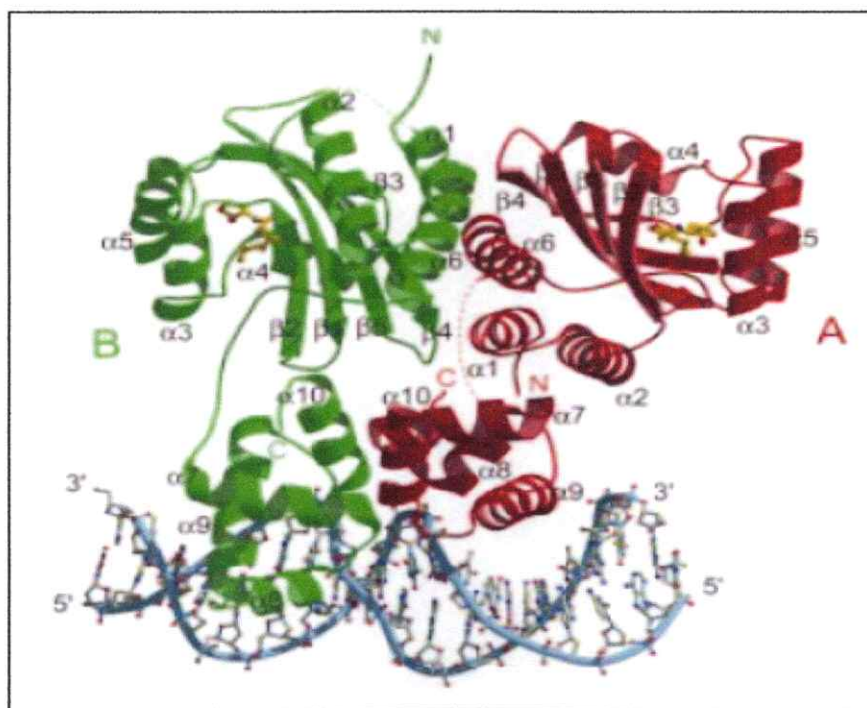


Figura 2. Diagrama del complejo ternario $[\text{TraR/AI}]_2\text{TraBox}$. TraR es un homodímero asimétrico siendo la subunidad B (verde) más alargada que la A (rojo). Cada monómero está compuesto por el dominio amino terminal que une AHL (amarillo) y el dominio carboxilo terminal que contiene el motivo HTH de unión a DNA (Vannini y col., 2002).

3.2.2. Familia de Proteínas I.

Los miembros de la familia I son responsables de la síntesis específica de las AHLs que actúan como AI en el QS de tipo AI-1. Pruebas bioquímicas y genéticas determinaron que los miembros de esta familia son monómeros y tienen una baja actividad catalítica (Dunny y Winans, 1999; Hanzelka y col., 1997).

En esta familia el grado de conservación es solo del 28 al 34%, sin embargo, existen residuos conservados a lo largo de toda la secuencia de estas proteínas. En el dominio amino terminal está el sitio activo que contiene 10 aminoácidos conservados. La mayor parte de estos aminoácidos son cargados y unos pocos son de naturaleza hidrofóbica. Mediante mutaciones puntuales se demostró además que la mayor parte de estos aminoácidos son esenciales para la actividad enzimática de estas proteínas. La región carboxilo terminal es más variable pero tiene algunos aminoácidos conservados y contiene el sitio de unión para la acil-ACP (Proteína transportadora de grupos acil) (Hanzelka y col., 1997).

La S-adenosilmetionina (SAM) y la acil-ACP son los sustratos de las proteínas I (Val y Cronan, 1998). El acil-ACP es un intermediario de la biosíntesis de ácidos grasos (Miller y Bassler, 2001) y SAM es un intermediario de la vía de síntesis de los aminoácidos metionina-lisina-treonina (Dunny y Winans, 1999). Las proteínas I acoplan un acil-ACP específico a SAM por medio de la formación de un enlace amida entre la cadena acil del acil-ACP y el grupo amino de la homocisteína del SAM, formando un intermediario acil-SAM que se lactoniza liberando metiltioadenosina y AHL (Miller y Bassler, 2001).

En base a la estructura de las proteínas I cristalizadas EsaI de *Pantoea stewartii ssp. stewartii* y LasI de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 3), se confirmó que estas proteínas son monómeros en solución y su estructura consiste en una plataforma de láminas β fuertemente comprimida que esta rodeada de hélices α las que forman un túnel hidrofóbico en el que se acomoda la cadena acil del acil-ACP para la síntesis de AHL (Gould y col., 2004; Watson y col., 2002).

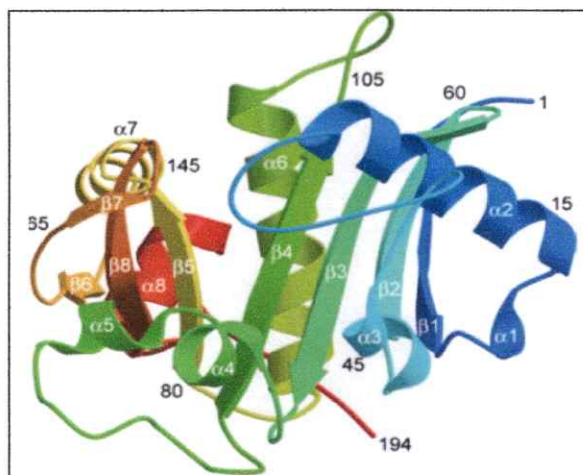


Figura 3. Estructura cristalina de LasI. La proteína LasI es un monómero cuya estructura consiste en una plataforma de láminas β rodeada de hélices α . La coloración del azul al rojo de las láminas β y hélices α indican la posición de los residuos dentro de la secuencia con respecto al amino y carboxilo terminal (Gould y col., 2004).

3.2.3. Autoinductor.

Las AHLs son moléculas pequeñas de carácter hidrofóbico formadas por un anillo lactónico unido a una cadena acil, cuya longitud varía entre 4 y 18 carbonos. La cadena acil puede tener alguna insaturación y estar o no sustituida en el carbono 3 por un grupo carbonilo o hidroxilo (Fig. 4) (Miller y Bassler, 2001). En un principio se creía que todos los tipos de AHLs se movían libremente a través de la membrana (Flavier y col., 1998). Sin embargo, actualmente se postula que las moléculas de AHLs de cadenas cortas como el C_4 -AHL se mueven mediante difusión por la membrana, mientras que las AHLs de cadena larga como 3-oxo- C_{12} -AHL entran a la célula por difusión y salen a través de un transportador de membrana, el MexAB-OprM (Yates y col., 2002; Pearson y col., 1999).

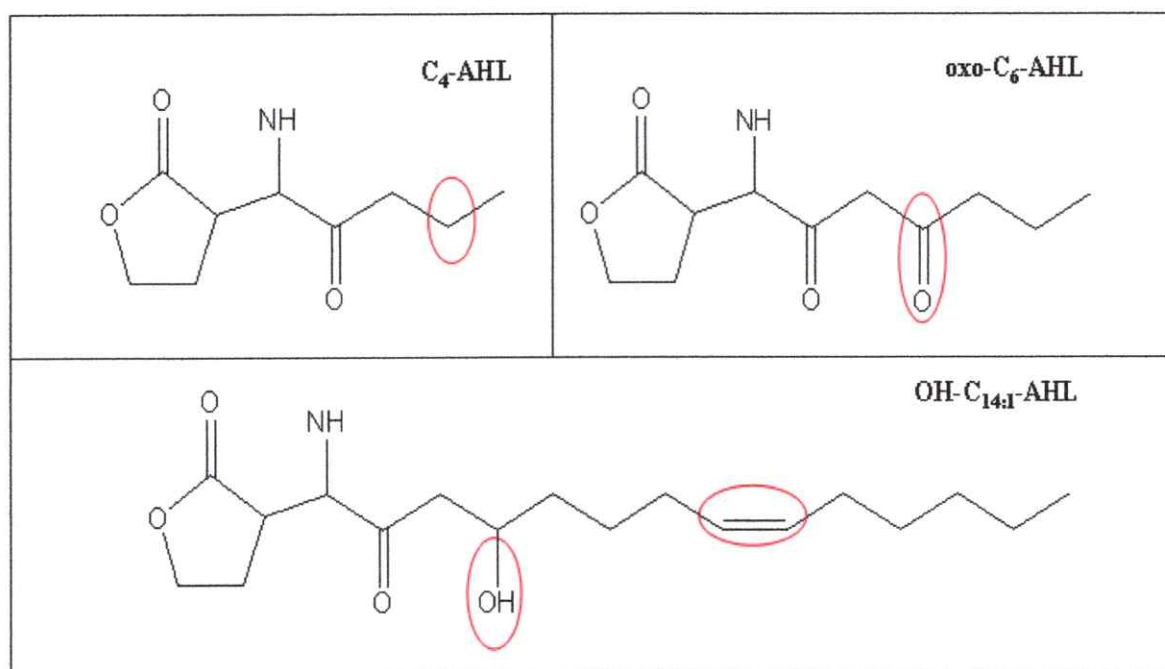


Figura 4. Ilustración de los distintos tipos de AHLs. Las cadenas acil unidas al anillo lactónico pueden tener distintos sustituyentes en el carbono tres y pueden ser insaturadas (círculos rojos) (Dunny y Winans, 1999).

3.2.4. Otras AHL sintasas.

Además de la familia de proteínas I existen otras dos familias de proteínas que sintetizan AI del tipo AHL. La familia de LuxM fue identificada en *Vibrio harveyi* y se ha identificado un homólogo en *V. fischeri*, AinS, que coexiste con LuxI y sintetiza la C₈-AHL en *V. fischeri* (Wilson y col., 1995).

El tercer tipo de AHL sintasa fue identificado en *Pseudomonas fluorescens*. En este microorganismo se encontró que la proteína HdtS es capaz de sintetizar más de un tipo de AHLs tales como: C₆-AHL, C₁₀-AHL y 3-hidroxi-C_{14:1}-AHL (Lave y col., 2000).

3.3. Regulación del sistema I/R.

3.3.1. Aspectos generales.

El sistema QS de tipo AI-1 es similar en todas las bacterias en que se ha descrito, sin embargo, las proteínas tipo I/R están casi siempre integradas en redes de regulación relacionadas con cambios de la expresión genética en respuesta a señales ambientales. Esta integración ocurre a través de la regulación de los genes de tipo I/R (Ledgham y col., 2003). Debido a esto la regulación de estos genes es distinta para cada especie bacteriana y esta relacionada con la red en que están insertos.

3.3.2. Regulación del sistema I/R en *Vibrio fischeri*.

La regulación del sistema QS en *V. fischeri* está ligada al control de la producción de la bioluminiscencia debido a que los genes *luxI* y *luxR* son parte del regulón *lux* (Fig. 1a). LuxR se une a su propio promotor activando su transcripción a bajos niveles de autoinductor, pero a altos niveles LuxR se autoreprime (Dunlap y Greenberg, 1988; Shadel y Baldwin, 1991). La autorepresión de *luxR* requiere además de un elemento de regulación negativa presente en el operón *luxICDABE* que es una secuencia corta parecida a la “caja *luxR*”. Este elemento y LuxR interactúan formando un loop, el cual causa la represión de *luxR* (Shadel y Baldwin, 1991). A alta concentración de AI-1 LuxR activa la transcripción de *luxI* iniciando así un circuito de control positivo (Ulitzur y Kuhn, 1988).

3.3.3. Regulación del sistema I/R en *Agrobacterium tumefaciens*.

Los genes I/R en *A. tumefaciens* se encuentran en el plasmido Ti. Hay dos clases de plasmido Ti, uno depende de octapina e induce *traR* vía el activador transcripcional OccR que responde a octapina, y el otro plasmido Ti es regulado por las agrocinopinas A y B que inducen la expresión de *traR* a través de la inactivación del represor transcripcional AccR (Miller y Bassler, 2001). TraR activa la transcripción de *traI* y *traR* creando un ciclo de retroalimentación positiva (Fuqua y col., 1994).

3.3.4. Regulación del sistema I/R en *Pseudomonas aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* existen dos sistemas de Quorum Sensing de tipo A-1. Es el sistema LasI/R y el sistema RhlI/R. Ambos sistemas están conectados y se activan de forma jerárquica, ya que LasR regula positivamente la expresión de *rhlR*. Por otra parte también se forma una retroalimentación positiva en el sistema debido a que LasR activa la expresión de *lasI* y RhlR induce la expresión de *rhlI* (Miller y Bassler, 2001).

3.4. *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

3.4.1. Características generales.

A. ferrooxidans fue el primer microorganismo descubierto capaz de oxidar minerales. Es una γ -proteobacteria Gram negativa, mesófila y acidófila. Su temperatura de crecimiento

está entre los 20 y 35 °C, y su pH óptimo entre 1,8 y 2,0. Es un quimiolitioautótrofo obligado, cuya fuente de electrones la constituyen el ión ferroso y una variedad de compuestos reducidos de azufre. Es un microorganismo preferentemente aeróbico, pero también es capaz de usar ión férrico como aceptor de electrones. Es capaz de fijar CO₂ y algunas cepas son capaces de fijar N₂ (Rawlings, 2002).

3.4.2. *A. ferrooxidans* y QS de tipo AI-1.

A. ferrooxidans es uno de los microorganismos presentes en los consorcios microbianos encontrados en procesos biohidrometalúrgicos por lo que es de gran importancia en biominería (Rawlings y Kusano, 1994). Este microorganismo se une a la superficie de minerales como la piritita mediante una capa de EPS. Esta capa forma una matriz donde eventualmente las células se dividen y forman una biopelícula (Rawlings, 2002). Esta matriz está impregnada de especies de Fe⁺³ acomplejados con ácido glucurónico y sirve de espacio de reacción en donde la alta concentración de ión férrico ataca químicamente al mineral en sus enlaces covalentes. En el proceso el ión Fe⁺³ es reducido a ión Fe⁺² que es oxidado nuevamente por la bacteria. También en este proceso ocurre una acidificación local que contribuye a la disolución del mineral (Kinzler y col., 2003).

A pesar de la importancia de *A. ferrooxidans* en biominería se desconocen muchos aspectos de su fisiología como su capacidad para formar biopelículas. Debido a que este estado es clave para la oxidación de minerales, es de sumo interés conocer los procesos que influyen en su formación y desarrollo. Se ha reportado para otras bacterias Gram negativa que el sistema QS de tipo AI-1 regula la producción de EPS y el desarrollo de biopelículas

(Davies y col., 1998; Von Bodman y Farrand, 1995) por lo que es relevante iniciar el estudio del QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*.

En nuestro laboratorio se analizó por métodos bioinformáticos el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y se descubrió dos marcos abiertos de lectura (ORFs) que codifican para dos proteínas probables que presentan una similitud de 60 % y 64% con las proteínas BveI y BveR de *Burkholderia cepacia* que son miembros de las familias I/R. A estos ORFs se los denominó *afeI* y *afeR* (Fig. 5).

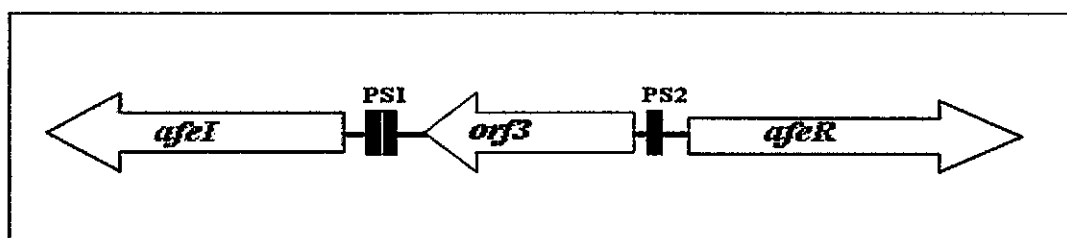


Figura 5. Locus genético del QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*. El locus está compuesto por el gen *afeR* que está en orientación divergente con respecto a los otros dos genes que conforman el locus, *afeI* y *orf3* (gen de función desconocida). Río arriba de *afeI* y de *afeR* existen dos secuencias palindrómicas (PS1 y PS2). PS1 está conformada por dos probables “cajas *afe*”.

En base a estos antecedentes que dan indicios de la existencia de un sistema QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*, se inició este trabajo de tesis con el fin de comprobar si efectivamente el sistema QS de tipo AI-1 está presente en éste microorganismo. Para esto se planteó estudiar la presencia de AHLs en sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans* y analizar la expresión del par génico *afeI/afeR* mediante RT-PCR. Una vez comprobada la existencia de un sistema de QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans* se planteó estudiar la variación de la expresión del par génico I/R en función de las distintas fases del crecimiento. Para llevar a cabo lo anterior nos propusimos cuantificar los niveles de mRNA de *afeI* y *afeR* mediante PCR en tiempo real y analizar la expresión de AfeR mediante western blot.

3.5. Hipótesis.

“En *A. ferrooxidans* existe un sistema de QS de tipo AI-1 mediado por el par génico *afeI/afeR*, cuya expresión cambia durante las distintas etapas del crecimiento”.

3.6. Objetivos,

3.6.1. Objetivo general.

Determinar la producción de moléculas del tipo AHLs por *A. ferrooxidans* y estudiar la expresión de los genes *afeI* y *afeR* durante las distintas etapas del crecimiento.

3.6.2. Objetivos específicos.

1. Aislar y caracterizar moléculas de AHLs desde sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans*.
2. Estudiar la expresión a nivel de mRNA de los genes *afeI* y *afeR*:
 - a) Mediante RT-PCR.
 - b) Cuantificando el mRNA durante el crecimiento bacteriano por PCR en tiempo real.
3. Estudiar la expresión de la proteína AfeR durante las distintas etapas del crecimiento bacteriano:
 - a) Producción de anticuerpos policlonales para AfeR.
 - b) Detección de AfeR por Western blot.

4. Materiales y métodos.

4.1. Cepas, medios y condiciones de cultivo.

Tanto para los experimentos de detección de AHL, como para los experimentos de expresión de los genes *afeI* y *afeR*, se utilizó la cepa ATCC 23270 de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Se creció este microorganismo a 30 °C con agitación en medio 9K modificado (pH 2,5), que contiene: 0,40 g/l de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,10 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,04 g/l de K₂HPO₄ x 3 H₂O y 50 g/l de perlas de azufre (Arredondo y col., 1994).

Para los experimentos de clonación y expresión de proteínas recombinantes se usaron las cepas de *Escherichia coli*: TOP10F', JM109, DH5α y BL21(DE3). Estas cepas se crecieron en medio LB, el cual fue suplementado con 100 mg/l de ampicilina (LB-amp) y 1 mM de IPTG cuando fue requerido. Para la preparación de placas con medio sólido, se adicionó agar a 1,5 % (p/v) al medio LB.

4.2. Monitoreo del crecimiento celular.

Para verificar la etapa de crecimiento en que se encontraba un cultivo se tomaron muestras de 4 µl de cada cultivo y se realizó el conteo de células presentes en 80 cuadros chicos (Cc) de la cámara de conteo Petroff-Hausser, mediante el microscopio óptico OLYMPUS BX50.

La concentración del cultivo se determinó con la siguiente formula:

$$\text{Concentración} = \frac{A}{C_c \times V_c} = \text{células/ml}$$

A = número total de células contadas. C_C = número total de cuadros chicos contados.

$V_C = 5 \times 10^{-8}$ ml, volumen de un cuadro chico.

4.3. Extracción de AHLs desde el medio de cultivo de *A. ferrooxidans*.

Se tomó parte del sobrenadante de cultivos de *A. ferrooxidans* en distintas etapas del crecimiento y se extrajeron y caracterizaron las AHLs como lo describió Morin y col. (2003). Después de remover por centrifugación las células, se hizo una extracción orgánica en el sobrenadante con diclorometano. Se eliminó el exceso de agua de los extractos de diclorometano con sulfato anhídrido de magnesio. Estos extractos fueron filtrados y luego secados en un rotavapor. Los residuos fueron disueltos en 1 ml de acetato de etilo y se analizaron mediante cromatografía líquida de fase reversa acoplada a un espectro de masas en el Laboratorio de Biología y Química Marina de la Universidad de Bretaña en Francia.

4.4. Técnicas de Biología Molecular.

4.4.1. Extracción de DNA genómico.

Para obtener DNA genómico de *A. ferrooxidans* se centrifugaron a 15.000 x g por 5 min a 4 °C 40 ml de un cultivo crecido en azufre. Se lavo el precipitado una vez con agua ácida y con una solución de citrato de sodio 10 mM pH 7,0. Para extraer el DNA cromosómico, se usó el kit "Wizard para purificación de DNA genómico" de Promega[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante para bacterias Gram negativa.

4.4.2. Extracción de DNA plasmidial.

A partir de cultivos de 5 ml crecidos toda la noche de *E. coli* DH5 α que contienen el plasmidio pET $afeR$, se aisló DNA plasmidial con el kit “sistema de purificación de DNA Wizard Plus Minipreps” de Promega[®]. Cuando se requirió una mayor cantidad de plasmidio, cultivos de 50 ml de *E. coli* TOP10F’ pCRT7/NT-TOPO- $afeR$ y JM109 pET fueron usados para extraer DNA plasmidial con el kit “sistema de purificación de DNA Wizard Plus Midipreps” de Promega[®].

4.4.3 Chequeo y cuantificación de Ácidos Nucleicos.

Los ácidos nucleicos extraídos se cuantificaron midiendo su absorbancia a 260 nm y se determinó su pureza midiendo la relación entre su absorbancia a 260 y 280 nm.

Se chequeó los ácidos nucleicos corriendo geles de agarosa-TAE al 1% p/v. Estos fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador con luz UV.

4.4.4. Digestión de DNA con enzimas de restricción y purificación de los fragmentos digeridos.

Se digirió 10 μ g de pCRT7/NT-TOPO- $afeR$ con 70 U de *Nde*I y 90 U de *Hind*III, y 5 μ g de pET con 60 U de *Nde*I y 80 U de *Hind*III. La digestión se llevó a cabo por 2 h a 37 °C. Las enzimas se inactivaron mediante calor incubándolas 20 min a 65 °C.

Se purificó el pET digerido y el fragmento correspondiente al gen *afeR*, resolviendo la totalidad de la reacción de digestión en un gel de agarosa. Desde éste se aislaron los fragmentos de DNA de interés con el “kit Wizard SV Gel PCR Clean-up System” de Promega[®], siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.4.5. Ligación.

El vector pET y el gen *afeR* digeridos con las enzimas *NdeI* y *HindIII* fueron ligados. La reacción se realizó toda la noche a 4 °C, con 4,5 U de T4 DNA ligasa de Promega[®]. La relación vector:inserto fue 1:8.

4.4.6. Transformación.

A 200 µl de células competentes se agregó la reacción de ligación, se incubó 30 min en hielo, se dio un choque térmico a 42 °C por 30 s, se agregó 250 µl de medio LB y se incubó por 60 min a 37 °C con agitación. Se sembró 150 µl del cultivo transformado en una placa LB-amp que se incubó toda la noche a 37 °C.

4.4.7. PCR en colonia.

Se determinó la orientación del inserto *afeR* en los clones recombinantes mediante PCR en colonia (Campbell y Choy, 2001). Se picaron colonias recombinantes al azar y se resuspendieron en 50 µl de agua. Se tomó 1 µl de la resuspensión bacteriana y se agregó la

mezcla compuesta por: 0,1 µl de LuxRAFCOOH (tabla 1) a 100 ng/µl, 0,1 µl del partidior T7 forward a 100 ng/µl, 0,8 µl de dXTP 1 mM, 0,5 µl de DMSO 100%, 2 µl de buffer 5X (250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 0,5 % Triton X-100 y 12,5 mM MgCl₂), 5,5 µl de H₂O y 0,4 U de Taq polimerasa (Promega®). El volumen final de reacción para cada tubo fue de 10 µl. A cada tubo se adicionó 1 gota de aceite de silicona Gibco-BRL®.

El programa de la reacción de PCR fue: 3 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C, y para finalizar 3 min a 72 °C.

Tabla 1. Partidores usados en la clonación de *afeR*, análisis de RT-PCR y cuantificación de los niveles de mRNA de *afeI* y *afeR*.

Partidor	Secuencia	Ubicación (pb)
LuxRAFCOOH	5'-cgatcacgacagcaacccgagca-3'	616-638
LuxIAFCOOH	5'-cggttagtcagatctatccagc-3'	543-565
LuxRAFNH2NdeI	5'-catatggcggtccgaaatggcgcggt-3'	-2-21
LuxIAFNH2NdeI	5'-catatgcaggttataaccgggcca-3'	-2-21
AfeR-RT1	5'-aggtaaacatgcccgcattc-3'	300-319
AfeI-RT1	5'-gcaaagcgcgacagttccca-3'	302-321
afeRp1r1for	5'-ccgatgaactgtttgc-3'	213-228
afeRp1r1rev	5'-agataactgtacggcgca-3'	446-463
afelP1r1for	5'-ccgaataatctgtatgcg-3'	34-51
afelP1r1rev	5'-ccagtcggttgagtaa-3'	263-278
afe16S esp for	5'-tggtgectagcgtactgagtgt-3'	784-805
afe16S esp rev	5'-ccgaagggcacttccgca-3'	976-993

4.4.8. Secuenciación.

Se secuenciaron ambas hebras del plasmidio pET*afeR* de los clones recombinantes, utilizando los partidores T7 forward y T7 terminador en el centro de Biotecnología de la Universidad de Chile.

4.5. Purificación de AfeR y generación de anticuerpos.

4.5.1. Inducción de la expresión de *afeR*.

Se tomaron 200 ml de un cultivo crecido toda la noche de la cepa recombinante de *E. coli* BL21(DE3)(pET*afeR*) y se reinocularon en 1800 ml de medio LB. Se incubó a 37 °C con agitación hasta una D.O. de 0,6 a 600 nm y se indujo la producción de AfeR con IPTG 1mM, durante 6 h.

4.5.2. Purificación de cuerpos de inclusión.

Se cosecharon las células por centrifugación a 5.500 x g por 15 min a 4 °C. El precipitado se resuspendió en 30 ml de "binding buffer" 1X (5 mM imidazol, 0,5 M de NaCl y 20 mM Tris-HCl pH 7,9). La suspensión bacteriana obtenida fue digerida con 24 µg de lizosima por 30 min a 30 °C, luego de lo cual se trató el extracto con ultrasonido 15 veces a una potencia de 10 W por 30 s. Este extracto se centrifugó 40 min a 27.000 x g a 4 °C. El precipitado fue resuspendido en 30 ml de "binding buffer" 1X y fue centrifugado 15 min a

20.000 x g a 4°C. El precipitado obtenido se resuspendió en 5 ml de “binding buffer” 1X 6 M urea y se incubó en hielo por 1 h para solubilizar los cuerpos de inclusión. El extracto obtenido finalmente, se centrifugó a 39.000 x g por 20 min a 4 °C y se guardó el sobrenadante a -20 °C, que contiene el extracto proteico con AfeR recombinante.

4.5.3. Purificación de AfeR por electroelusión.

Se hicieron 4 geles (15x15 cm²) en gradiente de acrilamida del 7% al 20%. En cada pocillo se cargaron 70 µl de extracto proteico. Se corrieron los geles a 40 V toda la noche. Se cortaron los dos carriles extremos de cada gel y se tiñeron con azul de Coomassie. En todos los geles, un carril contenían el estándar de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder de Invitrogen® y el otro contenían el extracto proteico con AfeR. Se alineó el resto de los geles con estos carriles teñidos y por comparación con el estándar de peso molecular y el carril con AfeR recombinante se cortaron bandas de los geles a la altura de la migración de AfeR. Las bandas cortadas se desmenuzaron y se cargaron en la cámara de electroelusión Electro-Eluter modelo 422 de BIORAD®. Se electroeluyó AfeR en buffer volátil (NH₄HCO₃ 3,95 g/l, SDS 1 g/l) por 6 h a 60 mA según las recomendaciones del fabricante, para finalmente obtener la proteína AfeR.

4.5.4. Cuantificación de AfeR.

AfeR se cuantificó con el kit “Coomassie (Bradford) Protein Assay” de PIERCE®.

4.5.5. Secuenciación de AfeR recombinante.

Para ver si la proteína purificada corresponde a AfeR, se envió a secuenciar el extremo amino terminal de la proteína, para esto se remitieron 0,11 mg de AfeR liofilizado al Laboratorio de Microsecuenciación de Proteínas del Instituto Pasteur en Francia.

4.5.6. Generación de anticuerpos policlonales para AfeR.

Se enviaron 3,3 mg de AfeR al Laboratorio PickCell en Holanda. Esta proteína fue inyectada en conejo para generar suero con anticuerpos policlonales contra AfeR.

4.5.7. Limpieza del suero policlonal de conejo.

El suero con los anticuerpos policlonales anti-AfeR se limpió con un extracto proteico de *E. coli* para remover anticuerpos que pudiesen dar una reacción cruzada contra proteínas bacterianas. Para esto se tomó 300 ml de un cultivo de *E. coli* DH5 α y se centrifugó a 5.500 x g a 4 °C por 15 min. El precipitado se resuspendió en 30 ml de buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 y EDTA 10 mM). La resuspensión se pasó dos veces por la prensa French. El extracto obtenido se centrifugó a 12.000 x g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante se mezcló a una razón de 1:2 con una dilución del suero de 1:10. Se incubó la preparación a temperatura ambiente por 16 h, se agregó NaN₃ al 0,05 % (p/v) y se guardó a 4 °C hasta su utilización.

4.6. Detección de AfeR mediante Western blot.

Se realizaron dos geles de acrilamida al 12,5 % (SDS-page) con muestras de *E. coli* pCRT7/NT-TOPO*afeR*, *A. ferrooxidans* y AfeR puro a 1,1 mg/ml. Uno se tiñó con azul de Coomassie y el otro se usó para transferir las proteínas a una membrana. Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF en buffer de electrotransferencia (CAPS 10 mM pH 11, metanol 10 % v/v) a una corriente constante de 0,9 mA, en dos pasos de 30 min cada uno. La membrana fue incubada para bloquearla por 1 h en TBS-Tween-BSA (TBS 10X: NaCl 80 g/l, KCl 2 g/l, Tris-HCl 30 g/l pH 8,0, Tween 20 10% v/v y BSA 1% p/v). Luego se la incubó toda la noche con suero policlonal anti-AfeR a una dilución de 1:5. Se lavó la membrana tres veces por 15 min con TBS-Tween, y se incubó por 1 h con anti IgG de conejo acoplado a la peroxidasa (Amersham®) a una dilución de 1:10.000. Se lavó nuevamente la membrana tres veces con TBS-Tween. Se incubó la membrana en oscuridad por 15 min en una solución de revelado: TBS 1X, 35 % v/v de H₂O₂ y 4-cloro-1-naphtol diluido en metanol a una concentración de 100 mg/ml.

4.7. Análisis de los genes *afeI* y *afeR* por RT-PCR y PCR en tiempo real.

4.7.1. Extracción de RNA.

Se tomó 600 ml de cultivo de *A. ferrooxidans* en la fase exponencial media, estacionaria temprana y estacionaria tardía. Se centrifugó a 5.500 x g por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se lavaron las células una vez con agua ácida a pH 2,0 y una vez con citrato

de sodio 10 mM a pH 7,0. Se tomaron entre 5 y 15 mg de células precipitadas y se resuspendieron en 500 μ l de medio fresco 9K modificado y se agregó 1 ml de RNAProtectTM Bacteria Reagent de QIAGEN[®] se agitó por vortex y se dejó incubando a temperatura ambiente 5 min. Se centrifugó a 13.800 x g por 4 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA pH 8,0), se agregó 6 μ l de lisozima 50 mg/ml y se dejó incubando por 10 min a temperatura ambiente. Se tomó la reacción de digestión con lisozima y se procedió a extraer el RNA con el RNeasy[®] Mini Kit de QUIAGEN[®] siguiendo las recomendaciones del fabricante.

4.7.2. Síntesis de cDNA.

Se tomo 1,7 μ g de RNA total y se digirió con 8,15 U de DNasa I por μ g de RNA total en presencia de 5 mM MgCl₂, en un volumen final de 20 μ l. La digestión se llevo a cabo por 1 h a 37 °C, seguido de una incubación a 65 °C por 10 min para inactivar la DNasa I. Se repartió la reacción de digestión con DNasa I en dos tubos con 10 μ l cada uno. Se uso uno para realizar la reacción de transcripción inversa (+) y otro para control sin transcriptasa inversa (-), para detectar contaminación con DNA genómico. Se agregó 4 μ l de partidor inverso a 100 ng/ μ l. Se incubó a 70 °C por 5 min y luego a 4 °C por 2 min. Después de centrifugar se agregó 5 μ l de dXTP 1mM y 5 μ l de buffer 5X de la transcriptasa inversa M-MLV. Al tubo (+) se le agregó 1 μ l de M-MLV 200 U/ μ l y al tubo (-) se agregó 1 μ l de agua. Se incubó a 42 °C por 1 h, seguido de 65 °C por 10 min para inactivar la transcriptasa inversa.

El partidador inverso para *afeI* es LuxIAFCOOH (tabla 1), para *afeR* es LuxRAFCOOH (tabla 1) y para el gen del rRNA de 16S es afe16Sesp reverse (tabla 1).

4.7.3. PCR.

La amplificación por PCR de *afeR* se realizó con los partidores LuxRAFNH2NdeI y AfeR-RT1 (tabla 1) y la de *afeI* se realizó con de los partidores LuxIAFNH2NdeI y LuxIAFCOOH (tabla 1). La mezcla para la reacción de PCR contenía: 250 ng de cada partidador, 4 µl de dXTP 1mM, 5 µl de cDNA (*afeR* ó *afeI*), DMSO al 5% y 1 U de Taq polimerasa en un volumen final de 50 µl. Durante el PCR se realizó una denaturación inicial de 3 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C, y finalmente una extensión final de 3 min a 72 °C.

4.7.4. PCR en tiempo real.

4.7.4.1. Fundamentos teóricos.

El PCR en tiempo real permite seguir el progreso de la reacción de PCR cuando ésta ocurre. Se caracteriza por detectar la amplificación de la secuencia blanco durante el término de cada ciclo, a diferencia del PCR convencional donde se detecta el monto total de amplicón después de un determinado número de ciclos (Bustin, 2000).

La detección de los productos de PCR se realiza mediante fluoróforos. El método más simple utiliza el fluoróforo SYBR Green, que al unirse al DNA de doble hebra emite

fluorescencia cuando es estimulado. Esta fluorescencia aumenta durante la fase de elongación del PCR debido al incremento de la cantidad de SYBR Green unido al DNA de doble hebra (Fig. 6). Cuando este aumento de fluorescencia se monitorea en el tiempo, al final del paso de amplificación de cada ciclo, se observa un aumento de la señal de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto amplificado por PCR (Bustin, 2000).

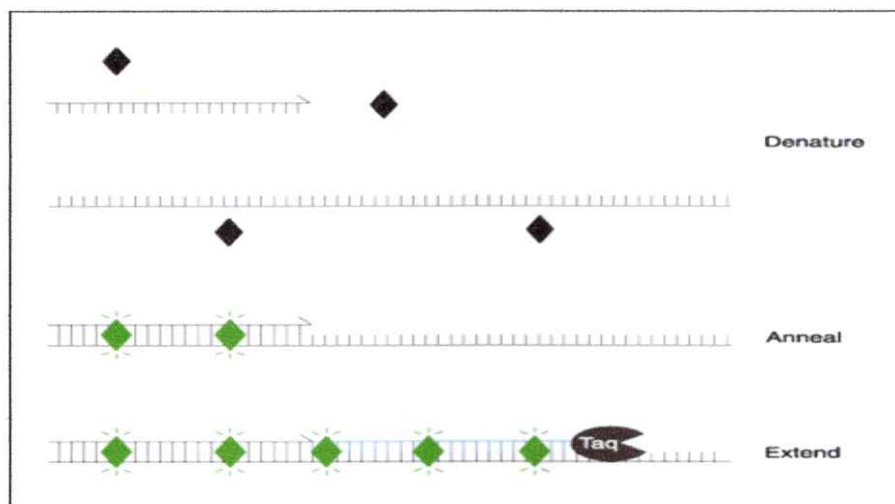


Figura 6. Principios del uso del SYBR Green. En solución, el fluoróforo no emite fluorescencia (rombos negros), sin embargo, al unirse al DNA de doble hebra y ser estimulado, emite una cantidad de fluorescencia (rombos verdes) que es proporcional a la cantidad de DNA de doble hebra sintetizado por la Taq polimerasa.

En los últimos años se ha incrementado el uso del PCR en tiempo real para la cuantificación de los niveles de mRNAs. El LightCycler de Roche[®] o sistemas similares, son capaces de detectar mRNA que estén en muy bajo número de copias. Esto se debe principalmente a la sensibilidad de la técnica. Existen varios métodos para cuantificar mRNA por PCR en tiempo real. El usado más frecuentemente cuantifica el mRNA

indirectamente al medir la cantidad de moléculas de cDNA producto de la transcripción inversa. La cuantificación del cDNA se realiza determinando el "Crossing point" (Cp) de la muestra por PCR en tiempo real. El Cp es el ciclo en que la fluorescencia aumenta por sobre el ruido, marcando el inicio de la fase logarítmica de amplificación del PCR. Como el Cp es directamente proporcional a la cantidad inicial de templado, se puede saber el número de copias iniciales de cDNA en la muestra, si se interpola el Cp obtenido en una curva de calibración (Cp/log Concentración inicial) hecha a partir de cantidades conocidas del templado (Rutledge y Côte., 2003).

4.7.4.2. Curva de calibración.

Se construyó una curva de calibración para *afeI* y *afeR* con DNA genómico de *A. ferrooxidans* a partir de una solución a 100 ng/ μ l. Se realizaron siete diluciones, diluyendo 1:10 cada vez, teniendo la solución más concentrada 10 ng/ μ l. De cada dilución se tomó 2 μ l para la reacción de PCR en tiempo real. El primer punto de la curva fue hecho con 20 ng de gDNA. Para este caso si se toma en cuenta que el peso molecular del genoma de *A. ferrooxidans* es $1,97 \times 10^9$ g/mol y que un genoma pesa $3,27 \times 10^{-15}$ g, 20 ng de DNA genómico corresponden a $6,12 \times 10^7$ genomas en el primer punto de la curva y $6,12 \times 10^6$ genomas en el siguiente punto y así sucesivamente. Como *A. ferrooxidans* posee sólo una copia de *afeI* y *afeR* la cantidad de genomas equivale al número de copias de cada gen presente en la dilución.

La reacción de PCR en tiempo real para la curva de calibración de *afeI* y *afeR* se realizó con los partidores *afeI*p1r1for/*afeI*p1r1rev y *afeR*p1r1for/*afeR*p1r1rev, respectivamente

(tabla 1). Se usó una concentración de partidores de 0,4 μM en presencia de 5 mM MgCl_2 y 1,0 a 1,5 μl de LCFMS (contiene el SYBR Green, la Taq polimerasa y los dXTP) por 50 ciclos, en un volumen final de 20 μl . Cada ciclo de la reacción de PCR en tiempo real se hizo a 95 °C por 10 s, 61 °C (*afeI*) ó 63 °C (*afeR*) por 5 s y 72 °C por 10 s.

4.7.4.3. Cuantificación de mRNA.

El cDNA de *afeI* y *afeR* obtenido de la transcripción inversa fue cuantificado de forma relativa por PCR en tiempo real, usando el termociclador LightCycler y el kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I de Roche[®], con estándares externos como esta descrito en la nota técnica de Biología Molecular no. LC 10/2000 de Roche[®]. El RNA de 16S se uso como control endógeno.

La reacción de PCR en tiempo real para *afeI* y *afeR* se llevó a cabo bajo las mismas condiciones y con los mismos partidores utilizados para hacer las curvas de calibración para cada gen, pero en este caso se realizaron sólo 45 ciclos. Como molde se usó 10 μl de cDNA diluido 1:20 de la reacción de transcripción inversa con y sin M-MLV. Para el caso del gen del rRNA de 16S la reacción de PCR en tiempo real se hizo con los partidores *afe16S* esp for y *afe16S* esp rev (tabla 1) a 0,4 μM y a una T_m de 66 °C, en presencia de 5 mM MgCl_2 y 1,5 μl de LCFMS por 45 ciclos en un volumen final de 20 μl . Como molde se usó 10 μl de cDNA diluido 1:200 de la reacción de transcripción inversa con y sin M-MLV. Para normalizar el número de copias de los genes *afeI* y *afeR* en cada una de las fases del crecimiento con respecto a la cantidad de rRNA de 16S, se dividió el número de copias de estos genes por 1 si la cantidad de rRNA de 16S en ese punto era menor que la cantidad de

rRNA de 16S en las otras fases del crecimiento y por un factor (correspondiente al número de veces en que es mayor el rRNA de 16S en una fase de crecimiento con respecto a la otra) si la cantidad de rRNA de 16S en ese punto es mayor que en la otra fase.

5. Resultados.

5.1. Caracterización de las AHLs producidas por *A. ferrooxidans*.

Para saber si el QS de tipo AI-1 de *A. ferrooxidans* existe, se analizó el sobrenadante de un cultivo de éste crecido en azufre para detectar la presencia de moléculas del tipo AHLs. Se encontró que *A. ferrooxidans* produce dentro del orden pM principalmente C₁₂-AHL y C₁₄-AHL y trazas de 3-oxo-C₁₂-AHL, 3-hidroxi-C₁₀-AHL, 3-hidroxi-C₁₂-AHL, 3-hidroxi-C₁₄-AHL y 3-hidroxi-C₁₆-AHL. Para ver si la producción de AHLs esta relacionada con la densidad poblacional se cuantificó la cantidad de C₁₂-AHL y C₁₄-AHL producida durante las fases exponencial y estacionaria. Se observó que C₁₂-AHL y C₁₄-AHL aumentaron en la fase estacionaria en relación a la fase exponencial (Fig. 7).

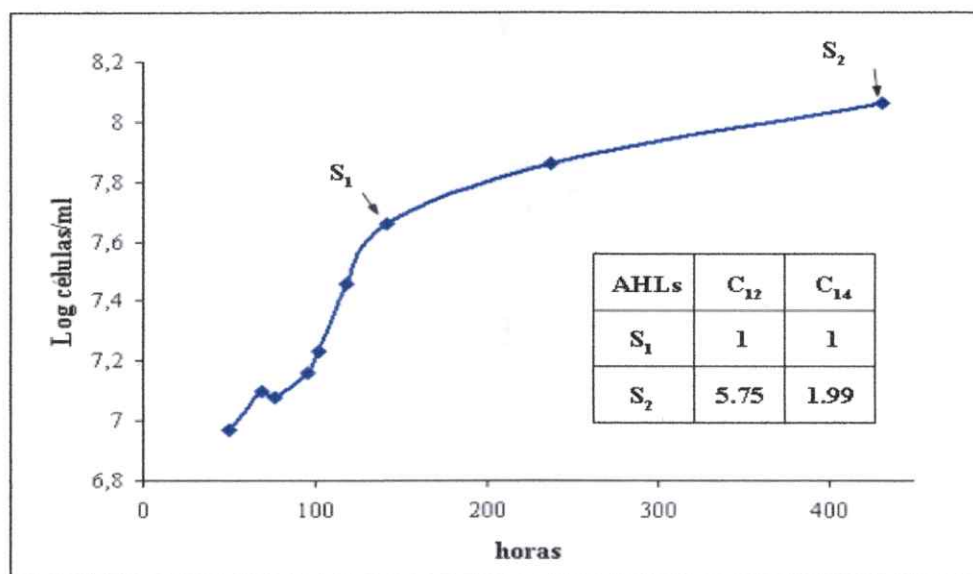


Figura 7. Producción de AHLs por *A. ferrooxidans* crecido en azufre durante la curva de crecimiento. Las AHLs fueron extraídas a partir del sobrenadante de un cultivo de *A. ferrooxidans* en las fases exponencial (S₁) y estacionaria (S₂). La cantidad relativa de AHLs producida en cada fase se muestra en la tabla.

El hecho de que *A. ferrooxidans* produzca AHLs es una evidencia de la existencia del QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*.

5.2. Estudio de la expresión del par génico *afeI/R* mediante RT-PCR.

Para confirmar que el QS de tipo AI-1 existe en *A. ferrooxidans* se realizaron ensayos de RT-PCR para los genes *afeI* y *afeR*. Se comprobó que estos genes se expresan en éste microorganismo (Fig. 8).

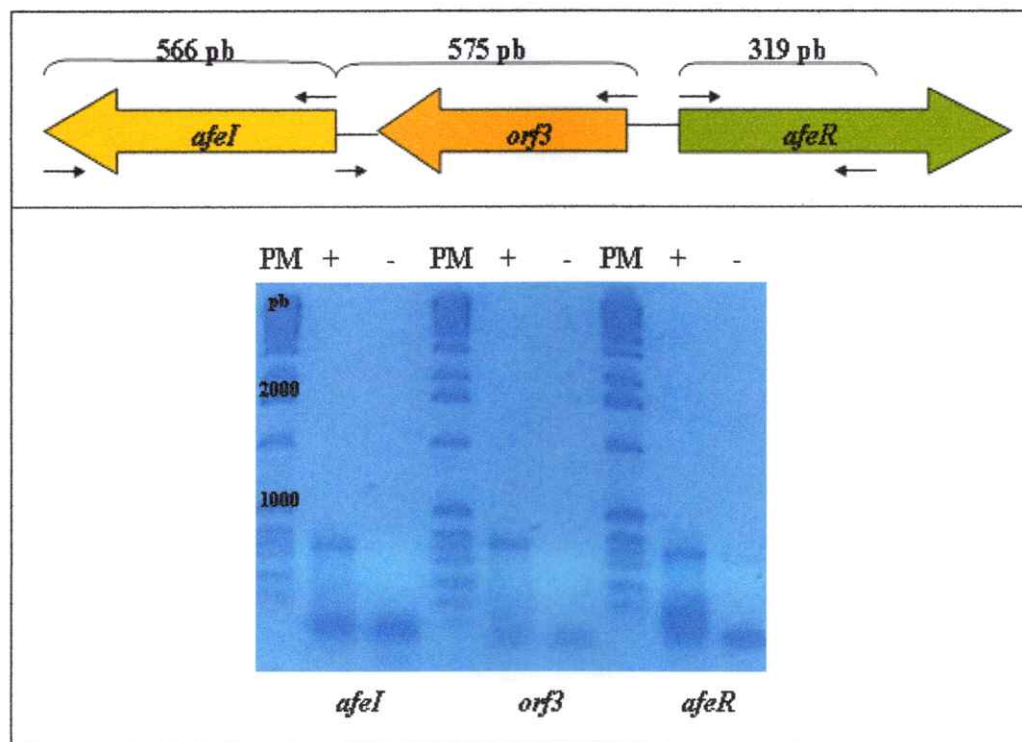


Figura 8. Estudio de la transcripción los genes *afeI*, *orf3* y *afeR* en *A. ferrooxidans*. Se determinó la transcripción de *afeI*, *orf3* y *afeR* mediante RT-PCR en ausencia (-) y en presencia (+) de transcriptasa reversa. El cDNA para *afeI* y *afeR* fue sintetizado con los partidores LuxIAFCOOH y LuxRAFCOOH respectivamente. La amplificación para *afeI* fue hecha con los partidores LuxIAFNH2NdeI/LuxIAFCOOH y LuxRAFNH2NdeI/AfeR-RT1. PM. MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas®).

En el gel se apreciaba además de los amplicones específicos de *afeI*, *orf3* y *afeR* unas bandas inespecíficas en el inferior, éstas pueden ser productos inespecíficos o los partidores no usados en el PCR.

En un experimento independiente de RT-PCR se observó que el *orf3* no se expresa en un mismo operón con *afeI*.

5.3. Cuantificación del mRNA de *afeI* y *afeR* durante la curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* mediante PCR en tiempo real.

Una vez obtenidas las evidencias de que en *A. ferrooxidans* existe un sistema de QS de tipo AI-1, se prosiguió a caracterizar el sistema midiendo la cantidad de mRNA de *afeI* y *afeR* en las fases exponencial media, estacionaria temprana y estacionaria tardía. Previo a esto se debió estandarizar la técnica del PCR en tiempo real para la cuantificación de mRNA, ya que no se había usado previamente esta técnica en el laboratorio.

5.3.1. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para *afeI* y *afeR*.

Se procedió a estandarizar las condiciones para amplificar por PCR en tiempo real los genes *afeI* y *afeR*. Se realizaron varios ensayos para determinar el número de ciclos, el tiempo de elongación y la temperatura de hibridación óptima (T_m) para la amplificación de estos genes. Se estableció para ambos genes condiciones similares en cuanto a tiempo de elongación (5 s) y número de ciclos de amplificación (45 ciclos). En cuanto a la T_m se estableció para *afeR* una temperatura óptima de 63 °C y para *afeI* fue de 61 °C. En la figura 9 se aprecia la reacción de PCR en tiempo real óptima para ambos genes y el pico que

denota la temperatura de denaturación característica para ambos amplificados, que es 91 °C para *afeI* y 92 °C para *afeR*. El hecho de que la temperatura de denaturación para ambos amplificados de los genes *afeI* y *afeR* sea tan alta se explica por el alto contenido de GC que presentan estos genes, siendo 58 % para *afeI* y 60,3 % para *afeR*.

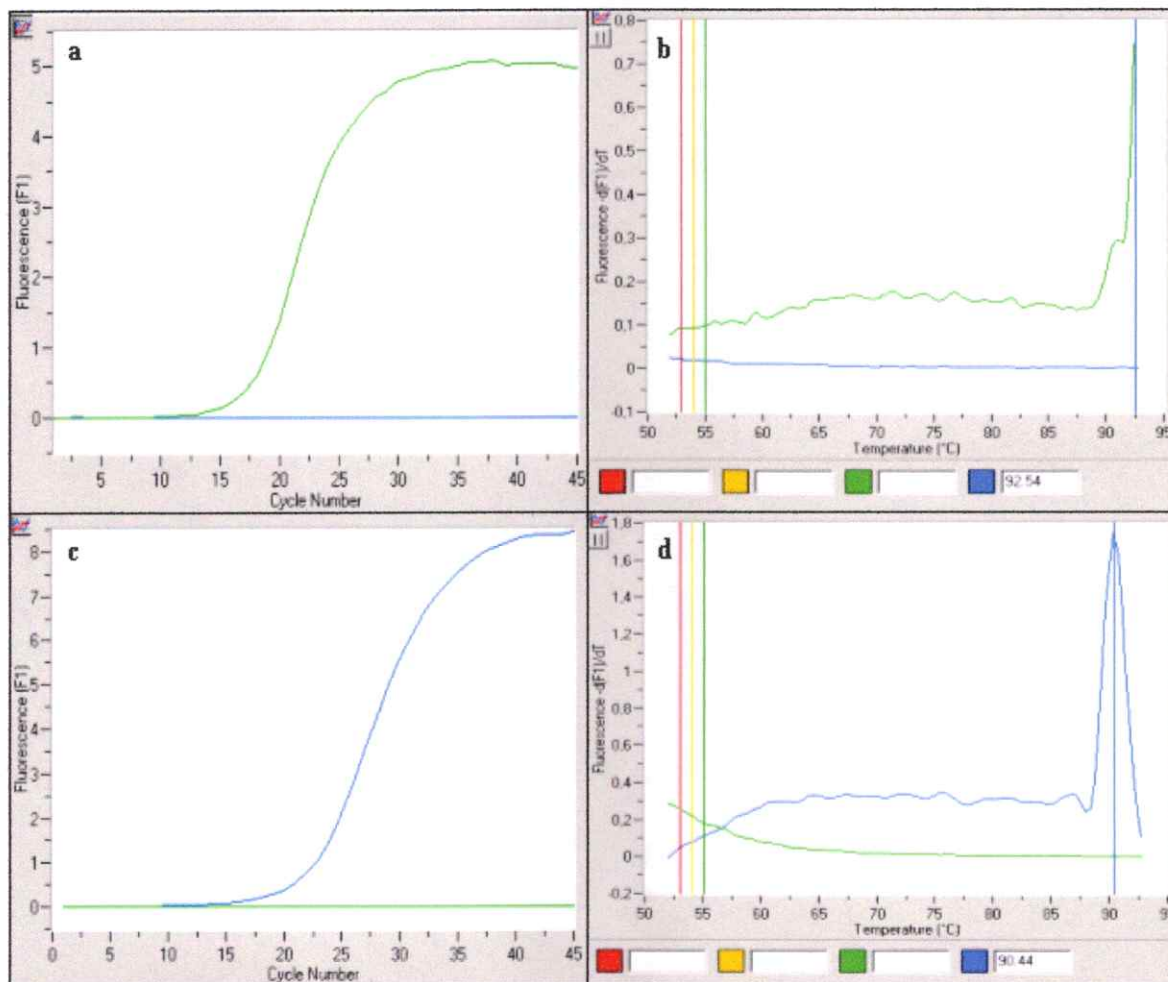


Figura 9. PCR en tiempo real de los genes *afeR* y *afeI*. El aumento exponencial de la fluorescencia refleja la amplificación de *afeR* y *afeI* (a y c). Los genes *afeR* y *afeI* fueron amplificados a partir de 80 ng de DNA genómico con los partidores *afeRp1r1for/afeRp1r1rev* y *afeIp1r1for/afeIp1r1rev* respectivamente. El análisis de la caída de fluorescencia con respecto al aumento de la temperatura permitió determinar la temperatura de hibridación específica para cada amplicón, las cuales son 92 °C y 91 °C para *afeR* (b) y *afeI* (d) respectivamente.

5.3.2. Curvas de calibración y determinación de la eficiencia de amplificación de *afeI* y *afeR* por PCR en tiempo real.

Para determinar la cantidad de mRNA presente en una muestra mediante la interpolación del C_p , se realizaron curvas de calibración para ambos genes, con distintas concentraciones de DNA genómico de *A. ferrooxidans*. En la figura 10 se muestran las curvas de calibración para *afeI* y *afeR*. Ambos genes se amplifican con similar eficiencia, siendo 89,5% para *afeR* y 88,5% para *afeI*. La ecuación de la curva de calibración para *afeR* corresponde a $y = -3,95x + 50,14$ y para *afeI* es $y = -4,026x + 49,33$.

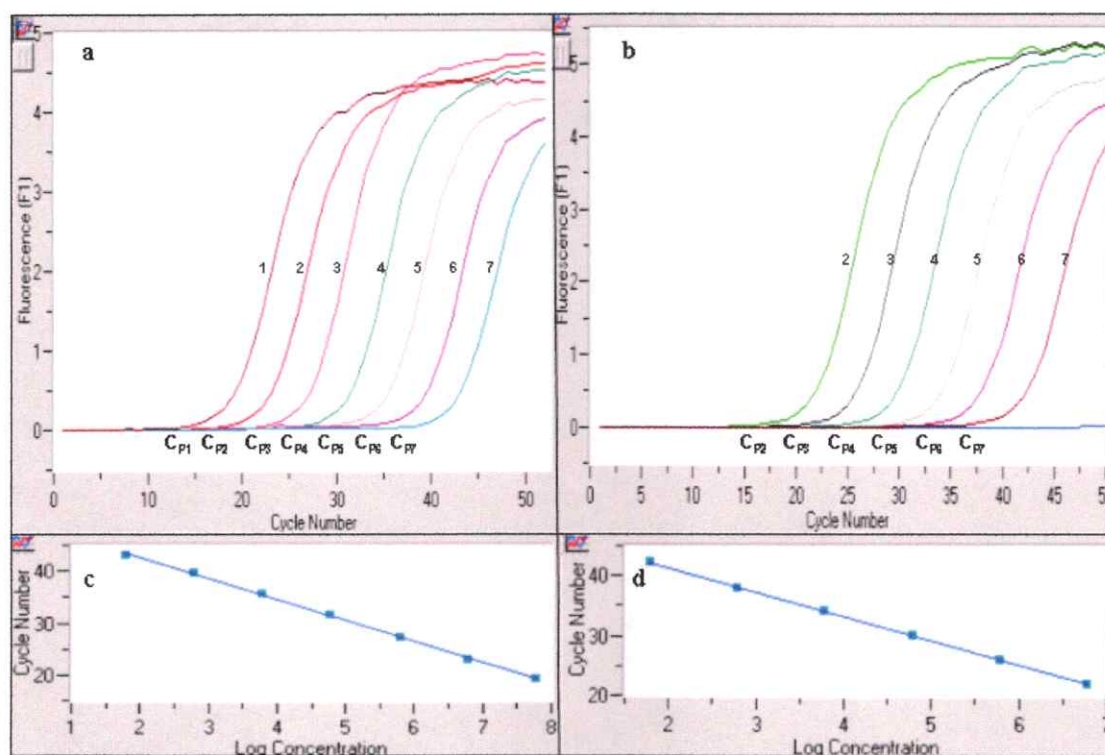


Figura 10. Curvas de calibración para los genes *afeR* y *afeI*. Se usaron diluciones seriadas de un stock de DNA genómico a 100 ng/ μ l {20 ng (1), 2ng (2), 0.2 ng (3), 20 pg (4), 2 pg (5), 0,2 pg (6), 0,02 pg (7)} para determinar los C_p correspondientes para *afeR* (a) y *afeI* (b). Estos C_p se graficaron en función del logaritmo de la concentración de DNA genómico para generar las curvas de calibración para el gen *afeR* (c) y el gen *afeI* (d).

5.3.3. Cuantificación de los niveles de mRNA de *afeI* y *afeR* durante la curva de crecimiento de *A. ferrooxidans*.

Para estudiar la expresión de los genes *afeI* y *afeR* durante el crecimiento de *A. ferrooxidans*, se extrajo RNA total de la fase exponencial media y de las fases estacionaria temprana y tardía de un cultivo de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental como fuente energética (Fig. 11.a). Se midió la D.O. a 260 nm de las muestras de RNA total extraído para determinar su concentración, la cual fue de 0,163 µg/µl para la muestra de la fase exponencial media, 0,148 µg/µl y 0,172 µg/µl para las muestras de las fases estacionaria temprana y tardía. Para ver el estado físico del RNA total extraído, se analizaron muestras en un gel de agarosa al 1% (Fig.11.b). Se puede apreciar que el RNA extraído es de buena calidad, ya que se aprecian claramente las bandas correspondientes a los rRNA de 23S y 16S. Debido a la presencia de bandas de alto peso molecular se observa que el RNA está contaminado con DNA genómico. Este se removió mediante una digestión con DNAsa I.

Con el RNA extraído se procedió a sintetizar cDNA para *afeI* y *afeR* y se cuantificó la cantidad de éste en las distintas fases del crecimiento. Se realizaron cuatro réplicas para la cuantificación de los niveles de *afeI* y *afeR* en las fases exponencial media, estacionaria temprana y estacionaria tardía, de estas tres fueron réplicas biológicas y uno de los cultivos fue una réplica experimental. En todos los casos los niveles de mRNA de *afeI* y *afeR* fueron normalizados con respecto a la cantidad de rRNA de 16S en las distintas fases. En la figura 11.c y 11.d, se observan las reacciones de PCR en tiempo real para el cDNA de *afeI* y *afeR* respectivamente, en las distintas fases del crecimiento.

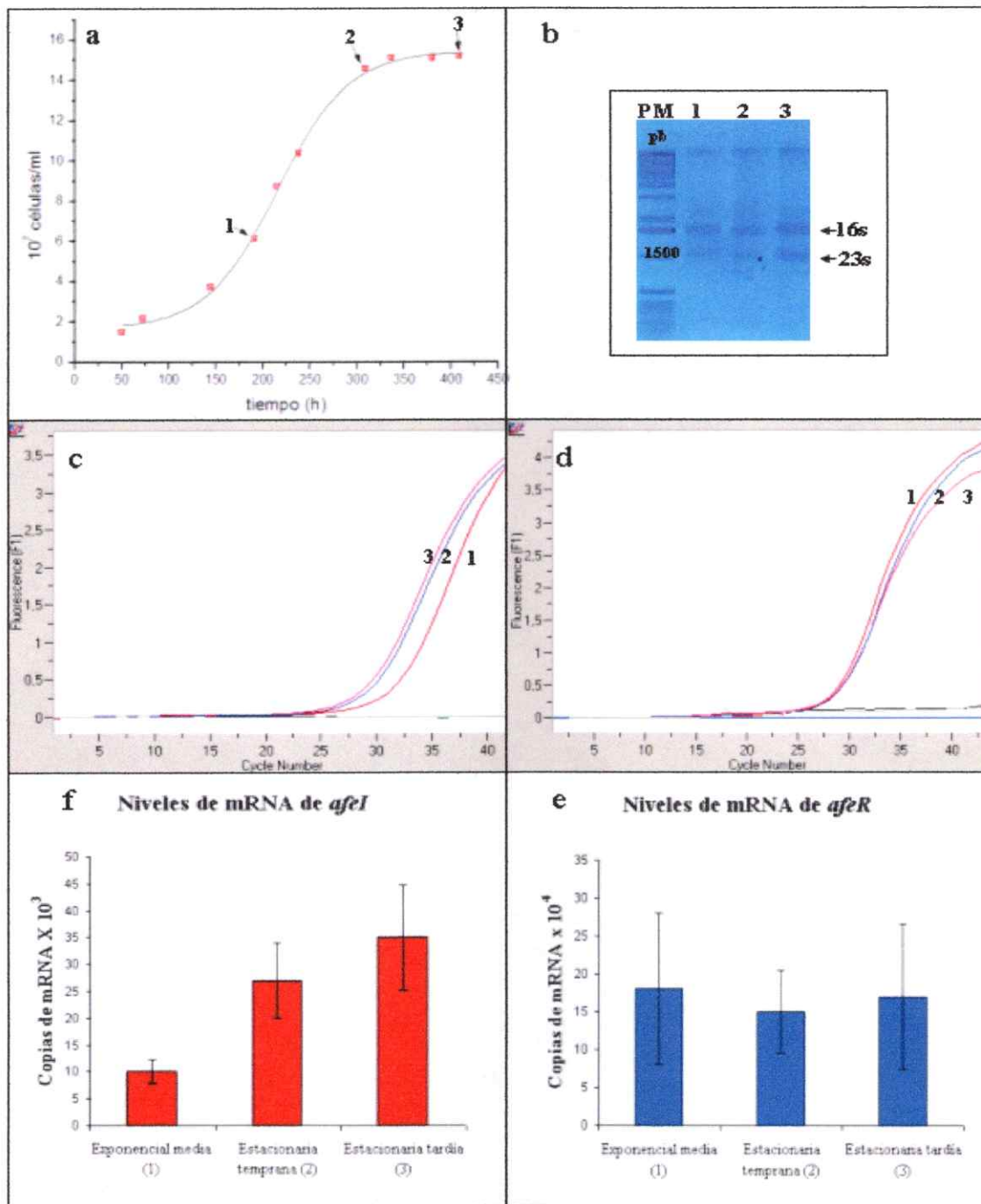


Figura 11. Cuantificación de los niveles de mRNA de *afeI* y *afeR* durante las distintas fases del crecimiento bacteriano. Se extrajo RNA total a partir de un cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre en las distintas fases del crecimiento (a) {exponencial media (1), estacionaria temprana (2) y estacionaria tardía (3)}. La calidad de la extracción de RNA total fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (b). A partir de los RNA totales extraídos se preparó cDNA de los genes *afeI* (c) y *afeR* (d), los cuales fueron amplificados por PCR en tiempo real. El promedio de los niveles de *afeI* y *afeR* para las distintas fases del crecimiento se muestra en e y f.

El promedio de las cuantificaciones de *afeI* (Fig. 11. e) y *afeR* (Fig. 11. f) muestran que *afeI* aumenta su cantidad de mRNA en la fase estacionaria temprana y estacionaria tardía con relación a la fase exponencial media, en cambio, para el gen *afeR* no se aprecia diferencia significativa entre los niveles de mRNA durante toda la curva de crecimiento bacteriano.

Como el QS de tipo AI-1 está relacionado con el desarrollo de biopelículas se hicieron los estudios de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, ya que se ha reportado que éste microorganismo forma biopelículas sobre el azufre (Arredondo y col., 1994). Se intentó extraer bacterias de la biopelícula para realizar los estudios de transcripción de *afeI* y *afeR* en células adheridas, pero la cantidad de bacterias obtenidas desde la biopelícula no fue suficiente para realizar los estudios.

5.4. Estudio de la expresión de AfeR mediante Western blot.

Para obtener más evidencias de que la expresión de *afeR* a lo largo de la curva de crecimiento es constante, se procedió a estudiar la expresión de AfeR a lo largo de la curva de crecimiento mediante Western blot.

5.4.1. Producción de anticuerpos policlonales contra AfeR.

5.4.1.1. Purificación y digestión de los plásmidos pET y pCR/NT-TOPO*afeR*19.

El gen *afeR* estaba clonado en el vector pCR/NT-TOPO de Invitrogen[®], en este vector la expresión fue muy baja o nula por lo que se decidió cambiar de vector al pET de

Novagene[®]. Para esto primero se purificó los plásmidos pET (0,47 µg/µl) y pCRNT-TOPO*afeR*19 (0,75 µg/µl) a partir de las cepas de *E. coli* JM109 y TOP10F' respectivamente, después se procedió a digerir ambos plásmidos con las enzimas de restricción *Nde*I y *Hind*III (Fig. 12), para abrir el vector pET y liberar el gen *afeR* del vector pCRNT-TOPO*afeR*19.

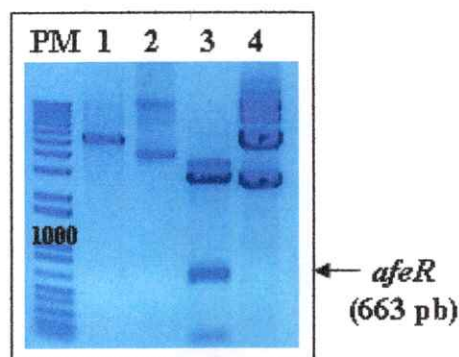


Figura 12. Electroforesis de la digestión de pET y pCRNT-TOPO*afeR*19 con *Nde*I y *Hind*III. 1. pET digerido con *Nde*I y *Hind*III. 2. pET sin digestión. 3. pCRTOPO/NT*afeR*19 digerido con *Nde*I y *Hind*III. 4. pCRTOPO/NT*afeR*19 sin digestión. PM. MassRuler[™] DNA Ladder (Fermentas[®]).

5.4.1.2. Transformación.

Se purificó a partir de un gel de agarosa el vector lineal pET de 5376 pb y el gen *afeR* de 663 pb y se procedió a ligar ambos fragmentos. Una vez ligados, el vector pET*afeR* fue transformado en células químicamente competentes de *E. coli* DH5α. Se obtuvo un total de 296 colonias recombinantes. Se seleccionaron 10 colonias al azar y se analizó la orientación del inserto mediante PCR en colonia (Fig. 13). Se encontró que 9 colonias tenían el vector pET*afeR*, con el gen *afeR* en la orientación correcta.

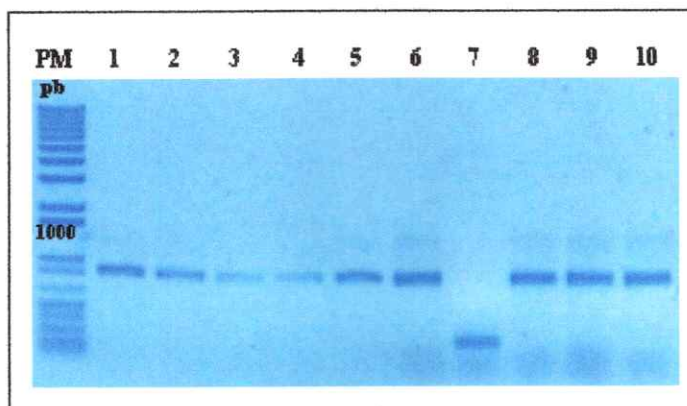


Figura 13. Análisis de la orientación de *afeR* mediante PCR en colonia. Se analizaron las colonias 1 a 10, de las cuales 9 revelaron tener el fragmento en la orientación correcta (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10), mientras que el resto lo tenía en la orientación contraria (7). PM. MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas®).

5.4.1.3. Sobreexpresión y purificación de AfeR en *E. coli*.

Las colonias que portan el inserto con la orientación correcta fueron crecidas en LB a 37 °C para purificar los plásmidos, que luego fueron transformados en la cepa de expresión de *E. coli* BL21(DE3). Una vez obtenidas las colonias recombinantes se procedió a inducir con IPTG, unas 10 colonias seleccionadas al azar. Después de la inducción se procedió a chequear la sobreexpresión de AfeR, resolviendo los extractos proteicos en SDS-PAGE. De todas las colonias analizadas se seleccionó aquel clon que presentaba la mayor expresión de la proteína para la purificación de AfeR. Se creció *E. coli* BL21(DE3) pET*afeR* y se indujo la producción de AfeR con IPTG 1 mM por 6 h. Con el precipitado celular se preparó un extracto proteico en donde estaban presentes los cuerpos de inclusión y a partir de este extracto se purificó la proteína mediante electroelución. Se obtuvo en total 7,5 mg de AfeR puro (Fig. 14).

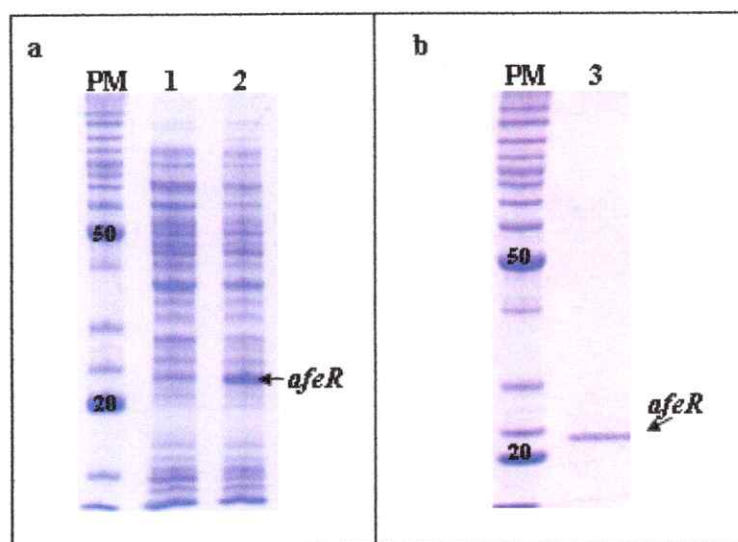


Figura 14. Sobreexpresión y purificación de la proteína AfeR en *E. coli*. Los extractos proteicos de la cepa de BL21(DE3) de *E. coli* transformada con el vector pETAfeR inducida (2) o no (1) con IPTG 1 mM por 6 h fueron analizados mediante SDS-page (a). A partir de los cuerpos de inclusión del extracto inducido con IPTG se purificó AfeR mediante electroelución en buffer volátil (NH_4HCO_3 3,95 g/l, SDS 1 g/l) por 6 h a 60 mA, la fracción obtenida con AfeR pura se analizó en SDS-page (b). PM. BenchMarkTM Protein Ladder (Invitrogen[®]).

Para chequear que la proteína purificada correspondía a AfeR se secuenció el extremo amino terminal de la proteína recombinante y se confirmó que correspondía a AfeR (datos no mostrados).

5.4.1.4. Generación de anticuerpos contra AfeR.

Se envió 3,3 mg liofilizados de AfeR puro al laboratorio PickCell en Holanda para la obtención de un suero policlonal de conejo.

5.4.2. Estudio de la expresión de AfeR mediante Western blot.

Una vez recibido el suero se limpió éste con un extracto proteico de *E. coli*. Los anticuerpos fueron probados para ver su capacidad de reconocer AfeR mediante Western blot. Estos fueron probados contra la proteína pura (con la cual se inmunizó al conejo), contra un extracto proteico de *A. ferrooxidans* y contra un extracto proteico de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) inducido con IPTG, que contiene un vector que expresa AfeR (pCRNT-TOPO*afeR*19). Se uso una dilución de 1:5 del suero policlonal (Fig. 15).

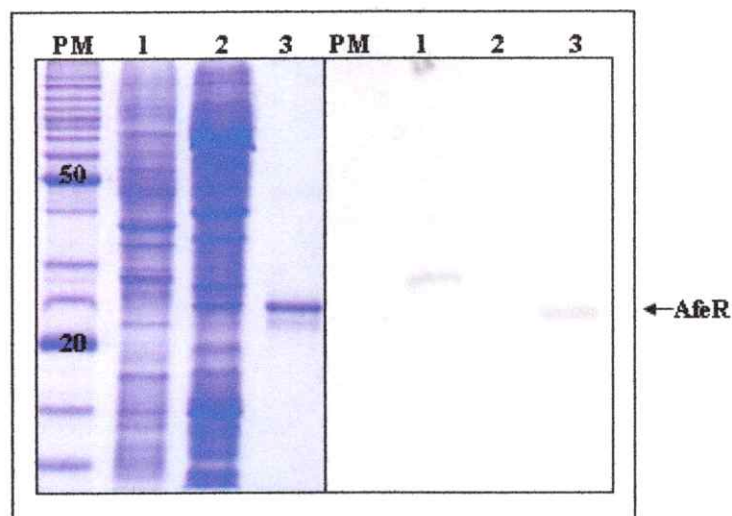


Figura 15. Análisis de la especificidad de los anticuerpos contra AfeR. El SDS-Page muestra el extracto de *E. coli* BL21(DE3)(pCRNT-TOPO*afeR*19) (1), el extracto de proteínas totales de *A. ferrooxidans* (2) y la proteína AfeR pura (3). En el Western blot se observa que hay inmunodetección de AfeR en el extracto de *E. coli* recombinante y de la proteína pura pero no contra el extracto de proteínas totales de *A. ferrooxidans*. PM. BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen®).

En el Western blot se aprecia que hay un reconocimiento específico del suero por la proteína AfeR recombinante, sin embargo, no reconoce AfeR en el extracto proteico de *A.*

ferrooxidans. Se aprecia una diferencia en el peso molecular de AfeR expresada por *E. coli* recombinante con respecto a AfeR pura. Esto se debe a que el vector pCRNT-TOPO al expresar AfeR le adiciona un epitope y una cola de histidina a la proteína.

Después de numerosos intentos para detectar AfeR en extractos proteicos de *A. ferrooxidans* mediante Western blot durante las distintas fases del crecimiento, no se observó ninguna banda específica de reconocimiento para esta proteína, ni en la fase exponencial media, ni en la fase estacionaria temprana y tardía, por lo que no fue posible continuar con el estudio.

6. Discusión.

Para probar que en *A. ferrooxidans* existe un sistema de QS de tipo AI-1 se procedió inicialmente con el chequeo del medio de cultivo para detectar la presencia de AHLs. Se encontró que *A. ferrooxidans* produce mayoritariamente C₁₂-AHL y C₁₄-AHL, y trazas de 3-oxo-C₁₂-AHL, 3-hidroxi-C₁₀-AHL, 3-hidroxi-C₁₂-AHL, 3-hidroxi-C₁₄-AHL y 3-hidroxi-C₁₆-AHL en un cultivo cuya fuente energética es el azufre elemental. El hecho de que *A. ferrooxidans* produzca varios tipos de AHLs es concordante con que las proteínas I pueden producir varios tipos de AHLs, como en el caso de YpsI de *Yersinia pseudotuberculosis* que produce 3-oxo-C₆-AHL, C₆-AHL y C₈-AHL (Atkinson y col., 1999). Sin embargo esta variedad de AHLs también se puede explicar por la influencia del medio ambiente, el cual regula diferencialmente la síntesis de acil-ACP, dando como resultado distintos acervos de este sustrato para la síntesis de AHLs en una determinada condición (Brader y col., 2005).

Para determinar si la producción de alguna de estas AHLs es dependiente de la densidad celular, la presencia de estos compuestos fue analizada en la fase exponencial y en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Se observó que C₁₂-AHL y C₁₄-AHL incrementan su concentración en la fase estacionaria con respecto a la fase exponencial. Esta observación coincide con lo observado en *E. carotovora* y *Y. pseudotuberculosis* en donde la concentración de AHL se incrementa en la fase exponencial llegando a su máximo en la fase estacionaria temprana (Yates y col., 2002; Byers y col., 2002).

Se realizaron además, pruebas de RT-PCR para los genes *afel* y *afeR* y se vio que estos se expresan en *A. ferrooxidans*. Este hecho junto con la prueba de que *A. ferrooxidans* produce AHLs y que esta producción esta asociada al tamaño poblacional, dan indicios de la existencia de un sistema QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*. Esta evidencia esta apoyada

también por el hallazgo realizado en nuestro grupo de investigación, en que se probó que *AfeI* es efectivamente una AHL sintasa, ya que al sobreexpresar *afeI* en *E. coli* (que no produce AHL) se generan C₁₂-AHL y C₁₄-AHL, además de otras AHLs en el medio de cultivo de *E. coli* recombinante.

Para caracterizar este sistema se procedió a cuantificar los niveles de mRNA a lo largo de la curva de crecimiento bacteriano de los genes *afeI* y *afeR*. Para cuantificar la cantidad de mRNA se usó PCR en tiempo real, debido a que actualmente es la técnica más sensible y precisa para cuantificar mRNAs.

Se observó que el gen *afeI* aumentó su expresión en las fases estacionaria temprana y tardía con respecto a la fase exponencial media. Para el gen *afeR* se vio que los niveles de transcripción no varían a lo largo de la curva de crecimiento bacteriano. Estos resultados difieren en parte con los obtenidos por Rivas y col. (2005). Este grupo reportó que *afeI* aumenta su expresión de la fase exponencial media a la fase estacionaria tardía, lo cual concuerda con los hallazgos de esta tesis y que *afeR* aumenta su nivel de transcripción en la fase estacionaria temprana y tardía con respecto a la fase exponencial media y que disminuye de la fase estacionaria temprana a la fase estacionaria tardía. Las diferencias encontradas por ambos grupos pueden deberse a que se usaron técnicas distintas para cuantificar la cantidad de mRNA de *afeI* y *afeR*. Rivas y col. (2005), usaron RT-PCR semicuantitativo en donde los genes *afeI* y *afeR* fueron cuantificados con respecto al gen *recA*, usado como control de expresión. Esta técnica tiene una falencia intrínseca dada por el alto grado de variabilidad asociada al cambio de eficiencia del PCR de reacción en reacción para un gen dado. Por lo tanto, no se puede asegurar que la eficiencia del PCR sea constante de una reacción a otra, debido por ejemplo a la presencia de inhibidores, por lo que se puede llegar a concluir erróneamente que hay diferencias de concentración entre dos

muestras que no necesariamente están dadas por una diferencia inicial de templado, sino por una diferencia en la eficiencia de la reacción de PCR. En cambio, usando PCR en tiempo real se tiene la ventaja de que la cuantificación de la cantidad de templado se realiza mediante la determinación del C_p que es un parámetro menos variable que la eficiencia del PCR.

Otro factor que también puede influir en la diferencia de los resultados presentados por ambos grupos es que se usaron distintos partidores y distintas cantidades de RNA total para la generación de cDNA lo cual claramente influye en la especificidad del PCR y por ende puede afectar los resultados. Por otra parte Rivas y col. (2005) no precisan si las muestras de RNA total fueron tomadas a lo largo de la curva de crecimiento de un solo cultivo o de varios cultivos. En caso de que hubiesen tomado las muestras de RNA de varios cultivos la variabilidad aumentaría, lo cual claramente influiría en la diferencia de los resultados.

A pesar de las diferencias en los resultados de ambos grupos, existe consenso en que la expresión de *afeI* aumenta de la fase exponencial media a la fase estacionaria temprana. Este hecho estaría apoyado por los hallazgos de Slater y col. (2003), y de McGowan y col. (2005), que encontraron que *smal* y *carI* aumentan su expresión a lo largo de la fase exponencial del crecimiento, obteniendo su máximo nivel en la fase estacionaria temprana. Este aumento en la expresión de *afeI* de la fase exponencial media a la fase estacionaria también se ve apoyado por el hecho de que la concentración de C_{12} -AHL y C_{14} -AHL se incrementa en la fase estacionaria temprana con respecto a la fase exponencial temprana.

Por otra parte existen pocos reportes sobre la transcripción de homólogos de *afeR* durante la curva de crecimiento. Carbol y col. (2003) midieron la transcripción de *lasR* mediante PCR en tiempo real y encontraron que *lasR* aumentaba su transcripción de la fase exponencial temprana a la fase estacionaria temprana. Por otra parte Slater y col. (2003), encontraron

que *smaR* disminuía su transcripción progresivamente a medida que la población aumentaba, siendo el punto máximo de expresión la fase exponencial temprana. Si bien ambos resultados se contradicen pueden tener su explicación en el hecho de que LasR es un regulador transcripcional positivo y SmaR es un regulador transcripcional negativo. Los resultados de Carbol y col. (2003) para el gen *lasR* son similares a los resultados obtenidos por Rivas y col. (2005) para *afeR*. Sin embargo, Latifi y col. (1996) midieron la expresión de *lasR* fusionado a *lacZ* y definieron que no hay variación en la expresión de *lasR* a lo largo de la curva de crecimiento. Estos resultados apoyan lo encontrado para *afeR* en esta tesis.

Evidentemente existen contradicciones en cuanto a los reportes sobre la expresión de los miembros de la familia R a lo largo de la curva de crecimiento bacteriano por lo que se requieren más investigaciones para saber cual es la real tendencia en la expresión de las proteínas R durante el crecimiento en cada microorganismo. Cabe señalar, sin embargo, que no hay que esperar que los patrones de expresión de las proteínas R sean iguales en todos los microorganismos, ya que los reguladores del QS de tipo AI-1 están casi siempre integrados en otras redes regulatorias que detectan otras señales ambientales e influyen en la expresión génica más allá de la densidad celular (Ledgham y col., 2003).

Debido a que aun no está bien definido cual es el patrón de expresión de *afeR* a lo largo de la curva de crecimiento, no es posible relacionar la tendencia en la expresión de *afeR* con la de *afeI* a lo largo de la curva de crecimiento para inferir si en *A. ferrooxidans* existe un fenómeno de retroalimentación positiva del sistema de QS de tipo AI-1, tal como ocurre en otras bacterias Gram negativa como *V. fischeri*, *A. tumefaciens* y *P. aeruginosa* en donde las proteínas R regulan aumentando la expresión de los miembros de la familia I de sintasas de AHL (Ulitzur y Kuhn, 1988; Fuqua y col., 1994; Miller y Bassler, 2001). Sin embargo,

Rivas y col. (2005) encontraron que el promotor de *afeI* (que contiene una putativa “caja *afe*”) ligado a LacZ es activado por AHL solo en presencia del gen *afeR*, esto sugiere que efectivamente hay una regulación positiva de la transcripción de *afeI* mediada por AfeR.

Para obtener más evidencias de cómo es la expresión de *afeR* a lo largo de la curva de crecimiento se procedió a hacer anticuerpos policlonales para AfeR y se trató de analizar la expresión de esta durante las distintas fases del crecimiento mediante Western blot. No fue posible obtener resultados para AfeR en ninguna de las fases de crecimiento. Esto se debió probablemente a que el título de los anticuerpos anti-AfeR era muy bajo o que existe una dificultad intrínseca en la familia de proteínas R para ser inmunodetectadas debido a su poca estabilidad. Esta dificultad para detectar a las proteínas R por inmunodetección esta ejemplificada por AhyR de *Aeromonas hydrophila*, que solo se detecta muy tenuemente en la fase estacionaria (Kirke y col., 2004).

7. Conclusiones.

- *A. ferrooxidans* produce moléculas del tipo AHLs y su producción esta relacionada con la densidad celular.
- Existe un sistema QS de tipo AI-1 en *A. ferrooxidans*.
- La expresión del gen *afeI* aumenta de la fase exponencial media a la fase estacionaria temprana.
- La expresión del gen *afeR* no varía a lo largo de la curva de crecimiento bacteriana.

8. Referencias.

- Arredondo, R., García, A., Jerez, C.A.** (1994). The Partial Removal of Lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* Affects its Attachment to Solids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2846-2851.
- Atkinson, S., Thoup, J.P., Gordon, S.A., Stewart, B., Williams, P.** (1999). A Hierarchical Quorum-Sensing System in *Yersinia pseudotuberculosis* is Involved in the Regulation of Motility and Cumpling. *Mol. Microbiol.* 33:1267-1277.
- Brader, G., Sjöblom, S., Hyytiäinen, H., Sims-Huopaniemi K., Palva, E.** (2005). Altering Substrate Chain Length Specificity of an Acylhomoserine Lactone Synthase in Bacterial Communication. *J. Biol. Chem.* 280: 10403-10409.
- Bustin, S.A.** (2000). Absolute Quantification of mRNA using Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25: 169-193.
- Byers, J., Lucas, C., Salmond, G., Welch, M.** (2002). Nonenzimatic Turnover of an *Erwinia carotovora* Quorum-Sensing Signaling Molecule. *J. Bacteriol.* 184: 1163-1171.
- Cabrol, S., Olliver, A., Pier, G.B., Andremont, A., Ruimy, R.** (2003). Transcription of Quorum-Sensing System Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185: 7222-7230.
- Campbell, T.N., Choy, F.Y.** (2001). Large-scale Colony Screening and Insert Orientation Determination using PCR. *Biotechniques.* 30: 32-34.
- Chen, X., Schauder, S., Potier N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L., Hughson, F.M.** (2002). Structural Identification of a Bacterial Quorum-Sensing Signal Containing Boron. *Nature.* 415: 545-549.

- Choi, S.C., Greenberg, E.P.** (1991). The C-Terminal Region of the *Vibrio fischeri* LuxR Protein Contains an Inducer-Independent *lux* Gene Activating Domain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 1115-1119.
- Davies, D.G., Parsek, M. R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P.** (1998). The Involvement of Cell-To-Cell Signals in the Development of Bacteria Biofilm. Science. 280: 295-297.
- Dunlap, P.V., Greenberg, E.P.** (1988). Control of *Vibrio fischeri lux* Gene Transcription by a Cyclic AMP Receptor Protein-LuxR Protein Regulatory Circuit. J. Bacteriol. 170: 4040-4046.
- Dunlap, P.V.** (1999). Quorum Regulation of Luminescence in *Vibrio fischeri*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1: 5-12.
- Dunny, G.R., Winans, S.C.** (1999). Cell-Cell Signaling in Bacteria. American Society for Microbiology.
- Egland, K.A., Greenberg, E.P.** (2000). Conversion of the *Vibrio fischeri* Transcriptional Activator, LuxR, to a Repressor. J. Bacteriol. 182: 805-811.
- Flavier, A.B., Schell, M.A., Denny, T.P.** (1998). An RpoS (σ^S) Homologe Regulates Acylhomoserine Lactone-dependent Autoinduction in *Ralstonia solanacearum*. Mol. Microbiol. 28: 475-486.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P.** (1994). Quorum Sensing in Bacteria: The LuxR-LuxI Family of cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. J. Bacteriol. 176: 269-275.

- Fuqua, W.C., Winans, S.C. (1994).** A LuxR-LuxI Type Regulatory System Activates *Agrobacterium* Ti Plasmid Conjugal Transfer in the Presence of a Plant Tumor Metabolite. *J. Bacteriol.* 176: 2796-2806.
- Gould, T.A., Schweizer, H.P., Churchill, M.A. (2004).** Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* Acyl-Homoserine Lactone Synthase LasI. *Mol. Microbiol.* 53: 1135-1146.
- Gray, K.M., Garey, J.R. (2001).** The Evolution of Bacterial LuxI and LuxR Quorum Sensing Regulators. *Microbiology.* 147: 2379-2387.
- Hanzelka, B.L., Stevens, A.M., Paersek, M.R., Crone, T.J., Greenberg, E.P. (1997).** Mutational Analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI Polypeptide: Critical Regions of an Autoinducer Synthase. *J. Bacteriol.* 179: 4882-4887.
- Henke, J.M., Bassler, B.L. (2004).** Bacterial Social Engagements. *Trends. Cell. Biol.* 14: 648-656.
- Hong, Y.T., Deng, S.C., Daykin, M., Soo, P.C., Wei, J.R., Luh, K.T., Ho, S.W., Swift, S., Lai, H.C., Williams, P. (2002).** The LuxR Family Protein SpnR Function as a Negative Regulator of N-acyl-Homoserine Lactone-Dependent Quorum-Sensing in *Serratia marcescens*. *Mol. Microbiol.* 45: 1655-1671.
- Kinzler, K., Gehrke, T., Telegdi, J., Snand, W. (2003).** Bioleaching a Result of Interfacial Processes Caused by Extracellular Polymeric Substances (EPS). *Hydrometallurgy.* 71: 83-88.
- Kirke, D.F., Swift, S., Lynch, M.J., Williams, P. (2004).** The *Aeromonas hydrophila* LuxR Homologue AhyR Regulates the N-Acyl-Homoserine Lactone Synthase, AhyI Positively and Negatively in a Growth Phase Dependent Manner. *FEMS. Microbiol. Lett.* 241: 109-117.

- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lazdunski, A. (1996).** A Hierarchical Quorum Sensing Cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the Transcriptional Activators LasR and RhlR (VmsR) to expression of the Stationary-Phase Sigma Factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21: 1137-1146.
- Lave, B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart S.A.B., Hardman, A., Downie, J.A., Olgara, F., Williams, P. (2000).** The Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* F113 Produces the *Rhizobium* Small Bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine Lactone, Via HtdS, a Putative Novel N-acylhomoserine Lactone Synthase. *Microbiology.* 146: 2469-2480.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J.M., Lazdunski, A. (2003).** Interactions of the Quorum Sensing Regulator QscR: Interaction with Itself and the other Regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol. Microbiol.* 48: 199-210.
- Marketon, M.M., Glen, S.A., Eberhard, A., González, J.E. (2003).** Quorum Sensing Controls Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 185: 325-331.
- McGowan, S.J., Barnard, A.M., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A., Salmond, G.P. (2005).** Carbapenem Antibiotic Biosynthesis in *Erwinia carotovora* is Regulated by Physiological and Genetic Factors Modulating the Quorum Sensing-Dependent Control Pathway. *Mol. Microbiol.* 55: 526-545.
- Miller, M.B, Bassler, B.L. (2001).** Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 165-199.

- Morin, D., Grasland, B., Vallee-Rehel, K., Dufau, C., Haras, D.** (2003). On-line High-performance Liquid Chromatography-mass Spectrometric Detection and Quantification of N-acylhomoserine Lactones, Quorum Sensing Signals Molecules, in the Presence of Biological Matrices. *J. Chromatogr. A.* 1002: 79-92.
- Pearson, J.P., Van Delden, C., Iglewski, B.** (1999). Active Efflux and Diffusion Are Involved in Transport of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-to-Cell Signals. *J. Bacteriol.* 181: 1203-1210.
- Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, E.T.** (1993). A Small Diffusible Signal Molecule is Responsible for the Global Control of Virulence and Exoenzyme Production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12: 2467-2476.
- Rawlings, D.E., Kusano, T.** (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58: 39-55.
- Rawlings, D.E.** (2002) Heavy Metal Mining Using Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 65-91.
- Rivas, M., Seeger, M., Holmes, D., Jedlicki, E.** (2005). A Lux like Quorum Sensing System in the Extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* 38: 283-297.
- Rutledge, R.G., Côte, C.** (2003). Mathematics of Quantitative Kinetic PCR and the Application of the Standard Curves. *Nucleic. Acids. Res.* 31: 93-98.
- Shadel, G.S., Baldwin, T.O.** (1991). The *Vibrio fischeri* LuxR Protein is Capable of Bidirectional Stimulation of Transcription and Both Positive and Negative Regulation of the *luxR* Gene. *J. Bacteriol.* 173: 568-574.
- Sitnikov, D.M., Schineller, J.B., Baldwin, T.O.** (1995). Transcriptional Regulation of Bioluminescence Genes from *Vibrio fischeri*. *Mol. Microbiol.* 17: 801-812.

- Slater, H., Crow, M., Everson, L., Salmond, G.** (2003). Phosphate availability Regulates Biosynthesis of two Antibiotics, Prodigiosin and Carbapenem, in *Serratia* via both Quorum-Sensing-Dependent and Independent Pathway. *Mol. Microbiol.* 47: 303-320.
- Ulitzur, S., Kuhn, J.** (1988). The Transcription of Bacterial Luminescence is Regulated by Sigma 32. *J. Biolumin. Chemilumin.* 2: 81-93.
- Val, D.L., Cronan, J.E.** (1998). In vivo Evidence that S-Adenosymethyonine and Fatty Acid Sintesis Intermediates are the Substrates for the LuxI Family of Autoinducer Synthases. *J. Bacteriol.* 180: 2644-2651.
- Vannini, A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Nedderman, P., Di Marco, S.** (2002). The Crystal Structure of the Quorum Sensing Protein TraR Bound to its Autoinducer and Target DNA. *EMBO J.* 21: 4393-4401.
- Von Bodman, S., Farrand S.K.** (1995). Capsular Polysaccharide Biosynthesis and Pathogenicity in *Erwinia stewartii* Requiere Induction by an N-Acyl-Homoserine Lactone Autoinducer. *J. Bacteriol.* 177: 5000-5008.
- Von Bodman, S.B., Ball, K., Faini, A., Herrera, C.M., Minogue, T.D., Urbanowski, M.L., Stevens, A.M.** (2003). The Quorum Sensing Negative Regulators EsaR and ExpR_{Ecc}, Homologues Within the LuxR Family, Retain the Ability to Function as Activators of Transcription. *J. Bacteriol.* 185: 7001-7007.
- Waters, C.M., Bassler, B.L.** (2005). Quorum Sensing: Cell-To-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 21: 319-346.
- Watson, W.T., Minogue, T.D., Val, D.L., Beck, S., Churchill, M.E.** (2002). Structural Basis and Specificity of Acyl-Homoserine Lactone Signal Production in Bacterial Quorum Sensing. 9: 685-694.

Wilson, L., Kou, A., Dunlap, P.V. (1995). AinS and a New Family of Autoinducer Synthesis Proteins. *J. Bacteriol.* 177 : 6946-6951.

Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H., Williams, P. (2002). N-Acylhomoserine Lactones Undergo Lactonolysis in a pH-Temperature, and Acyl Chain Length-Dependent Manner During Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 70: 5635-5646.

Zhao-Qing, L., Smyth, A.J., Gao, P., Von Bodman, S.B., Farrand, S.K. (2000). Quorum-Sensing Signal Binding Results in Dimerization of TraR and its Release from Membranes into the Cytoplasm. *EMBO J.* 19: 5212-5221.

9. Anexo.

Publicación generada durante esta tesis.

Evidence for a Functional Quorum-Sensing Type AI-1 System in the Extremophilic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*†

Carolina Farah,¹ Mario Vera,¹ Danièle Morin,² Dominique Haras,²
Carlos A. Jerez,¹ and Nicolas Guilian^{1*}

Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago, Chile,¹ and Laboratoire de Biologie et Chimie Marines (EA 3884), Université de Bretagne-Sud, Lorient, France²

Received 31 May 2005/Accepted 16 July 2005

Acidithiobacillus ferrooxidans is one of the main acidophilic chemolithotrophic bacteria involved in the bioleaching of metal sulfide ores. The bacterium-mineral interaction requires the development of biofilms, whose formation is regulated in many microorganisms by type AI-1 quorum sensing. Here, we report the existence and characterization of a functional type AI-1 quorum-sensing system in *A. ferrooxidans*. This microorganism produced mainly acyl-homoserine lactones (AHL) with medium and large acyl chains and different C-3 substitutions, including 3-hydroxy-C₈-AHL, 3-hydroxy-C₁₀-AHL, C₁₂-AHL, 3-oxo-C₁₂-AHL, 3-hydroxy-C₁₂-AHL, C₁₄-AHL, 3-oxo-C₁₄-AHL, 3-hydroxy-C₁₄-AHL, and 3-hydroxy-C₁₆-AHL. A quorum-sensing genetic locus that includes two open reading frames, *afeI* and *afeR*, which have opposite orientations and code for proteins with high levels of similarity to members of the acyl synthase (I) and transcriptional regulator (R) protein families, respectively, was identified. Overexpression of *AfeI* in *Escherichia coli* and the associated synthesis of AHLs confirmed that *AfeI* is an AHL synthase. As determined by reverse transcription-PCR, the *afeI* and *afeR* genes were transcribed in *A. ferrooxidans*. The transcription levels of the *afeI* gene were higher in cells grown in sulfur and thiosulfate media than in iron-grown cells. Phosphate starvation induced an increase in the transcription levels of *afeI* which correlated with an increase in AHL levels. Two *afe* boxes which could correspond to the *AfeR* binding sites were identified upstream of the *afeI* gene. This is the first report of a functional type AI-1 quorum-sensing system in an acidophilic chemolithotrophic microorganism, and our results provide a very interesting opportunity to explore the control and regulation of biofilm formation during the bioleaching process.

Quorum sensing (QS) is a widespread phenomenon that enables bacterial cells to establish cell-cell communication and to regulate the expression of specific genes in response to local changes in cell density (6, 48, 49). QS provides the means to coordinate the activities of cells so that they function as a multicellular unit and communicate with eukaryotic hosts (6, 20, 48, 49). In gram-negative bacteria, depending on the auto-inductor (AI) molecule, two QS processes have been described: type AI-1, which is involved mainly in intraspecies communication, and type AI-2, which is related to interspecies communication (20, 49).

The type AI-1 QS regulatory system is composed of four elements: (i) a transcriptional regulator (protein family R); (ii) a *cis*-acting DNA palindromic sequence; (iii) an acyl-homoserine lactone (AHL), which is the signaling molecule or autoinducer (AI-1); and (iv) the AHL synthase protein (protein family I), which synthesizes the AI (6, 20, 48, 49). It is currently accepted that AI-1 diffuses freely between the cellular and external environments and complexes with the R protein only at a high cell density. The AHL-R complex binds through the R carboxyl domain to the specific site which corresponds to a

palindromic sequence centered at about position -40 with respect to the transcriptional start sites of the target genes (15, 48, 49).

Acidithiobacillus ferrooxidans is an acidophilic gram-negative bacterium that is capable of oxidizing ferrous iron or reduced sulfur compounds to obtain energy for growth. Its energetic metabolism is directly involved in biomining processes. For this reason, there is great interest in understanding the molecular mechanisms of this peculiar physiological kind of life (34). During bioleaching *A. ferrooxidans* adheres to solid substrates by means of extracellular polymeric substances, such as exo- or lipopolysaccharides (36). *A. ferrooxidans* is also able to develop biofilm structures and exhibits morphological modifications during the cellular adhesion process (7, 13, 22, 36). AHL-mediated gene regulation has been shown to influence exopolysaccharide production and biofilm formation in many proteobacteria (12, 16, 21, 24, 49).

The purpose of the present work was to determine whether *A. ferrooxidans* possesses a functional type AI-1 quorum-sensing system. Different types of AHLs were found in the growth medium of *A. ferrooxidans* cultures. An *A. ferrooxidans* quorum-sensing locus was identified and designated *afeIR*. The *afeI* and *afeR* genes were expressed in *A. ferrooxidans*, and it was demonstrated that *AfeI* is an AHL synthase. Our results suggest that there is functional type AI-1 quorum sensing in *A. ferrooxidans* which could be part of a regulon controlling some physiological functions, such as exopolysaccharide synthesis and biofilm formation.

* Corresponding author. Mailing address: Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Phone: (056) 978-71-42. Fax: (056) 271-29-83. E-mail: nguilian@codon.ciencias.uchile.cl.

† Dedicated to the memory of Jean-Noël Guilian.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth media. *A. ferrooxidans* ATCC 23270 was grown in ferrous iron-containing modified 9K medium at pH 1.5 as described previously (4), and organisms were grown on elemental sulfur at pH 2.5 with 5% (wt/vol) sulfur prills (3, 4). *A. ferrooxidans* was grown on thiosulfate at pH 4.6 in DSMZ medium 71 containing 20 mM thiosulfate as described previously (32). *Escherichia coli* strain BL21(DE3) and derivatives of this strain were grown in Luria-Bertani (LB) medium (37).

Preparation of crude AHL extracts and LC-MS-MS analysis. The AHLs and oxo-AHLs were extracted and characterized as described previously (29). Briefly, after the bacterial cells were removed from the media of grown cultures by centrifugation, the supernatants were extracted twice with 1 volume of high-performance liquid chromatography (HPLC)-grade dichloromethane. The dichloromethane extracts were dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, and evaporated to dryness. Residues were dissolved in 1 ml of HPLC-grade acetonitrile and analyzed by using reverse-phase liquid chromatography coupled with positive-ion electrospray ionization and ion trap mass spectrometry (LC-MS-MS) (29). The 3-hydroxy-AHLs were analyzed using the same protocol. These compounds were identified by comparison with synthetic 3-hydroxy-AHLs based on three criteria: the MS-MS fragmentation product ions ($[M+H-H_2O]^+$ and m/z 102), their relative intensities, and the HPLC retention times.

AHL bioassays. The different bioassay steps were performed as described previously (39). A 250- μ l portion of an overnight culture of the *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4) AHL reporter strain grown in LB medium with gentamicin was inoculated into AB minimal glucose medium (ABm) and grown for 8 h at 30°C with shaking. The culture was then mixed with an equal volume of 1.5% TOP agar containing 80 μ g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal), and the preparation was used as an overlay on ABm agar plates. The dichloromethane extracts obtained from the *A. ferrooxidans* media were spotted at the center of the overlaid ABm agar plates and incubated overnight at 30°C.

Bioinformatic tools. The BLAST program (2) was used to search for open reading frames (ORFs) encoding LuxR and LuxI homologs in the genome sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270. The search for *afe* boxes was done at the Genomic and Bioinformatic Center, Catholic University of Chile (www.cgb.cl). Palindromic sequences were detected in the intergenic region of the *afeIR* locus by using the algorithm bl2seq from the BLAST software (41). Hidden Markov models (HMM) were constructed with the results obtained by using the HMMER v2.3.2 software (14). Hidden Markov models were compared with the genome sequence to identify *afe* boxes.

For homology modeling and evaluation of AfeR and AfeI protein structures, 130 models were constructed for each protein with the MODELLER program (28). The templates were chain C of the TraR structure of *A. tumefaciens* (PDB ID no. 1L3L), determined by X-ray diffraction at 1.66-Å resolution, and the LasI structure of *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID no. 1ROS), determined by X-ray diffraction at 2.3-Å resolution (17, 44, 50). All models were evaluated using the Verify-3D program (27). The models with the highest three-dimensional profile scores were finally selected.

Cloning the *afeI* gene. The *afeI* gene was amplified from *A. ferrooxidans* chromosomal DNA by PCR using the following primers: 5'-CATATGCAGGT TATAACCGGCCA-3' (5' end) and 5'-CGGTTAGTCCAGATCTATCCAG C-3' (3' end). The 5' end primer included an NdeI restriction site (underlined). The PCR was performed by using 3 min at 95°C, followed by 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 56°C, and 40 s at 72°C and finally 3 min at 72°C. The PCR fragment was purified from agarose gels with Wizard PCR Preps from Promega and cloned in pCRT7-NT-TOPO (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. The different plasmid constructions were checked by automatic DNA sequencing at the Biotechnology Center of the Faculty of Sciences, University of Chile.

RNA manipulations. *A. ferrooxidans* ATCC 23270 total RNA was prepared from thiosulfate-, iron- or sulfur-grown cells by a modified hot-phenol method as described previously (19, 45). Primer extension was performed with the Superscript II RNase H reverse transcriptase (Invitrogen) by using 15 μ g of total RNA and the AfeIRT2 primer (5'-GGAAAGATCTCGCCCAACAG-3') labeled with [γ -³²P]ATP. The sequencing reaction was performed with the *fmoI* DNA cycle sequencing system as described by Promega.

The following synthetic oligonucleotides were used in reverse transcription (RT)-PCR assays for the reverse transcription step: 5'-CGGTTAGTCCAGAT CTATCCAGC-3', 5'-CGATCACGACAGCAACCGAGCA-3', and 5'-GATG TTGCTTCGTGGGAATC-3' for the *afeI*, *afeR*, and *orf3* genes, respectively. For PCRs, the following primers were used: for *afeI*, 5'-CATATGCAGGTATAA CCGGCCA-3' and 5'-CGGTTAGTCCAGATCTATCCAGC-3'; for *afeR*, 5'-

CATATGGCGTCCGAAATGGCGCGT-3' and 5'-AGGTCAACATGCCGCC CATC-3'; and for *orf3*, 5'-CGGACAAAAGATGCACCAGA-3' and 5'-GGTA GCCTGTTCTTATCCGA-3'. The RT step was carried out with 1 μ g of DNase I-treated total RNA. PCRs were done using 3 μ l and 5 μ l of the *afeI* and *afeR* RT reaction mixtures, respectively. The following program was used to perform the PCRs: an initial denaturation step of 95°C for 3 min; 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C; and a final extension step of 72°C for 3 min. For each RT-PCR experiment, a control RT reaction without reverse transcriptase was carried out to check for the absence of genomic DNA contamination in the RNA preparations used. RT-PCR products were checked by electrophoresis in a 1% agarose gel in 0.5 \times Tris-acetate-EDTA buffer.

Macroarray analysis. Macroarray production was performed manually by using the colony copier VP381 (V&P Scientific). The PCR products were printed onto Immobilon-NY⁺ membranes (Millipore). The different steps for expression analysis were performed as described previously (1). The *afeI* and *afeR* genes were amplified with the following oligonucleotide pairs: 5'-CATATGCAGGT ATAACCGGCCA-3' and 5'-CGGTTAGTCCAGATCTATCCAGC-3' for the *afeI* gene and 5'-CATATGGCGTCCGAAATGGCGCGT-3' and 5'-CGAT CACGACAGCAACCGAGCA-3' for the *afeR* gene. Exposed PhosphorImager screens were scanned with a PhosphorImager (Molecular Imager FX Systems, Bio-Rad) at a resolution of 50 μ m/pixel. To normalize and quantify the results, we used a "spiked" RNA (*exp-1* of *Prunus persica*) as an internal control for the labeling reaction and hybridization steps.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequence of the *afeIR* locus has been deposited in the EMBL database under accession number no. AJ879454.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of AHLs produced by *A. ferrooxidans*. Extracts obtained from the media of grown cultures were analyzed with a bioassay in solid medium using the following two reporter strains: *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), which is specific for AHLs having medium and long acyl chains; and *Chromobacterium violaceum* CV026, which is specific for AHLs having short acyl chains and is inhibited by long-chain AHLs. No positive results were obtained with *C. violaceum*, while the bioassays with NTL4(pZLR4) revealed the characteristic formation of a blue halo (not shown). This screening procedure showed that *A. ferrooxidans* produces AHLs with medium and/or long acyl chains. To determine precisely the chemical structure of the AHLs synthesized, the extracts were analyzed by LC-MS-MS.

The dichloromethane extracts obtained from *A. ferrooxidans* grown in different media contained AHLs with diverse C-3 substitutions and only even numbers of carbons in the acyl chain. 3-Hydroxy-C₁₀, 3-hydroxy-C₁₂, 3-hydroxy-C₁₄, and 3-hydroxy-C₁₆-AHLs were present in iron-grown cells; C₁₂, C₁₄, 3-oxo-C₁₂, 3-oxo-C₁₄, 3-hydroxy-C₈, 3-hydroxy-C₁₀, 3-hydroxy-C₁₂, 3-hydroxy-C₁₄, and 3-hydroxy-C₁₆-AHLs were present in sulfur-grown cells; and C₁₂, C₁₄, 3-oxo-C₁₂, 3-oxo-C₁₄, 3-hydroxy-C₈, 3-hydroxy-C₁₀, 3-hydroxy-C₁₂, 3-hydroxy-C₁₄, and 3-hydroxy-C₁₆-AHLs were present in thiosulfate-grown cells (Table 1). In our experimental conditions, *A. ferrooxidans* was able to produce nine different kinds of AHLs which included all the known types of C-3 substitutions (oxo and hydroxyl), and all of them had medium or long acyl chains with an even number of carbons. For the five types of 3-hydroxy-AHL and independent of the medium, the large acyl chains with 12 or 14 carbons were the predominant forms.

To determine whether some of these AHLs were produced in a cell density-dependent manner, as the quorum sensing paradigm requires, the presence of these compounds was analyzed in the three media obtained from *A. ferrooxidans* cul-

TABLE 1. Identification of the different AHLs produced by *A. ferrooxidans*^a

Substrate	AHL		oxo-AHL		hydroxy-AHL			
	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₂	C ₁₄	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄
Iron	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+
Sulfur	+	+	+	T	+	+	+	+
Thiosulfate	+	+	+	T	+	+	+	+

^a C₈, R—CH₃(CH₂)₆; C₁₀, R—CH₃(CH₂)₈; C₁₂, R—CH₃(CH₂)₁₀; C₁₄, R—CH₃(CH₂)₁₂; ND, not detected; T, trace.

tures in the early exponential and early stationary growth phases. Of the nine AHLs synthesized in *A. ferrooxidans* grown in sulfur medium, only two (C₁₂-AHL and C₁₄-AHL) showed a detectable increase in the early stationary phase (Fig. 1, inset). Similar results were obtained with C₁₂-AHL and 3-hydroxy-C₈, C₁₀, and C₁₂-AHLs in thiosulfate medium (results not shown). On the other hand, in iron medium, the 3-hydroxy-AHL levels appeared to be low and constant (result not shown).

It is commonly accepted that AHL synthases can synthesize more than one type of AHL. Some *Rhizobium* spp. produce high numbers of AHLs by using AHL synthase-encoding genes located in the bacterial chromosome and/or plasmids (16). On the other hand, the AHL synthase SinI from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 is able to synthesize five different kinds of AHLs which involve different types of C-3 substitutions, a monounsaturated acyl chain, and the largest characterized acyl chain (C₁₈) (16).

Family I proteins catalyze the synthesis of AHLs from both substrates, S-adenosylmethionine (SAM) and acylated acyl carrier protein (acyl-ACP). In addition to the putative structural specificity of each AHL synthase, the capacity to synthesize different kinds of AHLs has been associated with the available pool of acyl-ACP substrates in each microorganism (47). Recently, for *Erwinia* sp., it has been postulated that growth conditions could also affect the acyl-ACP availability (8). This could explain why C₁₂- and C₁₄-AHLs and oxo-C₁₂- and oxo-C₁₄-AHLs were produced only in sulfur- and thiosulfate-grown cells. However, the way in which the energy source (iron versus sulfur or thiosulfate) could affect the nature of the AHLs is still unknown, since no information relating external acidic pH, energy metabolism, and cell wall metabolism is currently available for *A. ferrooxidans*. Therefore, the nature of the pool of acyl-ACPs in *A. ferrooxidans* is unknown. Our results are the first results to suggest that hydroxy-acyl-ACPs with medium and large acyl chains are present in *A. ferrooxidans* irrespective of the energy source. With regard to the second precursor, little is known about sulfur metabolism and the related pool of SAM in bacteria living under extreme conditions, such as acid pH. Recently, it was suggested that *A. ferrooxidans* could regulate sulfur assimilation in a manner comparable to the manner described for other bacteria (43). Since the first step in sulfur assimilation corresponds to sulfate uptake, the pool of SAM in *A. ferrooxidans* should depend on sulfate availability. Sulfate is present at high concentrations in

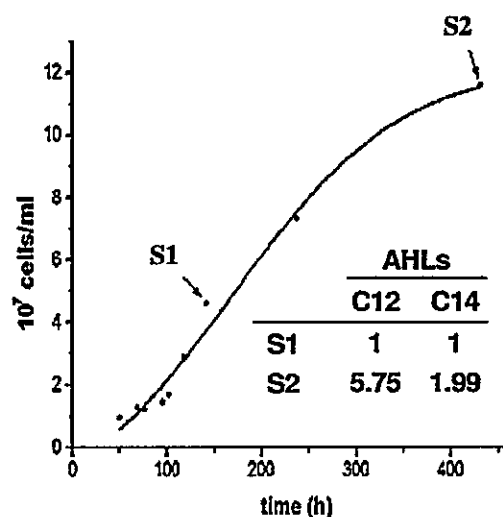


FIG. 1. Production of acyl-AHLs by *A. ferrooxidans* cells grown in sulfur. The correlation between growth phase and AHL amount was analyzed. AHLs were extracted from the culture medium with dichloromethane during the early exponential (S1) and stationary (S2) phases. The relative quantities of the large-acyl-chain AHLs produced are shown in the inset.

all the different media used to grow *A. ferrooxidans*, and it cannot be assumed that sulfate is a limiting factor. Therefore, AHL synthesis could not be affected under the three growth conditions that we employed.

Identification and characterization of AfeI, a LuxI homolog. Some bacteria possess various loci involved in AHL synthesis (16, 20, 49). On the other hand, three AHL synthase families have been characterized (16). To determine how many loci for AHL production were present in the genomic sequence of *A. ferrooxidans* ATCC 23270, a search for ORFs encoding AHL synthases was performed. The amino acid sequences of LuxI (accession no. AAA27552) and AinS (AAP33508) from *Vibrio fischeri* and HdtS (AAG30826) from *Pseudomonas fluorescens*, which belong to the known AHL synthase families 1, 2, and 3, respectively (16), were used as queries in the tblastn search.

Orthologs were found only for AHL synthases belonging to families 1 and 3. The first gene coded for a putative protein with 53% similarity to HdtS, the first identified member of the third AHL synthase family. In *P. fluorescens*, HdtS directs the synthesis of three AHLs, C₆-AHL, C₁₀-AHL, and N-(3-hydroxy-7-*cis*-C₁₄)-AHL (25).

The second gene coded for a protein that is 64% similar to protein BveI from *Burkholderia cepacia*, a member of the LuxI family. The deduced protein of *A. ferrooxidans* was designated AfeI, and it had 183 amino acids, a molecular mass of 19.9 kDa, and a theoretical isoelectric point of 5.77. Based on the recently solved structure of the LasI protein of *P. aeruginosa* (17), we constructed an AfeI model structure (Fig. 2). Our modeling approach took advantage of the higher level of similarity between AfeI and LasI (56%) (Fig. 2A). The amino acid sequence of AfeI revealed the presence of a threonine residue (Fig. 2A) which is involved in the oxo-C₃ substitution in the AHLs synthesized by LuxI, EsaI, and LasI of *V. fischeri*, *Pantonea stewartii* subsp. *stewartii*, and *P. aeruginosa*, respectively

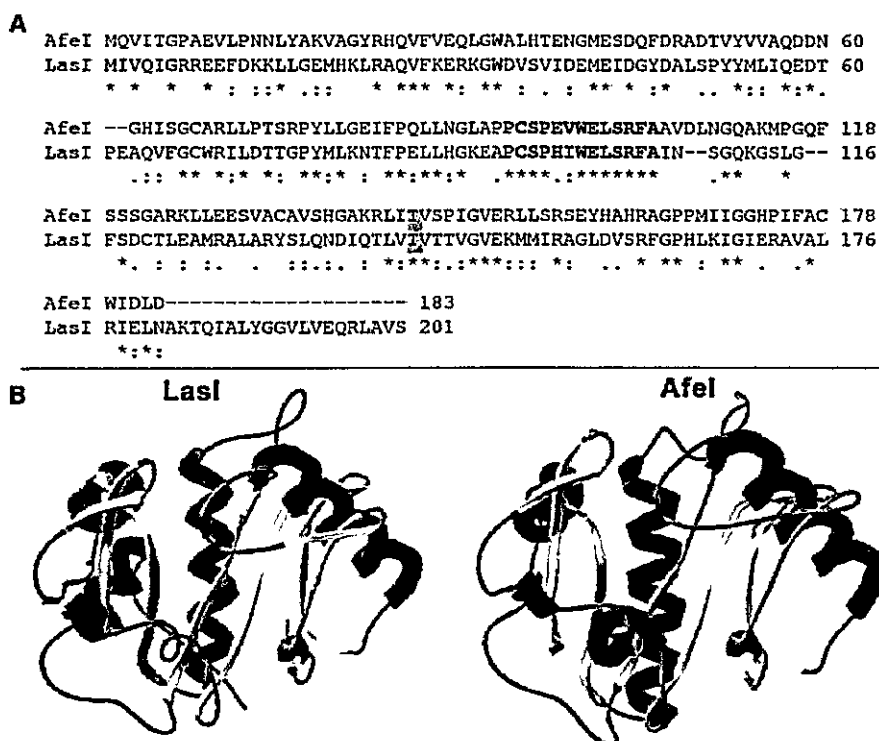


FIG. 2. Structure modeling of AfeI. (A) LasI and AfeI amino acid sequence alignment used for homology modeling. Boldface type indicates the most conserved region in the two proteins. Identical residues are indicated by asterisks, and similar residues are indicated by colons. A residue involved in oxo substitution (47) is indicated by a gray box. (B) AfeI modeled structure (right) based on LasI solved structure (left).

(47). In agreement with this, we also characterized oxo-AHLs in the growth media of *A. ferrooxidans*. The highest three-dimensional profile score yielded an AfeI structure model with high structural similarity to the LasI structure (Fig. 2B).

To confirm that the *afeI* gene product was an AHL synthase, *afeI* was overexpressed in an *E. coli* strain which does not produce AHLs. The *afeI* gene was cloned in plasmid pCRT7-NT-TOPO and transformed into the *E. coli* BL21(DE3) strain. The recombinant strain was induced with 0.4 M isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 1 h, and the media of the induced bacteria were extracted with dichloromethane and analyzed by LS-MS-MS (Fig. 3). C_{12} -AHL and C_{14} -AHL (Fig. 3A) and five different hydroxy-AHLs (C_8 , C_{10} , C_{12} , C_{14} , and C_{16}) (Fig. 3B) were characterized, while in the control *E. coli* strain carrying the same vector without the insert no AHLs were found (results not shown). The more abundant hydroxy-AHLs were C_{10} , C_{12} , and C_{14} , in agreement with the results obtained for *A. ferrooxidans* cells. This result definitively confirmed that AfeI is an AHL synthase able to synthesize AHLs and hydroxy-AHLs with large acyl chains (including C_{16}), depending on the available pool of acyl-ACPs. No other homoserine lactone synthase-encoding gene (except the *hds*-like gene, whose function in the quorum-sensing pathway is still unknown) was identified in the available genome sequence of *A. ferrooxidans*. In *S. meliloti*, the AHL synthase SinI is responsible for the synthesis of a series of long-chain AHLs ranging in size from C_{12} -AHL to C_{18} -AHL, including some oxo-AHLs and a monounsaturated AHL (16). Therefore, we concluded

that AfeI could be responsible for the synthesis of various long-chain AHLs in *A. ferrooxidans*.

Organization and transcription of the *afeI-afeR* locus. At a position 746 bp downstream of the *afeI* gene and in the opposite orientation, we found an ORF which exhibited 59% similarity to BviR, an R protein family member from *B. cepacia*. The deduced protein was designated AfeR and had 214 amino acids, a molecular mass of 23.7 kDa, and an isoelectric point of 9.89. Despite the low level of amino acid identity with TraR (less than 25%), we constructed a protein structure model for AfeR, which was very similar to the TraR structure (results not shown). The high level of structural similarity between the two proteins strongly suggests that AfeR is a transcriptional regulator of the R protein family, and, most likely, it acts in a dimeric form by recognizing *lux*-type boxes. A third ORF designated *orf3* was identified in the *afeIR* intergenic region. *orf3* had the same orientation as *afeI*, and it coded for a protein with 51% similarity to a hypothetical protein from *B. cepacia* R18194. The corresponding genes (*afeI*, *orf3*, and *afeR*) formed the *A. ferrooxidans* quorum-sensing locus (*afeIR*) shown in Fig. 4A. Despite the fact that *A. ferrooxidans* is a γ -proteobacterium, higher similarity scores for AfeI and AfeR (69% and 66%, respectively) were obtained with the genomic data for other members of the *Burkholderiaceae* belonging to the β -proteobacterial subdivision. This is in agreement with the idea of coevolution and acquisition of the *IR* regulatory cassettes by horizontal transmission (18).

Intergenic sequence analysis of the *afeIR* locus revealed two

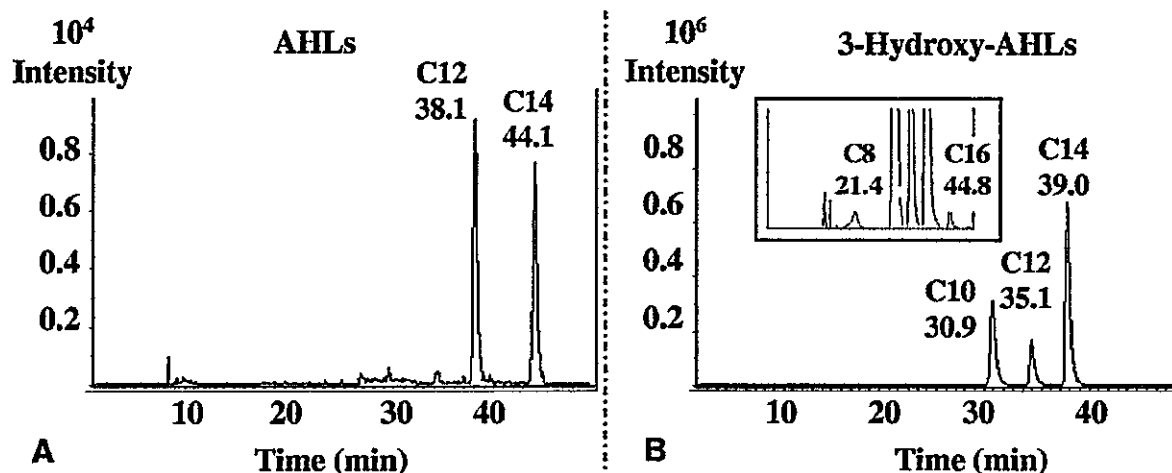


FIG. 3. Characterization of the AHLs produced by AfeI in *E. coli* carrying the *afeI* gene. *E. coli* transformed with plasmid pCRT7-NT-TOPO with the *afeI* gene was grown in LB medium. After the cells were removed, the growth medium was extracted with dichloromethane, and the presence of AHLs was analyzed by LS-MS-MS. The different MS-MS spectra of the selected ion m/z 102, which is specific for the lactone ring of the homoserine lactone, are shown. AHLs (A) and hydroxy-AHLs (B) were characterized. The large amounts of hydroxy- C_{10} , hydroxy- C_{12} , and hydroxy- C_{14} -AHLs (B) made it necessary to present this spectrum with two different intensity scales (10^6 for the common size and 10^4 for the inset). The designation of each AHL and the different elution times are indicated in each spectrum.

palindromic sequences, PS1 and PS2 (Fig. 4A). PS2 was located 36 bp upstream of *orf3* and 168 bp from *afeR*, and its function is unknown. The analysis of the PS1 sequence revealed a hierarchical organization (Fig. 4B). Each arm of the 30-bp palindromic sequence could be subdivided into two identical palindromic sequences whose sizes (15 bp) were similar to that of the known *lux* box. The nucleotide sequences of the two *afe* boxes were identical except for the three central bases (Fig. 4B), suggesting that these bases are not essential for AfeR binding but could play a role as a physical spacer for the binding of the dimeric form of AfeR. In the 3' end of each *afe* box, a purine base was conserved. In addition, each *afe* box could be sufficient to bind a dimeric form of AfeR, as suggested by the modeling of the (AfeR)₂-*afe* box complex based on the (TraR-AHL)₂-DNA structure data (not shown). We designated these boxes *afe* box 1 and *afe* box 2 (Fig. 4B) since they could correspond to the typical type AI-1 QS regulator binding sites located close to a putative -35 transcriptional site and could play roles similar to those of *lux* and *tra* boxes (15, 48).

To study if the *afeIR* locus was functional in *A. ferrooxidans*, gene expression was analyzed by RT-PCR. Total RNA was prepared from planktonic cells of *A. ferrooxidans* grown in thiosulfate medium. The results clearly showed that *afeI*, *orf3*, and *afeR* were expressed in *A. ferrooxidans* (Fig. 4C). Nevertheless, in our experimental conditions *orf3* and *afeI* were not cotranscribed.

As the AHLs produced in the presence of iron, sulfur, or thiosulfate were different (Table 1), we analyzed the transcription levels of the *afeI* gene in the different media in DNA macroarray experiments. The *afeI* transcription levels in thiosulfate and sulfur media were similar. Compared to iron-grown cells, transcription of the *afeI* gene was increased 19- and 18-fold in sulfur- and thiosulfate-grown cells, respectively (Table 2). In iron medium, the transcription level was very low. This could explain the lack of detection of C_{12} - and C_{14} -AHLs

and oxo- C_{12} - and oxo- C_{14} -AHLs (Table 1). Interestingly, the increase in the transcription levels of the *afeI* gene was not related to the transcription levels of *afeR* since the expression of this gene did not change when iron- and sulfur-grown cells were compared (results not shown).

To highlight the *afe* box function, the 5' end of the *afeI* gene transcript was determined by primer extension analysis with RNA samples prepared from *A. ferrooxidans* cells grown in thiosulfate as the energy source. Two transcriptional initiation sites were determined with oligonucleotide AfeIRT2 (Fig. 4D). The first site had a double transcription initiation site (G and A), while the second site had a single transcription initiation site (A) (Fig. 4B). The two transcription initiation sites were located 17 or 18 bp and 28 bp, respectively, upstream of the translational start codon of *afeI* (Fig. 4B). An *E. coli* σ^{70} -type promoter (5'-TTGTCA-16 bp-TAGATT-3') was identified and correctly positioned upstream of the second transcription initiation sites (Fig. 2B). As observed for the *lux* and *tra* boxes, *afe* box 1 overlapped the -35 transcriptional region determined (Fig. 4B).

Based on the *lux* box-*tra* box models, we decided to investigate the presence of the *afe* boxes (Fig. 4B) in the entire genome sequence of the ATCC 23270 strain. By using hidden Markov models constructed with the HMMER v2.3.2 software (14), we characterized various putative *afe* boxes (not shown). However, our results are preliminary results which only suggest the existence of a quorum-sensing regulon in *A. ferrooxidans*. Proteomic and transcriptomic studies like those performed with other bacteria (*P. aeruginosa*, *B. cepacia* H111, and *S. meliloti*) should help demonstrate the existence of a QS regulon in *A. ferrooxidans* (5, 10, 30, 35, 38, 46).

Phosphate starvation activates transcription of *afeI*. Different results have revealed that type AI-1 QS influences exopolysaccharide production and biofilm formation in many proteobacteria (16, 21, 24, 49), and phosphate and polyphosphate metabolism has been linked to biofilm formation and the quo-

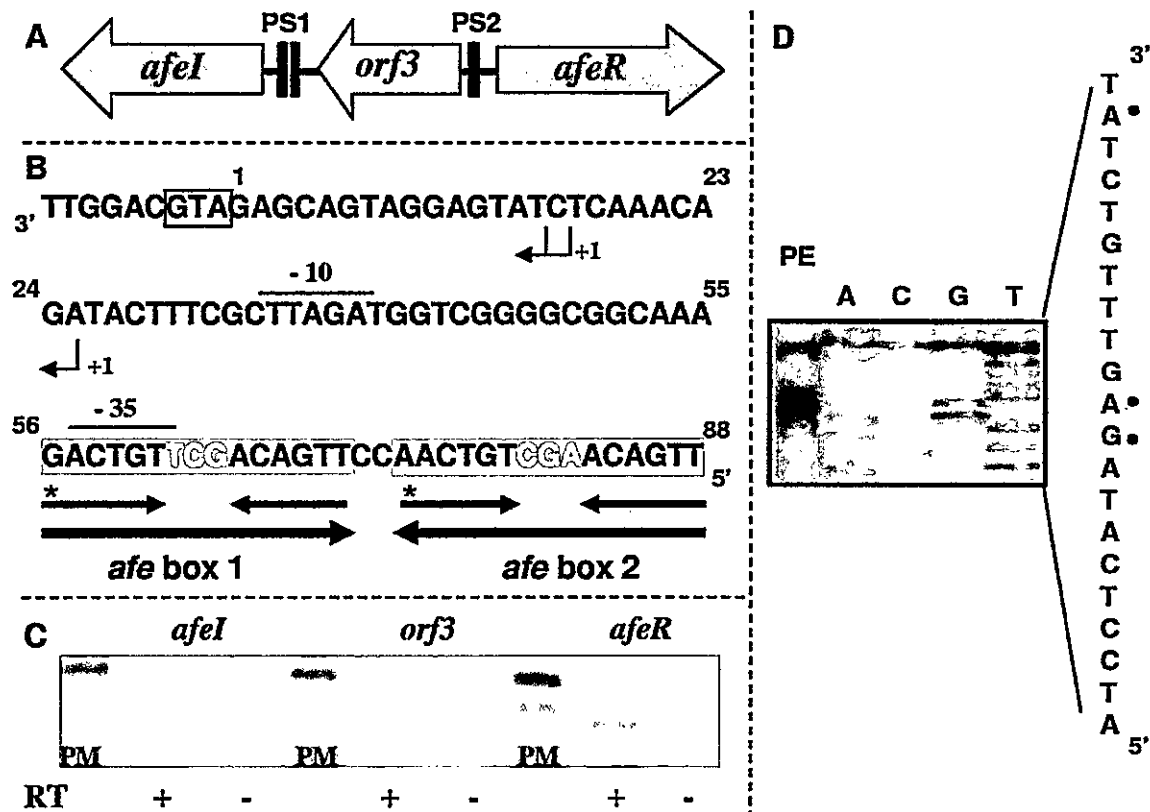


FIG. 4. Quorum-sensing genetic locus of *A. ferrooxidans*. (A) Schematic map of the quorum-sensing locus of *A. ferrooxidans* composed of three genes: *afeR* encoding the transcriptional regulator, *afeI* encoding the AHLs synthase, and *orf3* having an unknown function. Two palindromic sequences (PS1 and PS2) were located (solid boxes). (B) Nucleotide sequence of the putative *afe* boxes. The large palindromic sequence (PS1) was conformed by a 32-bp palindromic sequence (large arrows) which was built over internal, hierarchical and smaller palindromic sequences (small arrows) called *afe box 1* and *afe box 2*. The box at the 3' end indicates the translational start codon for *afeI*. +1 indicates the transcriptional initiation sites identified; overlining indicates the *E. coli* σ^{70} -type promoter; and asterisks indicate the purine base transition at the 3' ends of the *afe* boxes. (C) Transcription analysis of the quorum-sensing genetic locus by RT-PCR analysis. RT reactions were carried out with 1 μ g of total RNA from thiosulfate-grown *A. ferrooxidans* cells and were performed with (+) and without (-) the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in order to exclude amplification due to genomic DNA contamination. RT-PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. (D) Determination of transcriptional initiation sites for the *afeI* gene by a primer extension experiment. The relevant DNA sequence (complementary to the sequence shown in panel B between nucleotides 8 and 27) is shown on the right, and the positions of the possible start sites are indicated by solid dots.

rum-sensing regulatory pathway (26, 33, 40). On the other hand, in *Serratia* sp. strain ATCC 39006, mutation of the *pstS* gene, which belongs to the Pho regulon and whose product is part of a high-affinity phosphate transporter, mimicked phosphate limitation and caused a three- to fourfold increase in transcription of the AHL synthase-encoding gene (*smal*) of *Serratia* type AI-QS (40).

During bioleaching *A. ferrooxidans* adheres to solid sub-

strates by means of extracellular polymeric substances, such as exo- or lipopolysaccharides, and develops biofilm structures during the cellular adhesion process (7, 13, 22, 36). Previous immunological results have demonstrated that the amounts of lipopolysaccharides which are part of the polysaccharide matrix involved in ore colonization are increased in phosphate-starved *A. ferrooxidans* cells (3), and a *pho* regulon has been described in *A. ferrooxidans* (45). Therefore, the effect of phosphate starvation on the transcription of the *afeI* gene was investigated by using a DNA macroarray analysis.

Transcription of the *afeI* gene was increased 20-fold when *A. ferrooxidans* cells were cultured in a low-phosphate medium ($-P_i$ medium; P_i concentration, 0.22 mM) compared to a high-phosphate medium ($+P_i$ medium; P_i concentration, 22 mM) (Table 3). The overexpression of the *afeI* gene in phosphate-starved cells was directly correlated with increases in the C_{12} -AHL, C_{14} -AHL, and hydroxy-AHL levels (Table 3). These results are in agreement with those obtained with the *smal* gene of *Serratia* sp. (40). Therefore, the AfeIR quorum-sensing

TABLE 2. Effect of the energy source on the transcription levels of the *afeI* gene

	Medium		
	Iron	Sulfur	Thiosulfate
<i>afeI</i> spot intensity ^a	0.68	13.22	12.49

^a Relative intensity.

TABLE 3. Effect of the phosphate starvation on *afeI* expression and AHL synthesis in thiosulfate-grown cells

	+ Pi	- Pi
<i>afeI</i> spot intensity ^a	7.57	152.52
C ₁₂ -AHL	1	5.01
C ₁₄ -AHL	1	3.39
Hydroxy-AHL ^b	1	2.31

^a Relative intensity.

^b Average values including hydroxy-C₁₀, hydroxy-C₁₄, and hydroxy-C₁₆-AHLs.

system appears to be modulated by P_i availability. Slater et al. (40) suggested that the expression of *smal* could be enhanced through the two-component regulatory system PhoR-PhoB. In *A. tumefaciens* phosphate-starved cells, biofilm formation is positively affected through the PhoR-PhoB regulatory pathway (11). Nevertheless, how these different regulatory levels are related and affect biofilm formation in *A. ferrooxidans* is still an open question.

Recently, preliminary evidence for the occurrence of homoserine lactone signal production in archaea has been reported (31). Some biominer microorganisms, such as *Ferroplasma* type II and *Lepotspirillum ferrooxidans* type II, are also able to form a natural and mixed acidophilic biofilm (42). Therefore, the existence of an AHL communication system in *A. ferrooxidans* and its impact on the biofilm structure and abundance of bacteria and archaea in biominer microbial communities are very relevant.

Obviously, further studies with *A. ferrooxidans* are necessary (i) to determine if AfeR is a positive transcriptional regulator or negative transcriptional regulator or both, as in the case of AhyR of *Aeromonas hydrophila* (23), (ii) to understand the biological significance of both *afe* boxes upstream of the *afeI* gene, (iii) to understand the role of the product of the *orf3* gene, and (iv) to identify all the genes which form the quorum-sensing regulon. Since no genetic transfer techniques are currently available for *A. ferrooxidans*, strategies using *afeI* mutants or any kind of gene cloning are not possible. However, the use of proteomic and transcriptomic analyses of mimicked null mutants obtained with quorum-sensing inhibitors (9) should be a successful global approach for identification of all the components of the quorum-sensing regulon in *A. ferrooxidans*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Universidad de Chile (DID I-02/4-2), Fundación Andes, and FONDECYT (1040676).

We thank Juan Gonzalez, who kindly provided the reporter strains. We acknowledge Bruce Cassel's laboratory for assistance with acyl-AHL extract preparation. We thank Francisco Chavez and Simon Beard for critical reading of the manuscript and experimental support, respectively. We acknowledge Juan-Carlos Mobarec for structure modeling. Sequence data for *A. ferrooxidans* strain ATCC 23270 were obtained from the NCBI microbial genome site.

REFERENCES

- Acosta, M., S. Beard, J. Ponce, M. Vera, J. C. Mobarec, and C. A. Jerez. 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.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Amaro, A. M., M. Seeger, R. Arredondo, M. Moreno, and C. A. Jerez. 1993. The growth conditions affect *Thiobacillus ferrooxidans* attachment to solids, p. 577-585. In A. E. Torma, M. L. Apel, and C. L. Brierley (ed.), *Biohydrometallurgical technologies*. The Minerals, Metals and Material Society, Warrendale, Pa.
- Amaro, A. M., D. Chamorro, M. Seeger, R. Arredondo, I. Peirano, and C. A. Jerez. 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173:910-915.
- Arevalo-Ferro, C., M. Hentzer, G. Reil, A. Gorg, S. Kjellevberg, M. Givskov, K. Riedel, and L. Eberl. 2003. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ. Microbiol.* 5:1350-1369.
- Bassler, B. 2002. Small talk: cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* 109:421-424.
- Blais, J., R. Tyagi, N. Meunier, and J. Auclair. 1994. The production of extracellular appendages during bacterial colonization of elemental sulphur. *Process Biochem.* 29:475-482.
- Brader, G., S. Sjoblom, H. Hyytiainen, K. Sims-Huopaniemi, and E. T. Palva. 2005. Altering substrate chain length specificity of an acylhomoserine lactone synthase in bacterial communication. *J. Biol. Chem.* 280:10403-10409.
- Castang, S., B. Chantegrel, C. Deshayes, R. Dolmazon, P. Gouet, R. Haser, S. Reverchon, W. Nasser, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, and A. Doutheau. 2004. *N*-Sulfonyl homoserine lactones as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:5145-5149.
- Chen, H., M. Teplitski, J. B. Robinson, B. G. Rolfe, and W. D. Bauer. 2003. Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J. Bacteriol.* 185:5029-5036.
- Danhorn, T., M. Hentzer, M. Givskov, M. R. Parsek, and C. Fuqua. 2004. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *J. Bacteriol.* 186:4492-4501.
- Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. II. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280:295-298.
- DiSpirito, A., M. Silver, L. Voss and, O. Tuovinen. 1982. Flagella and pili of iron-oxidizing thiobacilli isolated from uranium mine in northern Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1196-1200.
- Eddy, S. R. 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14:755-763.
- Fuqua, W. C., and S. Winans. 1996. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes *J. Bacteriol.* 178:435-440.
- Gonzalez, J. E., and M. M. Marketon. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:574-592.
- Gould, T. A., H. P. Schweizer, and M. E. Churchill. 2004. Structure of the *Pseudomonas aeruginosa* acyl-homoserine lactone synthase LasI. *Mol. Microbiol.* 53:1135-1146.
- Gray, K., and J. Garey. 2001. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* 147:2379-2387.
- Guiliani, N., A. Bengrine, F. Borne, M. Chippaux, and V. Bonnefoy. 1997. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* 143:2179-2187.
- Henke, J. M., and B. L. Bassler. 2004. Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol.* 14:648-656.
- Huber, B., K. Riedel, M. Hentzer, A. Heydorn, A. Gotschlich, M. Givskov, S. Molina, and L. Eberl. 2001. The *cep* quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* HI11 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* 147:2517-2528.
- Karamanev, D. 1991. Model of the biofilm structure of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* 20:51-64.
- Kirke, D. F., S. Swift, M. J. Lynch, and P. Williams. 2004. The *Aeromonas hydrophila* LuxR homologue AhyR regulates the *N*-acyl homoserine lactone synthase, AhyI, positively and negatively in a growth phase-dependent manner. *FEMS Microbiol. Lett.* 241:109-117.
- Labbate, M., S. Y. Queck, K. S. Koh, S. A. Rice, M. Givskov, and S. Kjellevberg. 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 186:692-698.
- Laue, B. E., Y. Jiang, S. R. Chhabra, S. Jacob, G. S. Stewart, A. Hardman, J. A. Downie, F. O'Gara, and P. Williams. 2000. The biocontrol strain

- Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* 146:2469-2480.
26. Ledgham, F., C. Soccia, A. Chakrabarty, A. Lazdunski, and M. Foglino. 2003. Global regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: the regulatory protein AlgR2 (AlgQ) acts as a modulator of quorum sensing. *Res. Microbiol.* 154:207-213.
 27. Lüthy, R., J. U. Bowie, and D. Eisenberg. 1992. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356:83-85.
 28. Marti-Renom, M. A., A. C. Stuart, A. Fiser, R. Sánchez, F. Melo, and A. Sali. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:291-325.
 29. Morin, D., B. Grasland, K. Vallee-Rehel, C. Dufau, and D. Haras. 2003. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of N-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr. A* 1002: 79-92.
 30. Nouwens, A. S., S. A. Beatson, C. B. Whitchurch, B. J. Walsh, H. P. Schweizer, J. S. Mattick, and S. J. Cordwell. 2003. Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the *las* and *rhl* quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 149:1311-1322.
 31. Paggi, R. A., C. B. Martone, C. Fuqua, and R. E. De Castro. 2003. Detection of quorum sensing signals in the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus occultus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 221:49-52.
 32. Ramirez, P., N. Guilian, L. Valenzuela, S. Beard, and C. A. Jerez. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4491-4498.
 33. Rashid, M. H., K. Rumbaugh, L. Passador, D. G. Davies, A. N. Hamood, B. H. Iglewski, and A. Kornberg. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:9636-9641.
 34. Rawlings, D. E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:65-91.
 35. Riedel, K., C. Arevalo-Ferro, G. Reil, A. Gorg, F. Lottspeich, and L. Eberl. 2003. Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics. *Electrophoresis* 24:740-750.
 36. Rohwerder, T., T. Gehrke, K. Kinzler, and W. Sand. 2003. Bioremediation review part A: progress in bioremediation: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:239-248.
 37. Sambrook, J., and D. W. Russell. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 38. Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi, and E. P. Greenberg. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185:2066-2079.
 39. Shaw, P. D., G. Ping, S. L. Daly, C. Cha, J. E. Cronan, Jr., K. L. Rinehart, and S. K. Farrand. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6036-6041.
 40. Slater, H., M. Crow, L. Everson, and G. P. Salmond. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol. Microbiol.* 47:303-320.
 41. Tatusova, T. A., and T. L. Madden. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 174: 247-250.
 42. Tyson, G. W., J. Chapman, P. Hugenholtz, E. E. Allen, R. J. Ram, P. M. Richardson, V. V. Solovyev, E. M. Rubin, D. S. Rokhsar, and J. F. Banfield. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:37-43.
 43. Valdes, J., F. Veloso, E. Jedlicki, and D. Holmes. 2003. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics* 4:51.
 44. Vannini, A., C. Volpari, C. Gargioli, E. Muraglia, R. Cortese, R. De Francesco, P. Neddermann, and S. Marco. 2002. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J.* 21:4393-4401.
 45. Vera, M., N. Guilian, and C. A. Jerez. 2003. Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 71:125-132.
 46. Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks, and B. H. Iglewski. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185:2080-2095.
 47. Watson, W. T., T. D. Minogue, D. L. Val, S. B. von Bodman, and M. E. Churchill. 2002. Structural basis and specificity of acyl-homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol. Cell* 9:685-694.
 48. Whitehead, N., A. Barnard, H. Slater, N. Simpson, and G. Salmond. 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:365-404.
 49. Winans, S., and B. Bassler. 2002. Mob psychology. *J. Bacteriol.* 184:873-883.
 50. Zhang, R., T. Pappas, J. Brace, P. Miller, T. Oulmasov, J. Molyneaux, J. Anderson, J. Bashkin, S. Winans, and A. Joachimiak. 2002. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* 417:971-974.