

UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“DETERMINANTES DE RESISTENCIA A COBRE  
PRESENTES EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*”**

**Tesis entregada a la Universidad de Chile  
para optar al Grado de Doctor en Bioquímica**

**RODRIGO JAVIER ALMÁRCEGUI ZAMORANO**

**Director de Tesis**

**Dr. Carlos A. Jerez Guevara**

**SANTIAGO-CHILE  
2014**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**

**Tesis de Doctorado**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

**RODRIGO JAVIER ALMÁRCEGUI ZAMORANO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día:

**Director de Tesis:**

Dr. Carlos A. Jerez G.

\_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora:**

Dr. Mauricio González (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dra. Inés Contreras

\_\_\_\_\_

Dr. Omar Orellana

\_\_\_\_\_

Dr. Claudio Vásquez

\_\_\_\_\_

Esta Tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1110214 y en parte por el proyecto ICM P-05-001, Beca de apoyo de tesis doctoral AT24090138, y ha dado origen a las siguientes comunicaciones y publicaciones durante el período de ejecución de la tesis.

### **Presentaciones en congresos científicos**

#### **Almárcegui R., Jerez CA.**

Identificación de proteínas de membrana que participen en la resistencia a cobre en *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

XXXI Congreso Chileno de Microbiología.

Hotel Santa Cruz, Santa Cruz, Chile, Diciembre del 2009.

#### **Almárcegui R., Jerez CA.**

Novel cell envelope proteins related to copper resistance in *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

20th International Biohydrometallurgy Symposium (IBS2013).

GECAMIN, Conferences for Mining.

Hotel Enjoy del desierto, Antofagasta, Chile, Octubre 2013.

### **Artículos científicos**

Rodrigo J. Almárcegui., Claudio A. Navarro., Alberto Paradela., Juan P. Albar., Diego Von Bernath., Carlos A. Jerez.

New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a Quantitative proteomic analysis.

Journal of Proteome Research, 13 : pag 946-960, 2014.

Rodrigo Almárcegui, Claudio Navarro, Alberto Paradela, Diego Von Bernath, Carlos A. Jerez.

Novel cell envelope proteins related to copper resistance in *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Advanced Material Research , 825 : pag 206-209, 2013.

Rodrigo J. Almárcegui., Claudio A. Navarro., Alberto Paradela., Juan P. Albar., Diego Von Bernath., Carlos A. Jerez.

Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur.

Research of Microbiology, artículo enviado.

*Con voluntad de poder*

## **Agradecimientos**

A mis queridos padres y mi hermano Felipe quienes han estado siempre a mi lado. Gracias por el respaldo y comprensión.

A mi polola Paulina y su linda familia por su cariño.

Gracias a todos ellos por la paciencia, consejos, y entregarme el apoyo necesario 'para cumplir esta etapa. No existe nada en el mundo más importante para mí que cada uno de ustedes.

A mi director de Tesis el Dr. Carlos Jerez, por quien siento un gran cariño y admiración. Gracias Profesor Carlos por su tiempo, dedicación y por todo lo que me ha transmitido a través de su conocimiento y experiencia, fundamental en mi formación profesional.

A mis compañeros del laboratorio: Claudio Navarro, Matías Riveros, Diego Von Bernath y Cristóbal Martínez.

A quienes he conocido durante mi estadía en el laboratorio: Álvaro Orell, Cristóbal Córdova, Luis Orellana, Simón Beard, Daniela Soto, Cristian Varela, Fernando Pagliai, Cecilia Mauriaca, Felipe Gordillo, Francisco Chávez, Andrés Villa, Juan Pablo Weber, Sebastián Gallardo, Rodrigo Castillo, Camilo Valdivieso, Alejandro, Matías Castro y Nicolás Guiliani.

Gracias a todos por su conocimiento, apoyo, amistad y gratos momentos.

A Don Juanito por su cariño, apoyo y por prestarme su ayuda cada vez que la necesité. Gracias por hacer nuestro trabajo mucho más grato y simple.

A la comisión de Doctorado por sus valiosos aportes durante el desarrollo de mi Tesis.

Finalmente, agradezco a CONICYT y al posgrado de la Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas por financiar parte de mi Doctorado.

## ÍNDICE GENERAL

	Páginas
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>i</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. El cobre y su toxicidad en las células.....	1
1.2. Determinantes de resistencia a cobre en microorganismo procariontes.....	3
1.2.1. Eflujo de cobre a través de ATPasas de cobre.....	3
1.2.2. Oxidación del Cu periplasmático mediante CueO.....	6
1.2.3. Eflujo de cobre a través del sistema Cus.....	6
1.2.4. Genes plasmidiales relacionados con la homeostasis de cobre.....	8
1.3. Resistencia a cobre en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	10
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
3.1. Objetivo general.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
4.1. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo.....	16
4.2. Extracción de la fracción total de membranas.....	16
4.3. Preparación de las muestras de proteínas de membrana y su análisis por 2D-PAGE.....	17
4.4. Secuenciación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	18
4.5. Extracción del RNA total.....	19

4.6. Síntesis de cDNA.....	19
4.7. Diseño de partidores para PCR en tiempo real (qRT PCR), co-transcripción y clonamiento de genes de <i>A. ferrooxidans</i> .....	20
4.8. Análisis de la expresión de genes por PCR en tiempo real (qRT PCR).....	20
4.9. Experimentos de co-transcripción.....	22
4.10. Proteómica cuantitativa .....	22
4.10.1. Preparación del extracto de proteína total para análisis por ICPL.....	22
4.10.2. Preparación de la muestra para análisis por ICPL.....	23
4.10.3. Digestión proteica y marcaje para el ICPL.....	23
4.10.4. Análisis LC ESI-MS/MS 2D–Nano.....	24
4.10.5. Identificación de proteínas y análisis cuantitativo.....	25
4.11. Alineamiento de las secuencias con el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	27
4.12. Análisis funcional del gen AFE-1943 ( <i>dsbG-L</i> ) de <i>A. ferrooxidans</i> expresado en <i>Escherichia coli</i> .....	27
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
5.1. Cambio en los niveles de proteínas de membrana de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecidas con diferentes concentraciones de cobre, analizado por electroforesis bidimensional (IEF-SDS PAGE).....	29
5.2. Expresión de los genes que codifican para proteínas inducidas por la presencia de cobre.....	34
5.3. Función de DsbG-L en la resistencia a cobre en <i>E. coli</i> .....	40
5.4. Análisis de co-transcripción de genes.....	41
5.5. Cambios cuantitativos en el proteoma total de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecidos en azufre y en presencia de cobre 50 mM.....	42
5.6. Cambios cuantitativos en el proteoma total de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en hierro y en presencia de cobre 40 mM.....	46

<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>55</b>
6.1. Metabolismo y transporte de iones inorgánicos.....	56
6.1.1. Aumento de la síntesis de sistemas de eflujo del tipo RND.....	56
6.1.2. Represión de canales iónicos.....	62
6.1.3. Síntesis aumentada de proteínas que participarían en la unión y transporte de cationes.....	64
6.2. Producción y conversión de energía.....	65
6.2.1. Cambios en los niveles de proteínas que participan en la oxidación de hierro.....	65
6.2.2. Inducción de citocromos alternativos.....	67
6.2.3. Incremento en la biosíntesis de ubiquinonas.....	68
6.3. Metabolismo y transporte de carbohidratos y aminoácidos.....	69
6.3.1. Cambios en los niveles de RuBisCO.....	69
6.3.2. Síntesis de aminoácidos en presencia de cobre.....	71
6.4. Procesos celulares y señalización.....	73
6.4.1. Aumento de la defensa enzimática contra el estrés oxidativo.....	73
6.4.2. Reparación del daño oxidativo provocado por cobre.....	75
6.5. Motilidad celular y secreción.....	79
6.5.1. Posible incremento en la formación de biopelículas.....	79
6.5.2. Aumento en la secreción de proteínas con señal de exportación Tat.....	83
6.6. Biosíntesis de envoltura, membrana y pared celular.....	84
6.7. Mecanismos de traducción de señales.....	85
6.8. Proteínas no caracterizadas.....	87
6.9. Diferencias en la respuesta inducida por el cobre en <i>A. ferrooxidans</i> crecidos en hierro versus azufre.....	87
6.10. Visión general de la respuesta de resistencia a cobre en <i>A. ferrooxidans</i> .....	92
<b>7. CONCLUSIÓN</b> .....	<b>93</b>
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	<b>94</b>
<b>9. ANEXO</b> .....	<b>106</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Oligonucleótidos.....	21
TABLA 2. Identificación de las manchas aisladas de los geles 2D-PAGE por MALDI TOF/TOF.....	33
TABLA 3. Resultados globales de las proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en azufre y cuantificados por ICPL.....	43
TABLA 4. Resultados globales de las proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en hierro y cuantificados por ICPL.....	46
TABLA 5. Proteínas aumentadas en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en azufre y en presencia de CuSO <sub>4</sub> 50 mM.....	49
TABLA 6. Proteínas disminuidas en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en azufre y en presencia de CuSO <sub>4</sub> 50 mM.....	50
TABLA 7. Proteínas incrementadas en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en hierro y en presencia de CuSO <sub>4</sub> 40 mM.....	51
TABLA 8. Proteínas disminuidas en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en hierro y en presencia de CuSO <sub>4</sub> 40 mM.....	53
TABLA 9. Algunas proteínas que cambian sus niveles en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en azufre o hierro y en presencia de CuSO <sub>4</sub> .....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Función general de CopA, una ATPasa tipo P translocadora de cobre.....	5
FIGURA 2. Sistema de eflujo de cobre CusCFBA.....	8
FIGURA 3. Mecanismo de resistencia a cobre en <i>Pseudomonas syringae</i> mediante determinantes CopABCD <sub>Ps</sub> .....	9
FIGURA 4. Contexto genético de los posibles determinantes de resistencia a cobre encontrados en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	12
FIGURA 5. Separación de las proteínas de la fracción total de membrana de <i>A.</i> <i>ferrooxidans</i> crecido en azufre en ausencia y presencia de CuSO <sub>4</sub> por 2D-PAGE.....	31
FIGURA 6. Separación de las proteínas de la fracción total de membrana de <i>A.</i> <i>ferrooxidans</i> crecidos en hierro en ausencia y presencia de CuSO <sub>4</sub> por 2D-PAGE.....	32
FIGURA 7. Expresión relativa de genes que codifican posibles sistemas de eflujo del tipo RND en células crecidas en azufre y en presencia de cobre .....	35
FIGURA 8. Expresión relativa de genes que codifican posibles proteínas de resistencia a cobre en células crecidas en azufre y en presencia de cobre .....	36
FIGURA 9. Expresión relativa de genes que codifican posibles sistemas de eflujo del tipo RND en células crecidas en hierro y en presencia de cobre .....	37
FIGURA 10. Expresión relativa de posibles genes que codifican proteínas de resistencia a cobre en células crecidas en hierro y en presencia de cobre .....	38
FIGURA 11. Expresión relativa de los genes AFE_1943 (DsbG-L), AFE_2947 y AFE_2246 de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecidas en presencia de cobre.....	39
FIGURA 12. Función de DsbG-L en la resistencia a cobre en <i>E. coli</i> .....	40
FIGURA 13. Co-transcripción de los genes del nuevo posible sistema del tipo RND.....	41
FIGURA 14. Categorías funcionales y número de proteínas que cambian sus niveles de síntesis en células crecidas en azufre y en presencia de cobre.....	45

FIGURA 15. Categorías funcionales y número de proteínas que cambian sus niveles de síntesis en células crecidas en hierro y en presencia de cobre.....	48
FIGURA 16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre las proteínas RND, CusA de <i>E. coli</i> , y AFE_1947 y AFE_1878 de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	61
FIGURA 17. Organización del operón <i>his</i> en <i>A. ferrooxidans</i> .....	71
FIGURA 18. Posible sistema de formación de puentes disulfuro de proteínas en el periplasma de <i>A. ferrooxidans</i> .....	76
FIGURA 19. Alineamiento de las secuencias de proteínas disulfuro isomerasas de <i>A. ferrooxidans</i> .....	77
FIGURA 20. Modelo de trabajo que muestra esquemáticamente algunas proteínas que cambian sus niveles en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 adaptados a crecer en presencia de cobre en diferentes sustratos oxidables.....	91

## **Abreviaturas**

ATP-BD: Dominio de unión de ATP

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EPS: Exopolisacáridos

FDR: Tasa de falsa detección

FPM: Fuerza protón motriz

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia

IEF: Isoelectroenfoque

IPG: Gradientes de pH inmovilizado

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NTP: Nucleótidos trifosfatados

OMP: Proteína de membrana externa

ORF: Marco abierto de lectura

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PTS: Sistema fosfotransferasa

RND: Resistencia, nodulación y división

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SPE: Sustancias poliméricas extracelulares

TBRD: Receptor dependiente de TonB

TCA: Ciclo del ácido tricarbóxico

TM: Transmembrana

TM-MBD: Dominio transmembrana de unión a metales

## Resumen

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria extremófila de gran importancia industrial debido a su participación en la recuperación de metales como cobre, oro y uranio en biominería. Esta bacteria puede resistir altas concentraciones de cobre y otros metales, característica fundamental para sobrevivir a las condiciones de la biolixiviación de minerales.

La presencia en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 de determinantes de resistencia a cobre canónicos (bombas de eflujo, chaperonas que unen cobre, etc) no explican completamente cómo esta bacteria resiste concentraciones de cobre extremas, sugiriendo la existencia de otros mecanismos de resistencia al metal.

Para identificar nuevos posibles determinantes de resistencia en este microorganismo, se evaluó los niveles de síntesis de proteínas por análisis proteómico por electroforesis bidimensional (IEF-SDS PAGE) y también se determinó los niveles de mRNA de algunos genes que codifican estos determinantes por PCR en tiempo real (qRT-PCR). Además, mediante proteómica cuantitativa por ICPL (isotope-coded protein labeling) se identificó 366 proteínas de las que 47 cambian sus niveles de síntesis en células crecidas en azufre en presencia de cobre, mientras que en hierro se identificó 594 proteínas de las que 120 cambian en presencia del metal. Mediante esta estrategia se identificó la sobreexpresión de proteínas de membrana que forman parte de un sistema Cus y un sistema de eflujo del tipo RND diferente en *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de cobre, sugiriendo un eflujo dinámico de cobre a través de las membranas. Además se observó la sobreexpresión de la mayoría de los genes involucrados en

la síntesis de histidina y de varios genes que participan en la síntesis de cisteína, indicando una posible función de estos aminoácidos que unen metales en la destoxificación del cobre intracelular. También se detectó el aumento en la síntesis de una posible disulfuro isomerasa periplasmática, indicando que esta proteína repararía puentes disulfuro dañados para permitir la supervivencia celular en condiciones de estrés. Por otro lado, se observó la represión de la porina de membrana externa más abundante de *A. ferrooxidans* (Omp40) y de otros canales iónicos, lo que sugiere una disminución del influjo del metal hacia el interior de la célula.

Finalmente, se identificó en *A. ferrooxidans* crecidos en azufre y en presencia de cobre un incremento en la síntesis de algunas proteínas relacionadas con la formación de biopelículas. Esto sugiere que el crecimiento de la bacteria adherida a un medio sólido mejoraría la resistencia al cobre del microorganismo.

Los resultados obtenidos indican que *A. ferrooxidans* usaría no sólo estrategias canónicas de resistencia a cobre como sistemas del tipo RND, sino que también mecanismos adicionales en los que varias proteínas de la envoltura celular y citoplasmáticas serían componentes principales.

Por medio de este trabajo se identificó nuevas proteínas que participarían en la resistencia a cobre en *A. ferrooxidans* contribuyendo a mejorar el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a este metal de esta bacteria, lo que podría proporcionar las herramientas para optimar la resistencia a cobre de otros microorganismos biomineros y la eficiencia del proceso de biolixiviación.

## **Abstract**

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is an extremophilic bacterium of great industrial importance due to its participation in the recovery of metals such as copper, gold and uranium through biomining. This bacterium is able to resist high copper and other metal concentrations, an essential property to survive the environmental conditions during industrial ore bioleaching.

The presence in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 of canonical copper-resistance determinants (efflux pumps, metal chaperones, etc) do not fully explain how this bacterium is able to resist extreme copper concentrations, suggesting the existence of other mechanisms of resistance.

To identify new possible copper resistance determinants in *A. ferrooxidans* ATCC 23270, levels of protein synthesis were determined by proteomic analysis through two-dimensional electrophoresis (IEF-SDS PAGE). In addition, the RNA levels of some genes encoding these putative resistance determinants was also measured by real-time PCR (qRT-PCR). Furthermore, through quantitative ICPL (isotope-coded protein labeling) proteomics 366 proteins we identified of which 47 changed their levels of synthesis in cells grown in sulfur in the presence of copper while in iron grown cells 594 proteins were identified. One hundred and twenty of them changed their levels in the presence of copper. Using this strategy the up-regulation of membrane proteins that are part of RND-type Cus systems and new different RND-type efflux pumps were identified in *A. ferrooxidans* grown in the presence of

copper, suggesting a dynamic metal efflux through the membranes. Furthermore, the overexpression of most genes involved in histidine biosynthesis and several genes involved in the biosynthesis of cysteine was observed, suggesting a possible role of these metal-binding amino acids in detoxifying of intracellular copper. In addition, the up-regulation of a putative periplasmic disulfide isomerase was also seen in the presence of copper, suggesting that this protein would restore damaged disulfide bonds to allow cell survival in stress conditions. On the other hand, the down-regulation of the major outer membrane porin (Omp40) and some ionic transporters observed in *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper indicated a general decrease in the influx of the metal and other cations into the cell.

Finally, in *A. ferrooxidans* grown in sulfur and in the presence of copper, an increase in the synthesis of some proteins related to biofilm formation was found. This suggests that growth of bacteria adhered to a solid medium may enhance copper resistance of this microorganism.

The results indicate that *A. ferrooxidans* would use not only canonical strategies of resistance to copper such as RND-type systems, but also additional mechanisms where several proteins of the cell envelope and cytoplasm would be main components.

Through this work we identified novel proteins that participate in copper resistance in *A. ferrooxidans* contributing to a better understanding of the mechanisms of copper resistance of this bacterium, which could provide the tools to improve copper resistance to other biomining microorganisms and bioleaching process efficiency.



## **1. Introducción**

La solubilización microbiana de minerales se usa ampliamente para obtener metales en un proceso industrial llamado biolixiviación o biominería. Se ejecuta principalmente para la extracción de metales tales como cobre, oro y uranio, entre otros. Este proceso es realizado por una amplia variedad de microorganismos quimiolitotróficos, como *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una  $\gamma$ -proteobacteria acidófila que utiliza la energía obtenida de la oxidación de minerales que contienen hierro y azufre para su crecimiento, y corresponde a una de las bacterias más estudiadas dentro del consorcio de microorganismos empleados en biolixiviación (Rawlings, 2002; Jerez, 2011; Jerez, 2013; Vera y cols., 2013).

La solubilización de cobre presente en los minerales genera ácido sulfúrico y elevadas cantidades de cobre disuelto, condiciones muy tóxicas para la mayoría de las formas de vida existentes. Sin embargo, distintos antecedentes indican que *A. ferrooxidans* puede resistir altas concentraciones de cobre (>100 mM) (Das y cols., 1998), característica fundamental para sobrevivir a las condiciones del sitio de biolixiviación, donde los niveles de cobre usualmente alcanza rangos entre 15-100 mM (Watling, 2006; Jerez, 2011; Jerez, 2013).

### **1.1. El cobre y su toxicidad para las células**

El cobre es un micronutriente esencial que constituye un importante cofactor catalítico para muchas enzimas. Debido a la facilidad cinética y termodinámica del cobre para pasar de Cu (I) a Cu (II), muchas proteínas que contienen cobre cumplen diversas funciones en la célula, como el transporte de electrones, protección del

daño oxidativo, catálisis de la oxidación de múltiples sustratos y en la unión y activación del dioxígeno. Estas proteínas en general participan en procesos vitales como la respiración, transporte de hierro, protección al estrés oxidativo, coagulación sanguínea y pigmentación (Puig y Thiele, 2002). Sin embargo, a pesar de su carácter esencial, este metal a concentraciones que exceden los requerimientos fisiológicos es altamente tóxico.

Aunque no se conoce la razón exacta por la cual el cobre es dañino para la célula, se cree que se debe principalmente a sus propiedades redox y la posibilidad de generar radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton:



El radical hidroxilo es el radical de oxígeno más poderoso y reactivo, capaz de participar en numerosas reacciones que dañan importantes macromoléculas vitales (Valko y cols., 2005). Este radical posee una gran afinidad por otras moléculas, reaccionando a una velocidad muy alta (Kohen y Abraham, 2002). La actividad pro-oxidante de esta especie hace que en cantidades superiores a las normales sea fuertemente perjudicial generando daños estructurales irreversibles (Thannickal y Fanburg, 2000).

Además, el cobre puede provocar una disminución de compuestos que contienen grupos sulfhidrilo como la cisteína o el glutatión (Magnani y Solioz, 2007). También puede unirse espontáneamente a ácidos nucleicos, lípidos, polisacáridos y proteínas. Esta unión desplaza otros metales funcionales, como por ejemplo

cofactores metálicos de motivos estructurales o catalíticos de muchas proteínas celulares, generando alteraciones en su función (Predki y Sarkar, 1992). Además, en presencia de oxígeno, puede inducir el mal plegamiento de proteínas periplasmáticas por la formación de puentes disulfuro erróneos lo que provoca la muerte celular (Hiniker y cols., 2005).

Producto de esta dualidad del cobre, esencial y tóxico, todos los organismos han desarrollado eficientes mecanismos homeostáticos que controlan su distribución y mantienen el balance del cobre intracelular evitando tanto su ausencia como la acumulación tóxica del metal.

## **1.2. Determinantes de resistencia a cobre en microorganismos procariontes**

La mayoría de los determinantes bacteriales involucrados en la resistencia al cobre se han identificado y estudiado en microorganismos neutrófilos como *Escherichia coli* y *Pseudomonas syringae*. Estos determinantes de resistencia se definen como aquellos genes cuyos productos participan en la capacidad celular de resistir altas concentraciones de especies tóxicas.

### **1.2.1. Eflujo de cobre a través de ATPasas de cobre**

CopA es una proteína de transmembrana que corresponde a una ATPasa de tipo P perteneciente a la subfamilia PIB (encargadas de transportar metales de transición), esencial para mantener la homeostasis de cobre citoplasmático en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Rensing y Grass, 2002).

Las ATPasas de tipo P son un grupo ubicuo de proteínas muy conservadas presentes en arqueas, bacterias y eucariontes y cuya función es transportar

sustratos cargados a través de membranas biológicas utilizando la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP (Axelsen y Palmgren, 1998). CopA presenta una secuencia de unión a metal característica en su región de transmembrana (TM) (motivos CPC, CPH, SPC) importante para la función enzimática, específicamente en la TM inmediatamente río arriba del sitio de fosforilación (Solioz y Vulpe, 1996). También presenta uno a seis dominios de unión a metal en su extremo N-terminal (N-MBD), que incluyen secuencias consenso CXXC o secuencias ricas en histidina (Rensing y cols., 2000) capaces de unir metales con alta afinidad y de recibir cobre desde chaperonas de cobre específicas cumpliendo así una función regulatoria (Fan y cols., 2001).

Los aminoácidos conservados que unen metales se encuentran presentes en sus hélices de transmembrana y constituyen las llamadas TM-MBDs responsables de la translocación del ión, lo que requiere de la fosforilación de la proteína dependiente de ATP. La fosforilación catalítica de la enzima ocurre posterior a la unión del Cu (I) a la región TM-MBD y la unión de ATP al dominio de unión de ATP (ATP-BD). El cambio conformacional de la enzima provocado por la fosforilación permite la translocación del ión a través de la membrana plasmática y la liberación del Cu (I) al periplasma (Argüello y cols., 2007).

Este sistema de transporte de cobre se ha identificado en una amplia variedad de bacterias, y diferentes antecedentes asocian la función de CopA a la actividad de chaperonas de cobre, como CopZ, una pequeña proteína involucrada en la transferencia del cobre intracelular (Banci y cols., 2001; González-Guerrero y Argüello, 2008; Sitthisak y cols., 2007). Estudios en la arquea *Archaeoglobus fulgidus* señalan que el cobre libre o hidratado no puede acceder a CopA y la función

de CopZ sería transferir el átomo de cobre directamente sobre N-MBDs y TM-MBDs (González-Guerrero y Argüello, 2008) (figura 1).

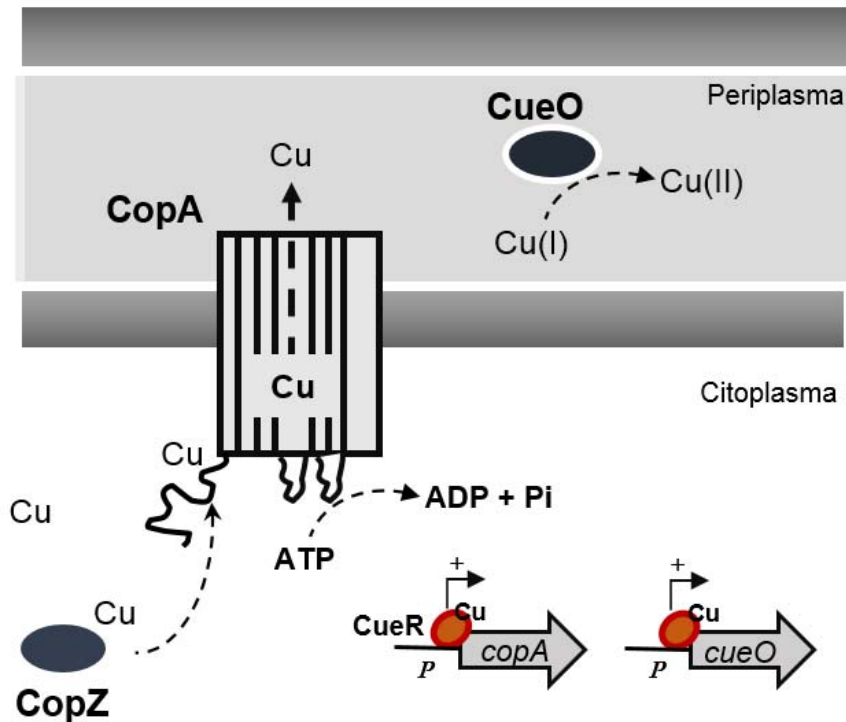


FIGURA 1. Función general de CopA, una ATPasa de tipo P translocadora de cobre, que transporta cobre a través de la membrana plasmática hacia el periplasma. Este transportador recibiría cobre desde chaperonas de cobre específicas como CopZ. El regulador transcripcional CueR controla la transcripción directa de CopA y CueO, una oxidasa de multicobre periplasmática responsable de la oxidación de Cu (I) a Cu (II) (adaptado desde Rensing y Grass, 2002).

En *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, la expresión de CopA es regulada por una proteína que responde a cobre, CueR. La presencia de Cu (I) activa a CueR, generando la sobreexpresión de CopA (Outten y cols., 2000; Espariz y cols., 2007).

### **1.2.2. Oxidación del Cu periplasmático por CueO**

En *E. coli*, CueR también controla la transcripción directa de otro determinante denominado CueO (Outten y cols., 2000), una oxidasa de multicobre periplasmática que junto con CopA constituyen el sistema Cue. CueO sería responsable de la oxidación del ión cuproso a la forma menos tóxica, el ión cúprico (Singh y cols., 2004). Se ha demostrado que CueO protege a las enzimas periplasmáticas del daño inducido por cobre y esta protección podría ser generada por la unión de cobre libre y/o por la disminución de la forma más tóxica del cobre, Cu (I) (Grass y Rensing, 2001; Rensing y Grass, 2002). Adicionalmente, CueO posee una secuencia péptido señal reconocida por la maquinaria de translocación Tat. Esta maquinaria transporta proteínas completamente plegadas con su cofactor unido antes de ser transportadas al periplasma y por lo tanto la carga de cobre unido a CueO en el citoplasma como su posterior translocación al periplasma podrían contribuir a la detoxificación del cobre citoplasmático (Rensing y Grass, 2002) (figura 1).

### **1.2.3. Eflujo de cobre a través del sistema Cus**

Las bacterias Gram-negativas también necesitan translocar sustancias tóxicas a través de la membrana externa para proteger el compartimento periplasmático. Es por ello que estas bacterias presentan un exclusivo determinante de resistencia que consiste en un sistema de eflujo del tipo RND (resistencia, nodulación y división), involucrado en exportar una variedad de sustratos, entre ellos iones metálicos, drogas, y productos bacteriales como péptidos y señales de quorum-sensing (Paulsen y cols., 1997).

En *E. coli* se ha identificado un sistema de eflujo de cobre (y plata) del tipo RND que participa en la homeostasis del cobre en condiciones anaeróbicas, denominado sistema Cus (Cu-sensing). Este sistema está codificado a nivel cromosomal en un operón *cusCFBA* y se regula por un sistema de transducción de señales de 2 componentes codificados por el operón *cusRS* que codifica a CusR, un activador transcripcional y CusS, una histidina quinasa localizada en la membrana citoplasmática que probablemente detecta el cobre en el espacio periplasmático (Munson y cols., 2000).

El operón *cusCFBA* codifica a CusA, una proteína RND de membrana interna que corresponde a un antiporte protón-sustrato y CusB, una proteína de fusión de membrana periplasmática (Saier y cols., 1994). Mientras que CusC, corresponde a un factor de membrana externa (Dinh y cols., 1994) y CusF, a una metalochaperona periplasmática, la cual tiene homólogos sólo en sistemas de resistencia a iones metálicos monovalentes (Franke y cols., 2003). En el sistema CusCBA, CusC interactuaría con la proteína CusA y CusB formando un canal que permitiría conectar el citoplasma con la membrana externa. La función de este complejo multiproteico sería capturar Cu (I) desde el citoplasma y exportar el metal hacia el exterior previniendo su aparición en el periplasma, y adicionalmente permitiría capturar el cobre periplasmático a través de la asociación con CusF, la metalochaperona que mediaría la transferencia del cobre al complejo de eflujo CusCBA facilitando la detoxificación del periplasma (Rensing y col., 2002) (figura 2).

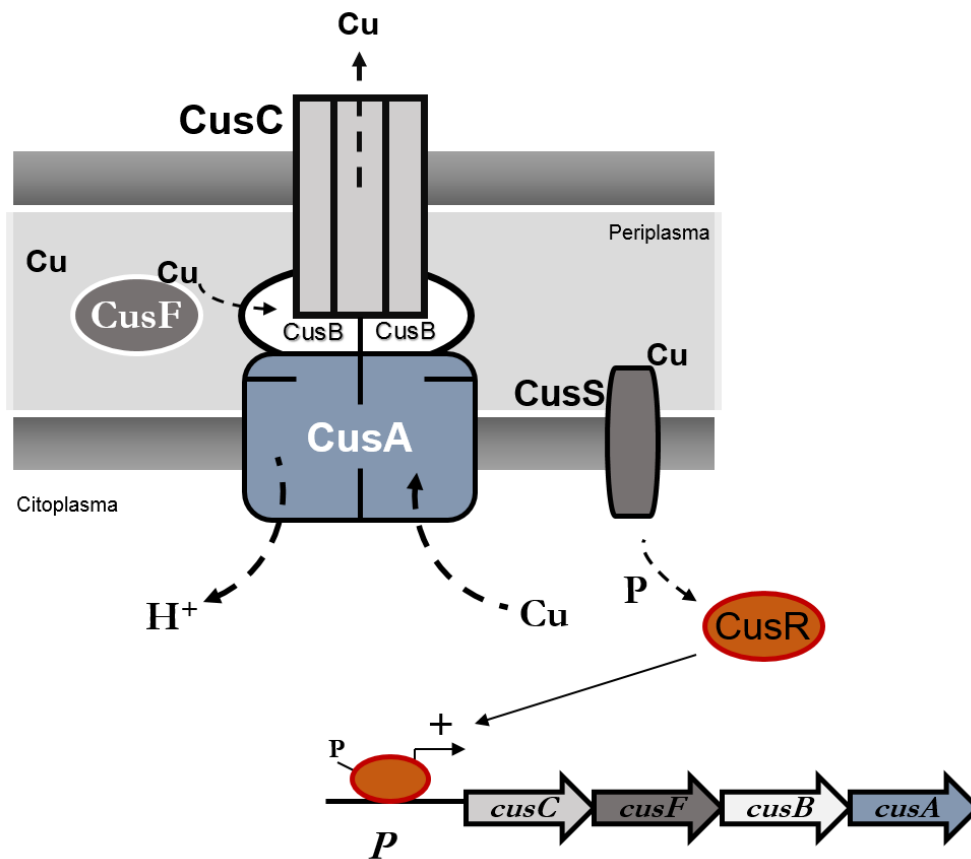


FIGURA 2. Sistema de eflujo de cobre CusCFBA. El operón *cusCFBA* codifica el sistema del tipo RND CusCFBA que transporta cobre desde el periplasma y/o citoplasma a través de la membrana externa hacia el espacio extracelular. Su expresión se regula por un sistema de transducción de señales de 2 componentes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

#### 1.2.4. Genes plasmidiales relacionados con la homeostasis de cobre

Además de los determinantes de resistencia a cobre codificados a nivel cromosomal se han documentado otras proteínas involucradas en la tolerancia a cobre codificadas en plasmidios en diferentes especies bacteriales (Cha y Cooksey, 1991; Teixeira y cols., 2008). Algunas cepas de *E. coli* pueden sobrevivir a concentraciones de Cu que sobrepasan los sistemas homeostáticos de cobre codificados a nivel cromosomal. Tales cepas presentan genes plasmidiales que confieren resistencia adicional a cobre (Brown y cols., 1995). Se ha identificado en



*P. syringae* pv. *tomato* un determinante de resistencia análogo al sistema de resistencia plasmidial de *E. coli*. Esta bacteria alberga un plasmidio de 35 kb que presenta el operón  $copABCD_{Ps}$  inducible por cobre y el operón  $copRS$ , encargado de la regulación de su expresión.  $CopA_{Ps}$  corresponde a una oxidasa de multicobre periplasmática capaz de unir 11 átomos de cobre, cuya función en la resistencia a cobre se puede deber a su alta capacidad de unir cobre y/o a su actividad oxidasa. La proteína  $CopB_{Ps}$  corresponde a una proteína integral de membrana externa, mientras que  $CopC_{Ps}$  representa una chaperona de cobre periplasmática que une un átomo de cobre.  $CopC_{Ps}$  podría transferir Cu desde  $CopA_{Ps}$  al transportador integrado a la membrana interna  $CopD_{Ps}$ , a través del cual se transporta el cobre (Cooksey, 1993) (figura 3).

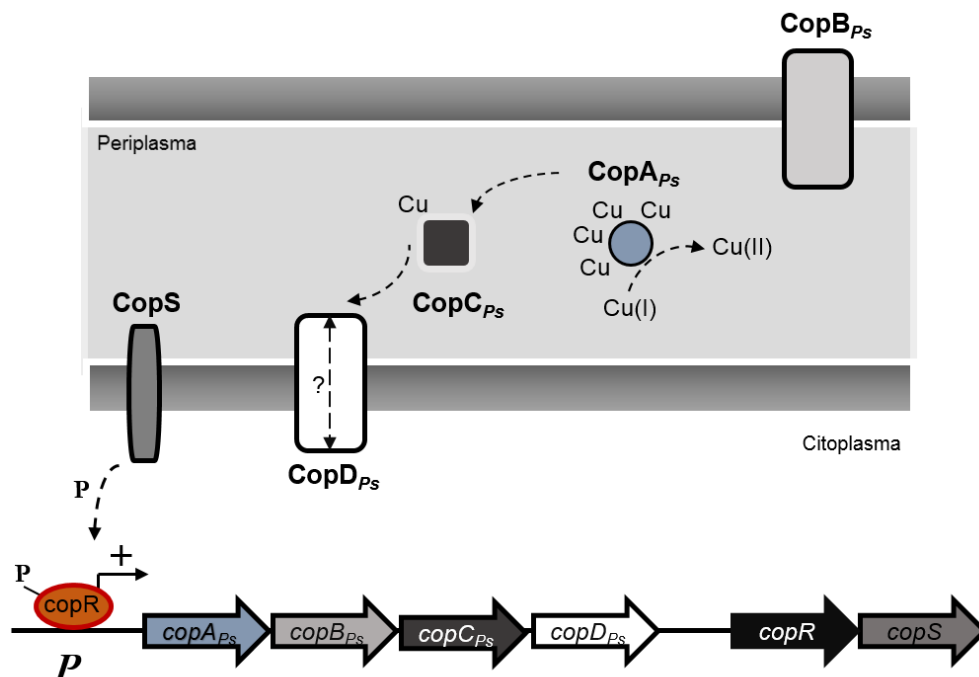


FIGURA 3. Mecanismo de resistencia a cobre de *P. syringae* mediante el determinante  $CopABCD_{Ps}$ . El operón  $copABCD_{Ps}$ , de origen plasmidial, codifica proteínas que unen y transportan cobre y que participarían en la homeostasis del metal. El operón  $copRS$  se encargaría de regular su expresión.

### 1.3. Resistencia a cobre en *A. ferrooxidans*

Antecedentes experimentales indican que *A. ferrooxidans* puede tolerar concentraciones de cobre de hasta 800 mM, muy por sobre otras bacterias neutrófilas y acidófilas (1-8 mM) (Das y col., 1998; Dopson y cols., 2003), lo que sugiere que existen eficientes determinantes de resistencia a cobre presentes en esta bacteria. Sin embargo, son escasos los estudios que identifiquen los componentes celulares involucrados en la resistencia. Se han obtenido algunos datos que señalan que *A. ferrooxidans* podría expresar sistemas inducibles de resistencia (Boyer y cols., 1998), que la resistencia estaría codificada a nivel cromosomal y no plasmidial (Chisholm y col., 1998) y que el tratamiento de la bacteria con proteinasa-K genera un fenotipo sensible a cobre, sugiriendo que en la resistencia estarían involucrados componentes proteicos de la superficie celular (Das y col., 1998).

También se ha propuesto una relación entre los polifosfatos y la tolerancia a metales pesados. Los polifosfatos son polímeros de fosfato inorgánico unidos por enlaces fosfoanhídrido ricos en energía y que se han relacionado a una variedad de procesos celulares (Kornberg y cols., 1999). Uno de los mecanismos propuestos para la tolerancia a metales es el secuestro de cationes metálicos por polifosfatos, reduciendo su concentración intracelular (Aiking y cols., 1984). También se ha sugerido que la hidrólisis de polifosfatos facilitaría la detoxificación de metales, a través de sistema de transporte de fosfato inorgánico (Pit) que pueden transportar fosfato inorgánico complejado a metales pesados, removiéndolos de la célula (van Veen y cols., 1994). *A. ferrooxidans* normalmente acumula grandes cantidades de

gránulos de polifosfato, y su degradación se incrementa en presencia de cobre. Este hecho, junto con el aumento del eflujo de fosfato inorgánico, sugiere que los polifosfatos podrían poseer alguna función en la tolerancia a cobre en *A. ferrooxidans* (Alvarez y Jerez, 2004). Un fenómeno similar ocurre en el arqueón acidófilo *Sulfolobus metallicus* el que también acumula una gran cantidad de polifosfatos y que crece y se adapta a la presencia de 200 mM de sulfato de cobre. Por otro lado, *S. solfataricus* no acumula gránulos y no crece o resiste más de 1-5 mM  $\text{CuSO}_4$ , lo que sugiere una interesante relación entre resistencia a cobre y niveles de polifosfatos (Remonsellez y cols., 2006; Orell y cols., 2012).

Por otro lado, se observó en *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de cobre la inducción de genes que codifican las enzimas glutatión sintetasa (*gshB*) y glutatión reductasa (*gor*), que mantienen los niveles de glutatión requeridos para su función antioxidante. Además se observó la sobreexpresión de los genes *sod* (superóxido dismutasa) y *ahpC* (alquilhidroperoxidasas), encargados de la eliminación de superóxido e hidroperóxidos, respectivamente (Orell y cols., 2010). Estas enzimas constituirían probables defensas antioxidantes necesarias para contrarrestar el estrés oxidativo generado por el cobre.

A través de análisis bioinformáticos, en nuestro laboratorio se identificó la presencia de marcos abiertos de lectura (ORFs) con homología a posibles proteínas de resistencia a cobre en *A. ferrooxidans* (figura 4).

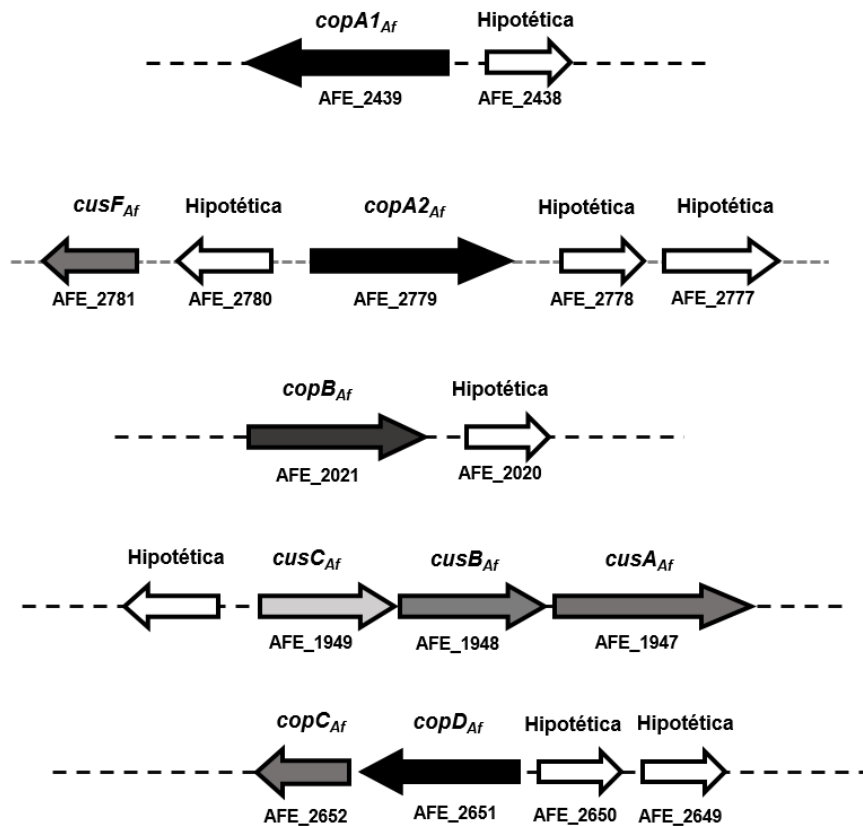


FIGURA 4. Contextos genéticos de los posibles determinantes de resistencia a cobre encontrados en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (adaptado de Navarro y cols., 2009).

Los genes AFE\_1949, AFE\_1948 y AFE\_1947 (que denominamos *cusC*<sub>Af</sub>, *cusB*<sub>Af</sub> y *cusA*<sub>Af</sub>, respectivamente) se organizan en un operón similar al sistema Cus de *E. coli* (Navarro y cols., 2009).

También se han identificado por análisis informático dos ORFs con alta homología a la ATPasa CopA de *E. coli* (*copA*<sub>1Af</sub> (AFE\_2439) y *copA*<sub>2Af</sub> (AFE\_2779)) y un ORF homólogo a CopB, una ATPasa tipo P de *Enterococcus hirae* (denominada CopB<sub>Af</sub> (AFE\_2021)) (Valdés y cols., 2008).

En el periplasma de *A. ferrooxidans* se identificó una proteína con alta homología a la proteína CopC de *P. syringae* pv tomato (AFE\_2652) (Chi y cols., 2007), cuyo contexto genético indicó que formaría parte de un operón junto con una proteína con alta homología a la proteína de membrana CopD de *P. syringae* pv tomato (denominada CopD<sub>Af</sub> (AFE\_2651)) (Navarro y cols., 2009).

A partir de estos datos, se determinó por PCR en tiempo real los niveles de RNA de estos determinantes y se observó en cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en hierro y en presencia de CuSO<sub>4</sub> 25 mM un aumento de su expresión. Además en cepas de *E. coli* que expresan estos genes presentan una mayor resistencia a cobre comparado con las cepas control sin expresión heteróloga, lo que sugiere fuertemente su funcionalidad (Navarro y cols., 2009).

Recientes análisis mostraron la expresión de *copD<sub>Af</sub>* en dos cepas de *A. ferrooxidans* (DY26 Y DC) cuando crecieron en presencia de mayores concentraciones de cobre. La expresión de *copD<sub>Af</sub>* fue mayor en la cepa DY26, la que muestra mayor tolerancia al metal (Wu y cols., 2010). También se observó un aumento de la expresión de la ATPasa de cobre *copB<sub>Af</sub>* en ambas cepas bajo condiciones de estrés de cobre (Hu y cols., 2013).

Por otro lado, el análisis y la comparación del genoma entre dos cepas de *A. ferrooxidans* determinó que la cepa ATCC 53993 contiene los mismos posibles determinantes de resistencia a cobre que la cepa ATCC 23270 más una isla genómica de 160 kb la cual está ausente en la misma. Entre otros genes, la isla genómica contiene algunos que codifican para una posible ATPasa de cobre y un sistema Cus adicional. Por PCR en tiempo real se determinó que estos genes se sobreexpresaron cuando *A. ferrooxidans* ATCC 53993 crece en presencia de cobre

y estas proteínas demostraron ser funcionales cuando se sintetizaron en cepas de *E. coli* mutantes sensibles a cobre. Por lo tanto, la diferencia en la resistencia a cobre entre las dos cepas podría ser debida a la presencia de componentes codificados en la isla genómica (Orellana y Jerez, 2011).

No obstante, la presencia de estos determinantes canónicos probablemente no explican completamente cómo *A. ferrooxidans* es capaz de resistir concentraciones de cobre extremas. Se ha observado que *Cupriavidus metallidurans* CH34 posee numerosos genes que codifican determinantes de resistencia a cobre canónicos. Sin embargo, esta bacteria sólo resiste concentraciones de cobre de alrededor de 3 mM (Monsieurs y cols., 2011). Por su parte *A. ferrooxidans*, que posee un repertorio de determinantes canónicos similar a *E. coli* y un número menor de genes involucrados en la resistencia a cobre comparado con *C. metallidurans*, resiste niveles de cobre mucho mayores que estas bacterias, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de resistencia en este microorganismo. El objetivo de este trabajo fue buscar nuevos determinantes de resistencia a cobre en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 que expliquen, al menos en parte, este fenómeno.

A través de análisis proteómicos y transcriptómicos se intentó identificar nuevas proteínas que participan en la resistencia a cobre en *A. ferrooxidans* y de esta manera mejorar el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a cobre de esta bacteria con el objetivo de dilucidar las bases moleculares de su adaptación, lo que podría proporcionar las herramientas para mejorar la resistencia a cobre de otros microorganismos biomineros.

## **2. Hipótesis de trabajo:**

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 posee diferentes estrategias para confrontar las altas concentraciones de cobre en su medio ambiente, incluyendo mecanismos de resistencia al metal tanto directos como indirectos.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivos generales:**

Analizar los niveles de proteínas en *A. ferrooxidans* crecidos en ausencia y presencia de cobre y evaluar la posible función de estas proteínas en la resistencia al metal.

### **3.2. Objetivos específicos:**

1. Evaluar los niveles de síntesis de proteínas de membrana de *A. ferrooxidans* crecidos en ausencia y presencia de cobre.
2. Evaluar los niveles de síntesis de proteínas totales en *A. ferrooxidans* crecidos en ausencia y presencia de cobre por proteómica cuantitativa.
3. Analizar los niveles de mRNA que codifica algunas proteínas identificadas por proteómica.
4. Evaluar la funcionalidad de algunas proteínas identificadas.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo**

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 se creció a 30 °C, con agitación rotatoria en medio de cultivo líquido 9K que contiene 0,04 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 33,3 g de FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, 0,4 g de MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O y 0,1 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por litro a pH 1,5, o en el mismo medio 9K en el que el sulfato ferroso se reemplazó por 50 g de azufre estéril y el pH se ajustó a 2,5 (Amaro y cols., 1991). Las concentraciones de cobre se ajustaron agregando CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O al medio de cultivo y las células se adaptaron mediante sucesivos subcultivos hasta llegar a las diferentes concentraciones de cobre requeridas para el análisis.

### **4.2. Extracción de la fracción total de membranas**

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 se creció hasta la fase exponencial tardía (1 x 10<sup>8</sup> a 5 x 10<sup>8</sup> cels/ml) en medios de cultivo líquido con hierro o azufre y se adaptó a la ausencia y presencia de diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub> (0, 5, 20, 50 mM). Las células se cosecharon por centrifugación (10.000 x g por 2 min a 25 °C) y se lavaron 3 veces con citrato de sodio (pH 7,0) o agua ácida para remover el exceso de hierro o azufre, respectivamente. Las células se suspendieron en buffer de sonicación (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) que contenía el inhibidor de proteasas PMSF (100 µg/ml) y se sonicaron en hielo (Misonix XL2020, Farmingdale, NY, USA; intensidad 20%, pulsos de 15 s y 30 s de enfriamiento durante 15 min totales).

Luego, la muestra se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C para eliminar los



restos celulares, y se cuantificó las proteínas totales (ensayo de cuantificación Bio-Rad).

El sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 x *g* por 1 h a 4 °C y el pellet con la fracción total de membranas se lavó por suspensión cuidadosa con buffer de sonicación, seguido de ultracentrifugación a 100.000 x *g* por 1 h a 4 °C. Finalmente, el pellet de membranas totales se suspendió en buffer ACA750 ( $\epsilon$ -ácido aminocaproico 750 mM, EDTA 0,5 mM, 50 mM Bis-Tris HCl pH 7,0), y las proteínas se cuantificaron por el método del ácido bicinconínico (PIERCE) y se almacenaron a -80 °C para su posterior análisis proteómico (Stenberg y cols., 2005).

#### **4.3. Preparación de las muestras de proteínas de membrana y su análisis por 2D-PAGE**

Debido a su naturaleza hidrofóbica, las proteínas de membrana presentan una pobre solubilidad en los solventes utilizados para el isoelectroenfoque, además que tienden a precipitar a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico donde su solubilidad es incluso menor (Braun y cols., 2007). Dadas estas limitaciones para la solubilización, y por lo tanto para la separación y análisis de las proteínas de membranas mediante la electroforesis bidimensional convencional, se diseñó un protocolo optimizado para la evaluación de los niveles de síntesis de proteínas de membrana utilizando ácido- $\epsilon$ -aminocaproico y el detergente  $\eta$ -dodecil- $\beta$ -D-maltósido para mejorar la solubilización de las proteínas.

El protocolo consistió en solubilizar 400  $\mu$ g de proteína de la fracción total de membranas en buffer ACA750 que contiene 5 % (v/v) de  $\eta$ -dodecil- $\beta$ -D-maltósido en hielo durante 2 h y con agitación cada 20 min. Terminado el período de

incubación, las muestras se centrifugaron por 16.000 x g por 25 min a 4 °C para eliminar los restos no solubilizados. Las proteínas en el sobrenadante se precipitaron con el kit 2-D de BIORAD (Ready-Prep 2D cleanup Bio-Rad Kit) y el precipitado se suspendió en 300 µl de buffer de isoelectroenfoque (Urea 8 M, tiourea 2 M, azul de bromofenol 0,001%, η-dodecil-β-D-maltósido 2%), seguido por la adición de hasta 100 mM ditioneitol (DTT) y 2% de anfolitos y la mezcla se incubó por 1 h a 25 °C.

Las muestras solubilizadas se sometieron a isoelectroenfoque sobre tiras IPG (17 cm, pH 3-10 no lineal) usando el sistema ReadyStrip IPG de BioRad. Después del IEF, las tiras se incubaron durante 30 min con buffer de equilibrio (urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y Tris-HCl 24 mM, pH 6,8) que contiene DTT 2% y luego por otros 30 min con buffer de equilibrio con iodoacetamida al 2,5%.

Las tiras se transfirieron sobre la superficie de los geles de poliacrilamida al 12,5 % y se analizaron por SDS-PAGE en la segunda dimensión. Finalmente los geles se tiñeron con nitrato de plata (Varela y cols., 2010; Chevallet y cols., 2006).

#### **4.4. Secuenciación de proteínas mediante espectrometría de masas**

Las proteínas de *A. ferrooxidans* con expresión diferencial en las diferentes condiciones se obtuvieron por corte de la mancha de interés desde los geles 2D en triplicado teñidos con nitrato de plata. Las proteínas se identificaron por análisis de espectrometría de masa MALDI-TOF/TOF (Varela y cols., 2010). Este servicio de secuenciación se realizó en colaboración con el Dr. Alberto Paradela del Centro Nacional de Biotecnología, España.

#### **4.5. Extracción del RNA total**

Para determinar el efecto del cobre sobre la expresión de los genes de interés, se creció *A. ferrooxidans* ATCC 23270 hasta fase exponencial tardía en medios de cultivo líquido con hierro o azufre y se adaptaron a la presencia de diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub>. Las células se cosecharon por centrifugación (10.000 x g por 2 min) y se lavaron previo a la extracción. Aproximadamente 10 o 20 mg de células (peso húmedo) se suspendieron en 400 µl de solución de lisis celular (0,02 M acetato de sodio pH 5,5; 0,5% SDS; 1 mM EDTA). A cada lisado se agregó 1 ml de TRIZOL (Invitrogen) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Consecutivamente se agregó 300 µl de cloroformo y se incubó la mezcla durante 3 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 12.000 x g por 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa que contiene el RNA. Posteriormente el RNA se precipitó utilizando 1 volumen de etanol 100% y 1/10 de acetato de sodio 3 M durante la noche a -20 °C. Luego de la precipitación, el RNA se recuperó por centrifugación a 13.000 x g por 30 min a 4 °C. Finalmente el RNA se suspendió en 20 µl de agua estéril libre de RNasa.

Para eliminar la posible contaminación con DNA, el RNA se trató con el kit TURBO DNasa de Ambion siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

#### **4.6. Síntesis de cDNA**

El cDNA de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se obtuvo por transcripción inversa del RNA total. Para ello, se ocupó 0,8 µg de RNA y 0,5 µg de hexadesoxinucleótidos al azar (Random hexamer primer de Promega). En primer lugar, se incubó la mezcla de 5 µl que contiene el RNA total y los partidores a 70 °C por 5 min para

desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA y facilitar la hibridación con los partidores. Posteriormente se incubó en hielo durante 5 min, se agregó 15 µl de una mezcla de amortiguador Improm-II 5x (promega), dNTPs 0,5 mM c/u, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y 1 U de transcriptasa reversa Improm-II (Promega). La reacción de síntesis incluyó una incubación inicial por 10 min a 25 °C para inducir la hibridación de los partidores. Finalmente la síntesis se realizó por 1 h a 42 °C para luego finalizar con un paso a 70 °C por 15 min para desnaturalizar la transcriptasa reversa (Orellana y Jerez, 2011).

#### **4.7. Diseño de partidores para PCR en tiempo real (qRT PCR), co-transcripción y clonamiento de genes de *A. ferrooxidans***

Los partidores se diseñaron usando la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 usando el programa Primer3 software<sup>21</sup> (Rozen y Skaletsky, 2000; Navarro y cols., 2009) (Tabla 1). Después de la separación de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa (1%) (buffer 0,5X Tris-acetato-EDTA pH 8,0) no se detectó bandas inespecíficas ni amplificaciones cruzadas.

#### **4.8. Análisis de la expresión de genes por PCR en tiempo real (qRT PCR)**

Los genes relacionados a la resistencia a cobre se analizaron por qRT-PCR con el sistema Corbett Rotor Gene 6000 usando el kit “master mix” “Rotor-Gene SYBR Green PCR” (Qiagen) (Navarro y cols., 2009; Orellana y Jerez, 2011). Para seleccionar un gen de referencia se analizó tres genes diferentes. El gen para 16S rRNA se seleccionó como gen de referencia ya que su expresión fue la más estable bajo las condiciones de estudio.

TABLA 1. Oligonucleótidos

<b>Partidores</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>	<b>Uso(s)*</b>
16SA <sub>Af</sub> FW	5' TGGTGCCTACGTA CTGAGTG 3'	1
16SA <sub>Af</sub> REV	5' CCGAAGGGCACTTCCGCA 3'	1
CUSA <sub>Af</sub> FW	5' GCCCTGCTCCTTTACTTCAA 3'	1
CUSA <sub>Af</sub> REV	5' ACCGCCACCGATAACTTGTGA 3'	1
CUSBA <sub>Af</sub> FW	5' CTGGCGTCAACA ACTCCAAT 3'	1
CUSBA <sub>Af</sub> REV	5' AGGCATACCCATACTGTCCT 3'	1
CUSCA <sub>Af</sub> FW	5' CGCAAATCGCGCAGATCC 3'	1
CUSCA <sub>Af</sub> REV	5' CGCTGACCGTGACTTCCG 3'	1
AFE_1878 FW (p1)	5' TTCACCACGAGCAAACAGGA 3'	1,2
AFE_1878 REV	5' TTCCGCCACCACTGCCAA 3'	1
AFE_1879 FW	5' GCTGGAGAAAGTGTGACCG 3'	1
AFE_1879 REV	5' TCGCTGCCTCGCTGGATA 3'	1
AFE_1880 FW	5' ACGCCAGCATCTTCTATCCA 3'	1
AFE_1880 REV	5' ACCAGACGGTTGACACCAAA 3'	1
dsbG-L FW	5' TATGTGGTTCGAAGCCCCTCATT 3'	1
dsbG-L REV	5' CGGCATGCTGCTGGGCTTTATTAT 3'	1
AFE_2947 FW	5' TCGTTGGTGATGCCTTTCGT 3'	1
AFE_2947 REV	5' ATGGCGGGTGTTCCTGTTA 3'	1
AFE_2246 FW	5' TCGTTGGTGATGCCTTTCGT 3'	1
AFE_2246 REV	5' ATGGCGGGTGTTCCTGTTA 3'	1
AFE_1880 FW (p2)	5' GCGGGTGCATCTGACTATCT 3'	2
AFE_1879 REV (p3)	5' CGATCTGGATCAGAGGGGTA 3'	2
AFE_1879 FW (p4)	5' CCAGCGCCATCACCTATAAT 3'	2
AFE_1880 REV (p5)	5' GCTGGACCTTCGACTGGATA 3'	2
copAs <sub>Af</sub> FW	5' TCAGCGATGAGCGGATCGCG 3'	1
copAs <sub>Af</sub> RV	5' TCAGCGATGAGCGGATCGCG 3'	1
copD <sub>Af</sub> FW	5' AGGGCTTGGGAAGGCTGATG 3'	1
copD <sub>Af</sub> RV	5' TCCAGATGTCCAGTGTCCGGA 3'	1
copC <sub>Af</sub> FW	5' AAGAATGCCCAAGGTGCGGT 3'	1
copC <sub>Af</sub> RV	5' ACGACGCTCCAGTACACGAA 3'	1
dsbG-L FW	5' ATGTTTAAAAAGTCACTGG 3'	3
dsbG-L REV	5' TCATTGCATTTGCGGTAGC 3'	3

\*1, PCR en tiempo real; 2, análisis de co-transcripción; 3, clonamiento en el vector pBAD-TOPO.

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

Para los experimentos de co-transcripción de los genes de interés, se utilizó como molde el cDNA sintetizado desde el RNA extraído de los cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en azufre en ausencia o en presencia de 50 mM de CuSO<sub>4</sub>, siguiendo el mismo procedimiento mencionado para la síntesis de cDNA (Navarro y cols., 2009).

#### **4.10. Proteómica cuantitativa**

##### **4.10.1. Preparación del extracto de proteína total para análisis por ICPL (Isotope-Coded Protein Label)**

Se creció *A. ferrooxidans* ATCC 23270 hasta fase exponencial tardía ( $1 \times 10^8$  a  $5 \times 10^8$  cels/ml) en medios de cultivo líquido con hierro o azufre y se adaptaron a la ausencia o presencia de CuSO<sub>4</sub> (40 y 50 mM respectivamente). Las células se cosecharon por centrifugación (10.000 x g por 2 min a 25 °C) y se lavaron 3 veces con agua ácida (pH 1,5), seguido por el lavado con citrato de sodio (pH 7,0), por centrifugación a 0 °C para remover el exceso de hierro o azufre respectivamente y al mismo tiempo neutralizar el pH antes de la ruptura celular por sonicación.

Las células se suspendieron en buffer de sonicación (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) que contenía el inhibidor de proteasas PMSF (100 µg/ml) y se sonicaron en hielo como se describió anteriormente en 3.2. Finalmente, la muestra se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares, y se cuantificó las proteínas totales en el extracto (ensayo de cuantificación Bio-Rad).

#### **4.10.2. Preparación de la muestra para análisis por ICPL**

Las muestras de los extractos proteicos totales de tres diferentes cultivos independientes (50 microgramos de c/u) se mezclaron para obtener muestras con triplicados representativos de cada condición experimental para dar un total de 150 µg de proteína. Estas mezclas se liofilizaron por 48 h a -40 °C. Finalmente estas muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis por ICPL.

#### **4.10.3. Digestión proteica y marcaje para el ICPL**

Se optimizó el protocolo del reactivo de ICPL para marcar 100 µg de muestra individual por experimento. De esta manera, cada muestra (100 µg de extracto proteico total) se disolvió en 8 M urea y 25 mM bicarbonato de amonio, se redujo y alquiló con iodoacetamida. La concentración de urea se disminuyó a 2 M con 25 mM bicarbonato de amonio y la muestra se digirió con tripsina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) a una razón de 25:1 durante la noche a 37 °C. Antes del marcaje para ICPL, las sales y la urea se removieron usando puntas de alta capacidad OMIX C18 (Varian, Palo alto, CA). El marcaje de las muestras con las versiones liviana y pesada del reactivo de ICPL (Serva electrophoresis, Heidelberg, Alemania) se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### 4.10.4. Análisis LC ESI-MS/MS 2D-Nano

Las muestras combinadas marcadas por el reactivo de ICPL (200 µg por experimento) se disolvieron en 100 µL de NH<sub>4</sub>OH 10 mM en agua, pH 9,5, y se fraccionaron en una columna XBridge en fase reversa 100 × 2,1 mm, tamaño de partícula 5 µm, rango de pH amplio (Waters) usando un sistema de HPLC Knauer Smartline. El gradiente de elución se realizó de acuerdo al siguiente esquema: condiciones isocráticas de 10 mM NH<sub>4</sub>OH en agua, pH 9,5, 5 min, incremento lineal de 25 % B (NH<sub>4</sub>OH 10 mM en 80% metanol, 20% agua, pH 9,5) en 10 min seguido por un incremento lineal de 75 % B en 40 min, un incremento lineal de 100 % B en 5 min, y retorno a la condición inicial en 2 min. La velocidad de flujo fue 150 µL/min. El volumen de inyección fue 100 µL y la longitud de onda se monitoreó a 214 nm. En cada experimento se recolectó aproximadamente 20 a 30 fracciones individuales de HPLC (cada dos min), se secaron en un Speedvac y se almacenaron a -20 °C hasta ser utilizadas. La segunda dimensión del análisis 2D-nano LC ESI-MS/MS se realizó usando un Ultimate 3000 nanoHPLC (Dionex, Sunnyvale, CA) acoplado con un espectrómetro de masa HCT Ultra ion-trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Se utilizó una columna analítica en fase reversa de sílica C18 PepMap 75 µm × 15 cm, tamaño de partícula 3 µm, y tamaño de poro 100 Å (Dionex, Sunnyvale, CA). La columna trap fue una C18 PepMap (Dionex, Sunnyvale, CA), tamaño de partícula 5 µm, tamaño de poro 100 Å. La bomba de carga libera una solución de 0,1% de ácido trifluoroacético en 98% de agua / 2% acetonitrilo (LabScan, Gliwice, Poland) a 30 µL/min. La nanobomba proporciona una velocidad de flujo de 300 nL/min y se operó bajo condiciones de gradiente de elución usando ácido fórmico 0,1 % (Fluka, Buchs, Switzerland) en agua como fase móvil A, y ácido



fórmico 0,1 % en 80 % acetonitrilo / 20% agua como fase móvil B. El gradiente de elución se realizó de acuerdo al siguiente esquema: condiciones isocráticas de 96 % A: 4 % B por 5 min, un incremento lineal de 40 % B en 60 min, un incremento lineal de 95 % B en un min, condiciones isocráticas de 95% B por 7 min y retorno a las condiciones iniciales en 10 min. El volumen de inyección fue 5 µL y la longitud de onda se monitoreó a 214 nm y 280 nm. El sistema LC se acopló vía una fuente nanospray (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) a un espectrómetro de masa ión trap 3D que opera en modo ion positivo con el voltaje capilar configurado a 1.400 V. La adquisición dependiente de datos automática permite la exploración completa secuencial ( $m/z$  350–1500) del espectro MS seguido por un espectro MS CID en tándem para los cuatro iones precursores más abundantes. La exclusión dinámica se aplicó para prevenir el mismo  $m/z$ , siendo aislados por 1 min después de la fragmentación.

#### **4.10.5. Identificación de proteínas y análisis cuantitativo**

Los datos obtenidos por MS y MS/MS de las fracciones de HPLC individuales se combinaron usando el “Analysis Combiner tool” y posteriormente se procesaron como un experimento aislado usando DataAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Para la identificación proteica, el espectro MS/MS (en la forma de archivos MASCOT genéricos) se analizó contra la base de datos “forward-reversed” UniprotKB de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://www.uniprot.org>) que contienen 2.747 entradas con sus correspondientes secuencias “reversed”. Las secuencias se hicieron utilizando el programa DBToolkit v4.1.5.

La búsqueda en la base de datos se realizó usando una versión licenciada de Mascot v.2.2.04 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Matrix Science, London, U.K.). Los parámetros de búsqueda se configuraron de la siguiente manera: digestión trípica, modificaciones como carbamidometil cisteína, metionina oxidada y marcaje por ICPL de residuos lisina y/o péptido aminoterminal como variables. La tolerancia de masa del péptido se configuró en 0,6 Da en ambos modos MS y MS/MS, y se permitió la pérdida de una escisión. En la mayoría de los casos, se encontró una precisión de  $\pm 0.1-0.2$  Da en ambos espectros MS y MS/MS. La tasa de falsa detección (FDR) fue de  $\leq 5\%$  para la identificación peptídica y se evaluó manualmente de la siguiente manera: después de la búsqueda en la base de datos, los péptidos empatados se clasificaron de acuerdo a su puntaje Mascot. Esta lista contiene secuencias peptídicas que empatan con secuencias “forward o reversed” de la base de datos. Luego, se extrajo un subgrupo que contiene un 5 % de péptidos que empatan con las secuencias “reversed” y todas las proteínas que resultaron de la FDR se usaron para el análisis cuantitativo. Los análisis cuantitativo y cualitativo se realizaron por WARPLC 1.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) usando los parámetros descritos anteriormente. Primero se identificó todos los péptidos, y luego, basado en el péptido aislado identificado por marcaje por ICPL, el programa calculó el ión cromatográfico extraído para el posible par marcado por ICPL de acuerdo con: (a) el cambio en la masa definido por el reactivo de marcaje, (b) una tolerancia de masa de 0,5 Da, y (c) una tolerancia en el tiempo de retención de 40 s. La razón relativa entre los péptidos marcados por el reactivo ICPL pesado y liviano se calculó en base a la intensidad de la señal y sus correspondientes peaks

monoisotópicos, y de acuerdo a las razones péptidicas individuales el programa calculó la razón proteica.

#### **4.11. Alineamiento de las secuencias con el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270**

Para realizar el alineamiento completo se utilizó el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://cmr.jcvi.org/>) usando el programa Mauve. Las representaciones del genoma y la gráfica del contexto génico se realizaron utilizando el programa Geneious PRO 4.7.

#### **4.12. Análisis funcional del gen AFE-1943 (*dsbG-L*) de *A. ferrooxidans* expresado en *E. coli***

Como no existe una metodología eficiente y reproducible para generar mutantes en *A. ferrooxidans*, la funcionalidad de DsbG-L se probó usando la expresión heteróloga de DsbG-L en *E. coli*. Para esto, después de amplificar el gen *dsbG-L* por PCR, el fragmento de DNA resultante se purificó y clonó en el vector de expresión pBAD-TOPO para generar el vector de expresión pBAD-TOPO-*dsbG-L*. Las células *E. coli* Top 10 y la cepa mutante K-12 sensible a cobre  $\Delta copA/\Delta cusCFBA/\Delta cueO$  se transformaron con el vector pBAD-TOPO-*DsbG-L*. La expresión heteróloga de DsbG-L se indujo o reprimió al crecer las células en presencia de L-arabinosa o glucosa, respectivamente. La capacidad de DsbG-L para otorgar resistencia a cobre a los transformantes se determinó a través de la medición de halos de inhibición en medio sólido en la presencia de discos que

contienen cobre y por la inhibición del crecimiento en medio Luria-Bertani en la presencia de  $\text{CuSO}_4$  0,6 mM (Navarro y cols., 2009).

## 5. Resultados

### 5.1. Cambio en los niveles de proteínas de membrana de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en diferentes concentraciones de cobre, analizado por electroforesis bidimensional (IEF-SDS PAGE)

Para analizar los cambios en los niveles de síntesis de proteínas de membrana de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 por electroforesis bidimensional se diseñó un protocolo con el objeto de optimizar la solubilización de las proteínas de membrana.

La base teórica del protocolo se fundamentó en la utilización de un detergente no iónico con alta capacidad “deslipidante” como el  $\eta$ -dodecil- $\beta$ -D-maltósido y el reactivo ácido- $\epsilon$ -aminocaproico que corresponde a un zwitterión, cuya función sería actuar como contraión aumentando la solvatación y solubilización de proteínas hidrofóbicas de manera similar a una sal como NaCl (Schägger y Von Jagow, 1991), pero que tendría una baja conductividad eléctrica y no provocaría un defecto en el enfoque de las proteínas y la distorsión horizontal característica de la proteómica 2D.

El protocolo diseñado arrojó un número importante de manchas proteicas con buena resolución y reproducibilidad, lo que permitió analizar las proteínas de la fracción total de membrana por electroforesis bidimensional.

En la figura 5 se muestran varias manchas que cambian sus niveles de manera diferencial en preparaciones de membrana total de *A. ferrooxidans* crecidos en azufre y adaptadas a diferentes concentraciones de cobre, mientras que la figura 6

señala las proteínas que se modificaron en hierro y en ausencia y presencia de cobre.

El resultado mostró que dos proteínas de membrana externa que formarían parte de supuestos sistemas de transporte del tipo RND, codificadas por los genes AFE\_1949 (*CusC<sub>Af</sub>*) y AFE\_1880, se indujeron en presencia de altas concentraciones de cobre, tanto en azufre como en hierro (figuras 5 y 6, respectivamente).

Por otro lado, en las mismas concentraciones de cobre, la proteína de membrana externa más abundante de *A. ferrooxidans* (Omp40) (AFE\_2741) disminuye sus niveles en ambas condiciones de crecimiento (figuras 5 y 6).

La figura 6, además muestra la inducción de una proteína disulfuro isomerasa con dominio DsbG que denominamos "DsbGlike" (DsbG-L) codificada por el gen AFE\_1943. Este resultado sugiere que también estarían involucrados mecanismos antioxidantes y de reparación del daño generado por la presencia de cobre en la resistencia de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en hierro.

Es importante destacar que estas proteínas sólo se observaron en *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de cobre, mientras que en condiciones control (0 mM CuSO<sub>4</sub>) no se detectaron, probablemente porque no se sintetizan en ausencia del metal o sus niveles son muy bajos para ser detectados por el método de análisis. Esta característica sugiere que estas proteínas pueden tener un papel importante durante el estrés de cobre.

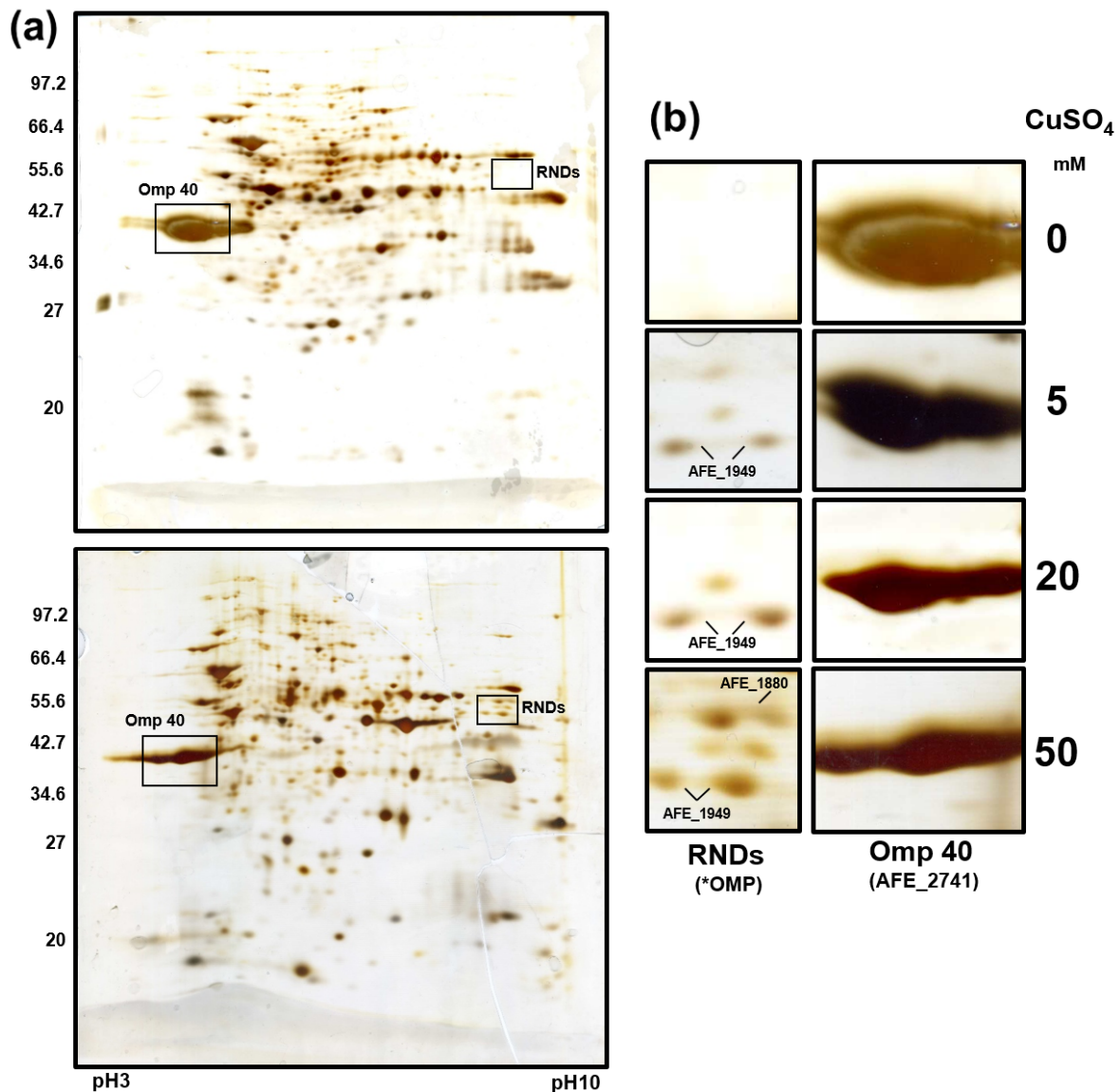


FIGURA 5. Separación de las proteínas de la fracción total de membrana de *A. ferrooxidans* crecido en azufre en ausencia y presencia de  $\text{CuSO}_4$  por 2D-PAGE.

Los microorganismos se crecieron en medio que contiene azufre y en presencia de diferentes concentraciones de sulfato de cobre. (a) Geles completos de la fracción total de membrana de células crecidas en ausencia y presencia de  $\text{CuSO}_4$  50 mM. Las áreas marcadas con cuadrados y rectángulos señalan algunas de las manchas de proteínas que se expresaron diferencialmente, comparadas con la condición control en ausencia del metal. Excepto para Omp-40, estas proteínas se aislaron desde los geles para su identificación por espectrometría MS/MS (Tabla 2). La posición de Omp-40 en este tipo de geles y su secuencia aminoacídica N-terminal se han comunicado previamente (Guiliani y Jerez., 2000) (b) Amplificación de las áreas mostradas en a) desde los correspondientes geles bidimensionales provenientes de células crecidas en las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  indicadas. \*OMP (Outer membrane protein o proteína de membrana externa).

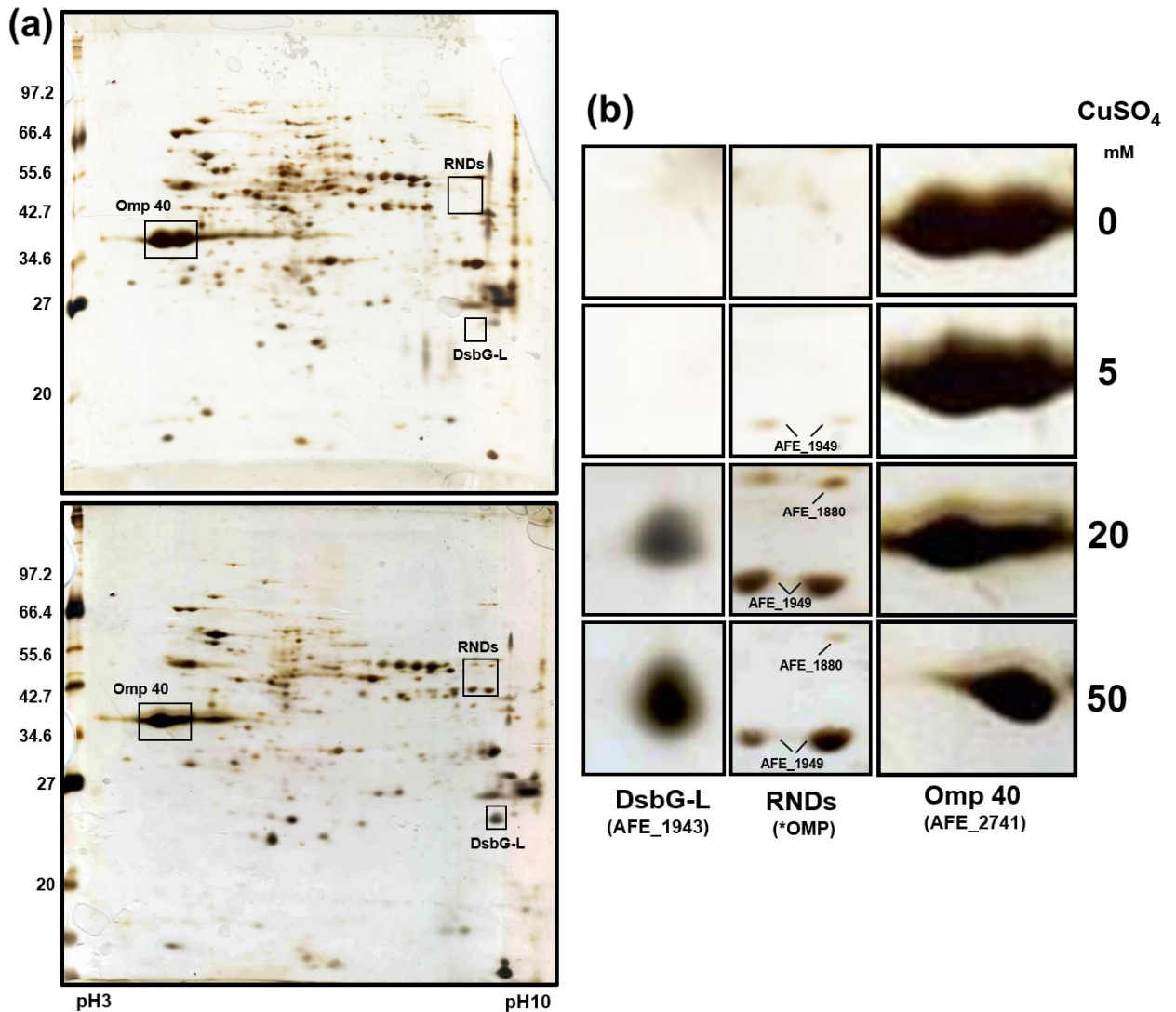


FIGURA 6. Separación de las proteínas de la fracción total de membrana de *A. ferrooxidans* crecidos en hierro en ausencia y presencia de  $\text{CuSO}_4$  por 2D-PAGE.

Los microorganismos se crecieron en medio que contiene hierro y en presencia de diferentes concentraciones de sulfato de cobre. (a) Geles completos de la fracción total de membrana de células crecidas en ausencia y presencia de  $\text{CuSO}_4$  20 mM. Las áreas marcadas con cuadrados y rectángulos señalan algunas de las manchas de proteínas que se expresaron diferencialmente, comparadas con la condición control en ausencia del metal. Excepto para Omp-40, las proteínas se aislaron como en la figura 5. (b) Amplificación de las áreas mostradas en a) desde los correspondientes geles bidimensionales provenientes de células crecidas en las concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  indicadas. \*OMP (Outer membrane protein o proteína de membrana externa).



TABLA 2. Identificación de las manchas aisladas de los geles 2D-PAGE por MALDI TOF/TOF

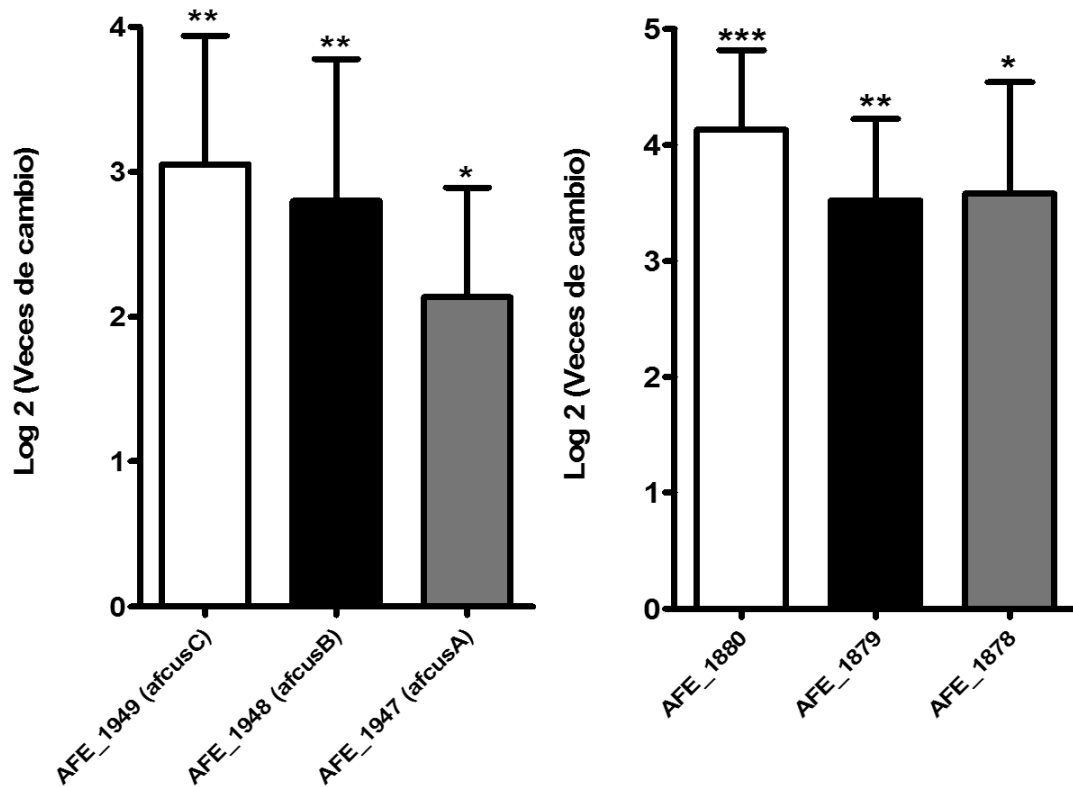
Mancha	Nombre de proteína	Número de acceso	Puntaje Mascot	MW	pl	Cobertura de secuencia	Número de péptidos
DsbG-L (AFE_1943)	Disulfuro Isomerasa/ Thiol-disulfuro oxidasa	gi   198283723	193	19,6	8,74	37	5
CusC <sub>Af</sub> (AFE_1949)	Proteína de membrana externa, eflujo de metales pesados, putativa	gi   198283727	950	46,3	8,77	33	16
CusC <sub>Af</sub> (AFE_1949)	Proteína de membrana externa, eflujo de metales pesados, putativa	gi   198283727	974	46,3	8,77	36	17
AFE_1880	Lipoproteína de membrana externa, Sistema de eflujo RND, Familia NodT	gi   198283663	1.011	55,2	8,97	61	23

## 5.2. Expresión de los genes que codifican para proteínas inducidas por la presencia de cobre

Para medir los cambios en la expresión genética e identificar posibles determinantes de resistencia a cobre se realizaron experimentos de PCR en tiempo real. Se analizó los niveles de mRNA de los genes que codifican para algunas proteínas de las figuras 5 y 6 que se sintetizaron de manera diferencial en presencia de cobre en preparaciones de membrana total de *A. ferrooxidans* y se analizó los niveles de mRNA de posibles determinantes de resistencia a cobre presentes en el genoma de la bacteria.

La figura 7 muestra la fuerte sobreexpresión de los genes que codifican para el sistema de transporte del tipo RND CusCBA<sub>Af</sub> (CusC<sub>Af</sub>, CusB<sub>Af</sub>, CusA<sub>Af</sub>) en *A. ferrooxidans* crecidos en azufre en presencia de CuSO<sub>4</sub> 50 mM. La expresión del posible sistema de eflujo del tipo RND codificado por los genes AFE\_1878, AFE\_1879 y AFE\_1880 también aumentó en presencia del metal. En cambio, la expresión de algunos posibles determinantes de resistencia a cobre presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* como *copAs*<sub>Af</sub>, *copD*<sub>Af</sub> y *copC*<sub>Af</sub> permanecieron inalterados (figura 8).

Estos resultados sugieren que las bombas del tipo RND son de importancia en el mecanismo de resistencia a cobre de *A. ferrooxidans* crecidos tanto en hierro como en azufre en presencia de elevadas concentraciones del metal.



**FIGURA 7. Niveles relativos de mRNAs de genes que codifican posibles sistemas de eflujo del tipo RND.** Las células se crecieron en azufre en presencia de  $\text{CuSO}_4$  50 mM. Se muestran los cambios en los niveles transcripcionales comparados con la bacteria crecida en ausencia de  $\text{CuSO}_4$ . Los datos se normalizaron usando los valores de expresión del gen del rRNA 16S<sub>Af</sub>. Los asteriscos representan \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$  comparados al valor control en ausencia de cobre. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres a cinco valores experimentales (réplicas biológicas).

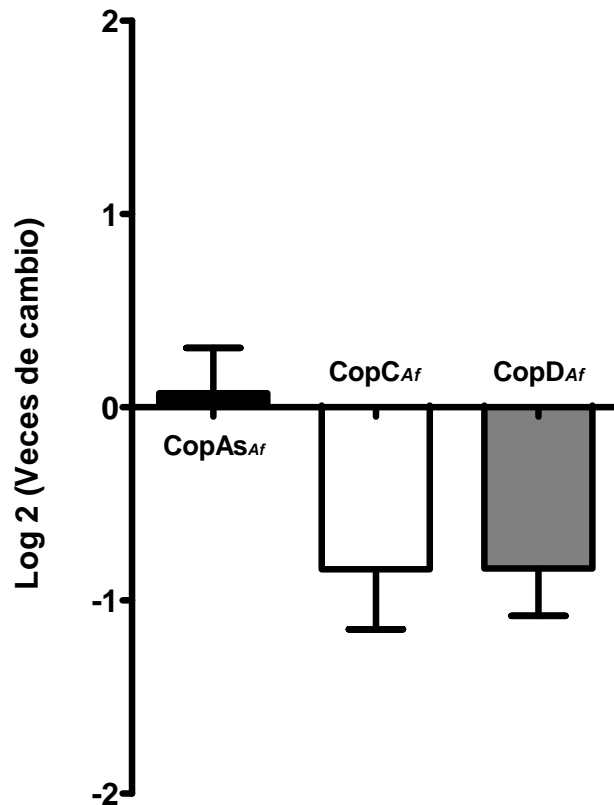
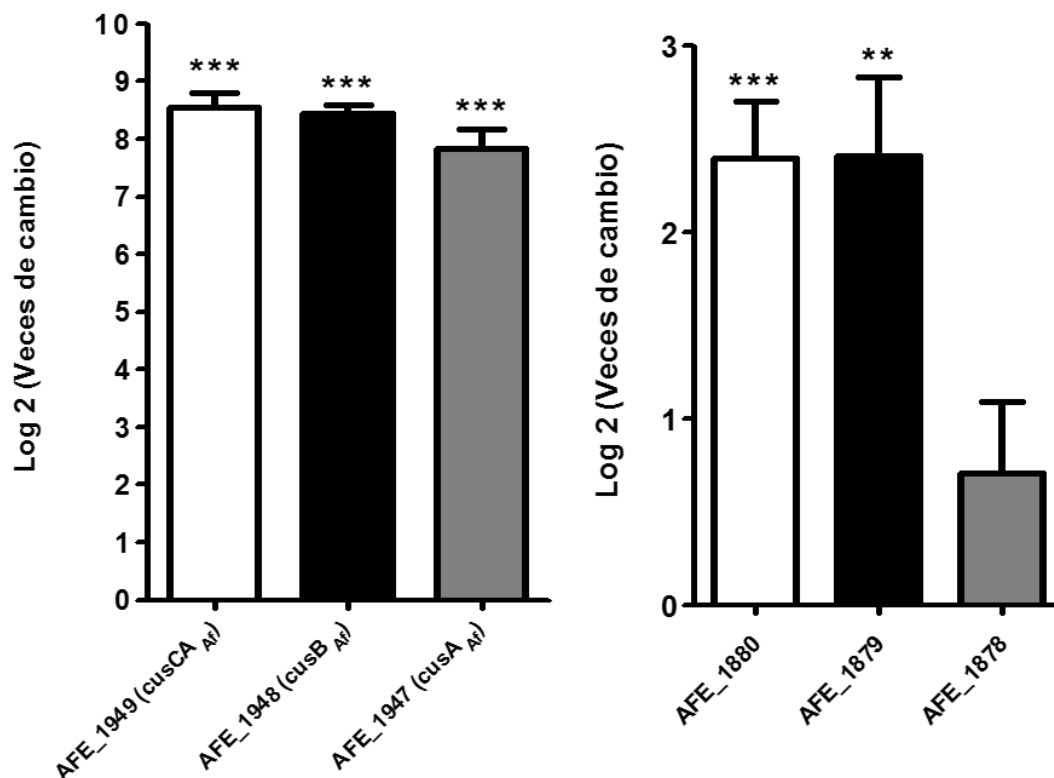


FIGURA 8. Niveles relativos de mRNAs de genes que codifican posibles proteínas de resistencia a cobre. Las células se crecieron en azufre en presencia de  $\text{CuSO}_4$  50 mM. Se muestran los cambios en los niveles transcripcionales comparados con la bacteria crecida en ausencia de  $\text{CuSO}_4$ . Los datos se normalizaron usando los valores de expresión del gen del rRNA 16S<sub>Af</sub>. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres a cinco valores experimentales (réplicas biológicas).

En *A. ferrooxidans* crecidos en hierro en presencia de  $\text{CuSO}_4$  50 mM se observaron resultados similares: una fuerte sobreexpresión de los genes que codifican para el posible sistema de transporte del tipo RND CusCBA<sub>Af</sub> (CusC<sub>Af</sub>, CusB<sub>Af</sub>, CusA<sub>Af</sub>) y para el posible sistema de eflujo del tipo RND codificado por los genes AFE\_1878, AFE\_1879 y AFE\_1880 (figura 9). Mientras que la expresión de algunos posibles determinantes de resistencia a cobre presentes en el genoma de *A. ferrooxidans*

tales *copD<sub>Af</sub>* y *copC<sub>Af</sub>* se sobreexpresaron levemente y *copAs<sub>Af</sub>* se observó disminuido (figura 10).



**FIGURA 9. Niveles relativos de mRNAs de genes que codifican posibles sistemas de eflujo del tipo RND.** Las células se crecieron en hierro en presencia de  $\text{CuSO}_4$  50 mM. Los cambios en los niveles transcripcionales se compararon con los de la bacteria crecida en ausencia de  $\text{CuSO}_4$ . Los datos se normalizaron usando los valores de expresión del gen del rRNA 16S<sub>Af</sub>. Los asteriscos representan \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$  comparados al valor control en ausencia de cobre. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres a cinco valores experimentales (réplicas biológicas).

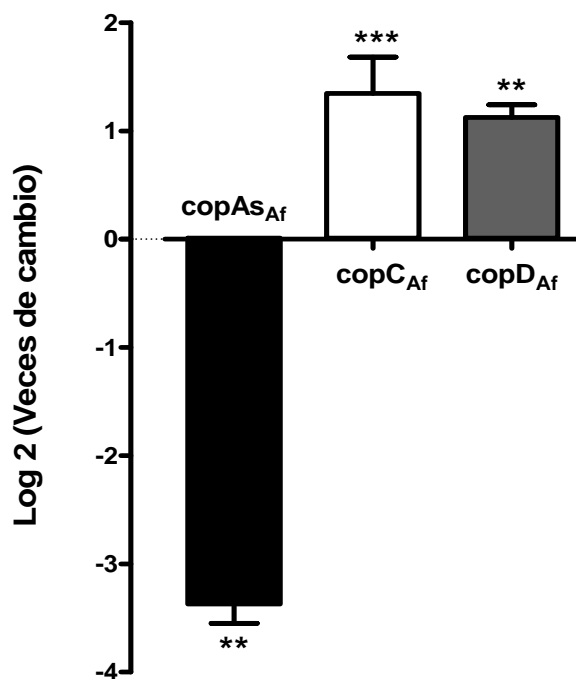


FIGURA 10. Niveles relativos de mRNAs de posibles genes que codifican proteínas de resistencia a cobre. Las células se crecieron en hierro en presencia de CuSO<sub>4</sub> 50 mM. Los cambios en los niveles transcripcionales se compararon con los de la bacteria crecida en ausencia de CuSO<sub>4</sub>. Los asteriscos representan \*\* p< 0,005 y \*\*\* p<0,0001 comparados al valor control en ausencia de cobre. Los datos se normalizaron usando los valores de expresión del gen del rRNA 16S<sub>Af</sub>. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres a cinco valores experimentales (réplicas biológicas).

También se observó el aumento del mRNA que codifica a la proteína DsbG-L en *A. ferrooxidans* crecido en hierro en presencia de CuSO<sub>4</sub> 20, 30 y 50 mM (figura 11), concordante con lo observado en el análisis por proteómica bidimensional.

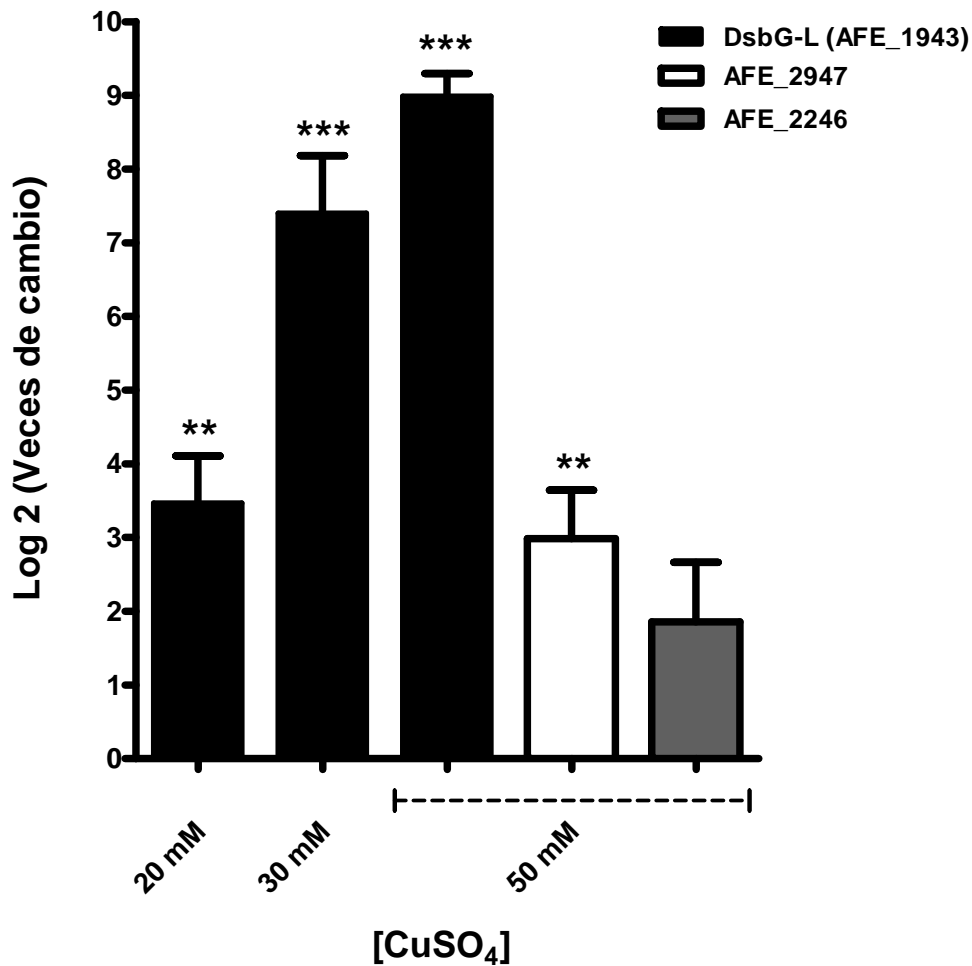


FIGURA 11. Niveles relativos de mRNAs de los genes AFE\_1943 (DsbG-L), AFE\_2947 y AFE\_2246 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en presencia de cobre. Las células se crecieron en hierro en presencia de CuSO<sub>4</sub> 20, 30 y 50 mM. Se comparan los niveles transcripcionales con los de la bacteria crecida en ausencia de CuSO<sub>4</sub>. Los asteriscos indican \*\* p < 0,005 y \*\*\* p < 0,0001 comparados al valor control en ausencia de cobre. Los datos se normalizaron usando los valores de expresión del gen del rRNA 16S<sub>Af</sub>. Las barras de error indican las desviaciones estándar derivadas desde tres a cinco valores experimentales (réplicas biológicas).

### 5.3. Función de DsbG-L en la resistencia a cobre en *E. coli*

Se determinó la funcionalidad de DsbG-L evaluando la resistencia a cobre de *E. coli* que expresa heterológicamente la proteína de *A. ferrooxidans*. Para ello el gen AFE\_1943 (*dsbG-L*) se clonó en el vector pBAD TOPO cuya expresión es inducible por arabinosa y reprimible por glucosa. La figura 12 muestra un aumento en la resistencia a cobre en la cepa de *E. coli* que expresa la proteína DsbG-L indicado por un halo de inhibición más pequeño (figura 12a) y un mayor crecimiento en presencia de cobre, comparado con las cepas sin inducción (figura 12b).

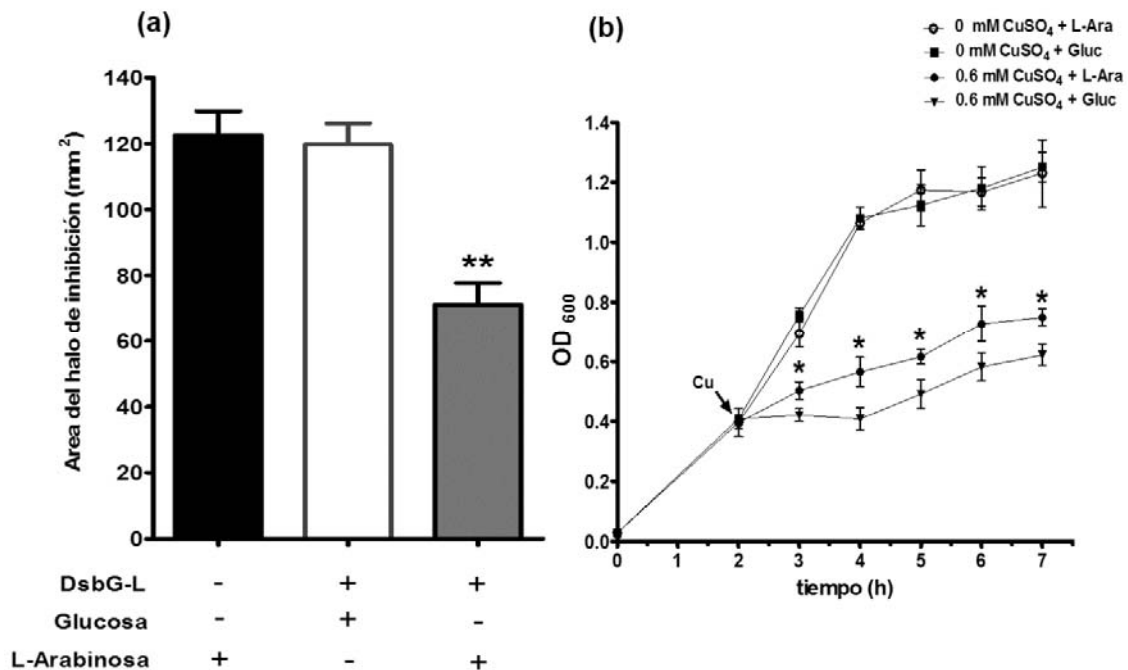
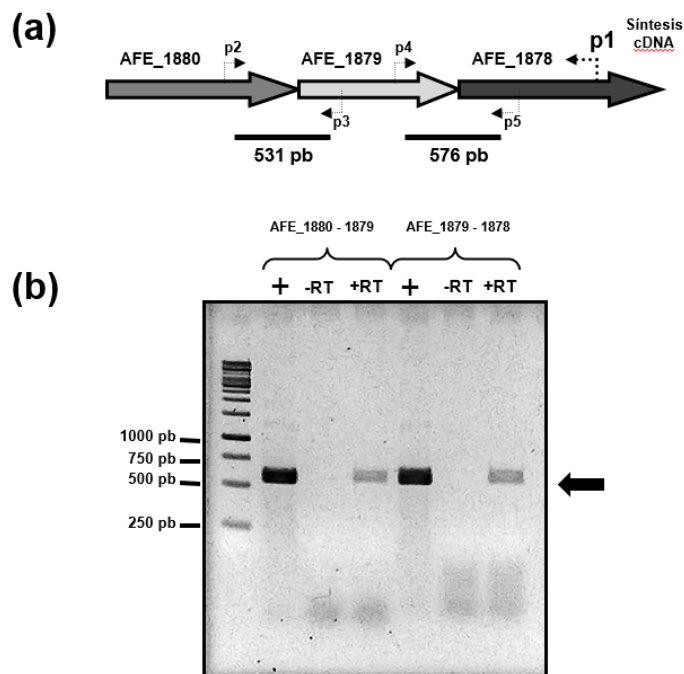


FIGURA 12. DsbG-L de *A. ferrooxidans* confiere resistencia a cobre en *E. coli*. (a) *E. coli* Top-10 transformada con el plasmidio pBAD-TOPO que contiene el gen heterólogo de *A. ferrooxidans dsbG-L* se creció en presencia de glucosa (expresión no inducida, barra blanca) o en la presencia de L-arabinosa (expresión inducida, barra gris). El control correspondió a la misma cepa bacteriana transformada con el plasmidio sin inserto (gen DsbG-L) (barra negra). Para cada caso, se determinó las áreas de los halos de inhibición. (b) Curvas de crecimiento de *E. coli* K-12  $\Delta copA/\Delta cusCFBA/\Delta cueO$  transformadas por el vector pBAD-TOPO-*dsbG-L* crecidas en presencia o ausencia de CuSO<sub>4</sub> 0,6 mM y en la presencia de glucosa o L-arabinosa. La flecha indica el tiempo en que el cobre fue agregado al cultivo. Los asteriscos indican \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  y \*\*\*  $p < 0,0001$  comparados al control en ausencia de cobre. Las barras de error indican las desviaciones estándar obtenidas desde tres a cinco valores experimentales (réplicas biológicas).



#### 5.4. Análisis de co-transcripción de genes

Los sistemas de eflujo del tipo RND tradicionalmente contienen tres diferentes proteínas estructurales codificadas en un operón (Nikaido, 2011). Para analizar si el grupo de genes AFE\_1878, AFE\_1879 y AFE\_1880 se co-transcriben formando parte de una unidad genética funcional, se realizaron experimentos de RT-PCR. En la figura 13 se observan los segmentos intergénicos amplificados desde el cDNA de *A. ferrooxidans*, demostrando relaciones de co-transcripción entre los genes.



**FIGURA 13. Los genes del nuevo posible sistema del tipo RND se co-transcriben. (a)** Se señala la posición relativa de los genes AFE\_1880, AFE\_1879, AFE\_1878 (flechas grises), el lugar de los partidores usados (flechas punteadas), los productos intergénicos y sus tamaños esperados (barras negras horizontales). El RNA total de *A. ferrooxidans* se extrajo en fase exponencial tardía desde un cultivo adaptado a CuSO<sub>4</sub> 50 mM. El cDNA se sintetizó con un partidor (p1) que hibridiza en el final 3' de AFE\_1878. La amplificación por PCR de las regiones intergénicas entre AFE\_1880-1879 Y AFE\_1879-1878 se realizó utilizando cDNA como templado y los pares de partidores p2-p3 y p4-p5 respectivamente. **(b)** Se muestran los resultados obtenidos después de 35 ciclos de amplificación. La reacción de PCR se realizó usando un templado de cDNA sintetizado en la presencia (+RT) o ausencia (-RT) de transcriptasa reversa. Los fragmentos de DNA amplificados se separaron por electroforesis en gels de agarosa y se indican por la flecha negra.

## **5.5. Cambios cuantitativos en el proteoma total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en azufre y en presencia de cobre 50 mM**

Para profundizar en el estudio de los determinantes de resistencia a cobre de *A. ferrooxidans*, se analizó por proteómica cuantitativa por ICPL muestras de proteínas totales de esta bacteria crecida en ausencia o adaptada a la presencia de CuSO<sub>4</sub>. La proteómica ICPL es una poderosa técnica que combina la marcación de proteínas con isótopos estables con espectroscopía de masas para identificar y cuantificar mezclas complejas de proteínas. En términos generales, se marcan diferentes estados del proteoma provenientes de dos condiciones experimentales distintas (presencia y ausencia de CuSO<sub>4</sub>) con un isótopo liviano (C<sup>12</sup>) y un isótopo pesado (C<sup>13</sup>) respectivamente. Estas muestras se mezclaron y separaron mediante electroforesis y se digirieron enzimáticamente para identificar y cuantificar mediante LC ESI IT-MS (cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray y trampa de iones) los péptidos que exhiben cambios en sus niveles como consecuencia de las diferentes condiciones experimentales.

Se analizó por proteómica ICPL las muestras proteicas provenientes de *A. ferrooxidans* crecido en azufre y adaptados a CuSO<sub>4</sub> 0 o 50 mM. En esta condición se observó proteínas que cambian sus niveles en presencia de cobre comparadas con la condición control (ausencia de cobre). La Tabla 3 señala el número total de proteínas identificadas y las proteínas que aumentan o disminuyen sus niveles.

TABLA 3. Resultados globales de las proteínas de *A. ferrooxidans* crecidos en azufre y cuantificados por ICPL

Categoría	Número
Proteínas identificadas	366
Proteínas que experimentaron cambios	47
Proteínas que aumentaron sus niveles	24
Proteínas que disminuyeron sus niveles	23

Las proteínas que modificaron sus niveles se agruparon según sus categorías funcionales mediante la clasificación otorgada por la base de datos COG (Clusters of Orthologous Groups). Para las proteínas cuyos ORFs no tenían COG asociado se clasificaron usando la herramienta bioinformática COGnitor que permite asignar un COG en base a la secuencia de la proteína (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/xognitora.html>) (figura 14).

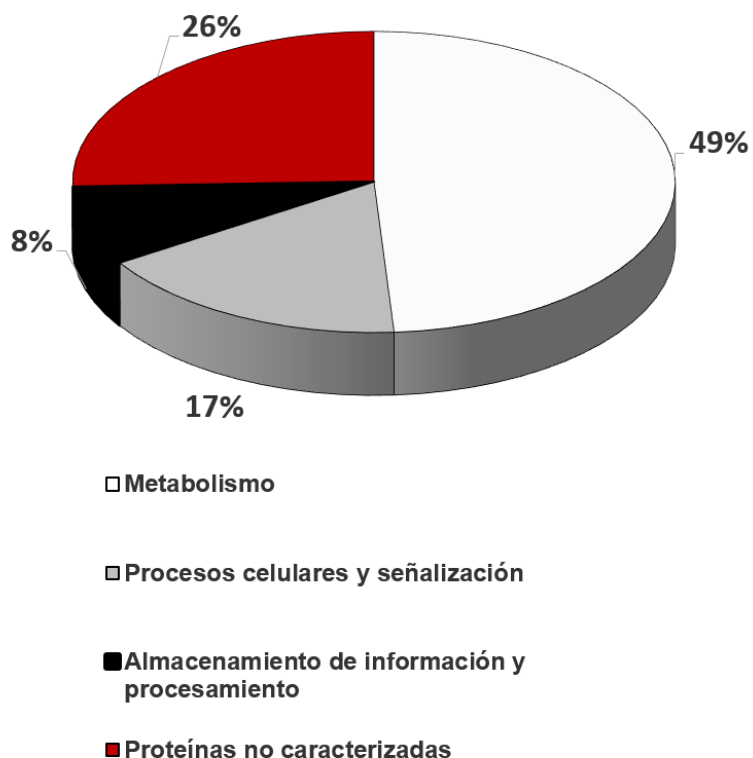
La categoría funcional con el mayor número de cambios por la presencia de  $\text{CuSO}_4$  50 mM corresponde al metabolismo (49%), representados por 23 proteínas que experimentaron aumentos o disminución de sus niveles (figura 14).

Al desglosar la categoría de metabolismo, se observa que un número importante de proteínas reguladas por cobre corresponden a aquellas agrupadas en la función biológica de metabolismo y transporte de iones inorgánicos, las que representan el 26 % (6 de 23) de la categoría. La importancia en este grupo de proteínas radica en que la mayoría de los mecanismos de resistencia a altas concentraciones de cobre identificados en otros microorganismos se llevan a cabo por proteínas clasificadas dentro de esta categoría.

Otra función biológica agrupada dentro de la categoría de metabolismo y que en los experimentos estuvo fuertemente representada corresponde a la producción de energía y conversión.

La segunda categoría más afectada por el estrés por cobre corresponde a procesos celulares y señalización (17 %), los que incluyen el proceso de modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas, representado por el 50 % de la categoría. Este proceso incluye proteínas que aumentaron sus niveles en presencia de cobre y que están involucradas en la defensa contra del estrés oxidativo probablemente provocado por el metal.

Por otro lado, un 8 % de las proteínas reguladas por la presencia de cobre corresponden a aquellas agrupadas en la categoría de almacenamiento de información y procesamiento. El porcentaje restante corresponde a aquellas proteínas cuya función es desconocida y que se agruparon en la categoría de proteínas no caracterizadas y sin homólogos en la base de datos, con función desconocida y que probablemente son únicas de *A. ferrooxidans*.



Categoría Funcional	n° prot.	prot. +	prot. -
<b>Metabolismo</b>			
Metabolismo y Transporte de iones inorgánicos	6	3	3
Metabolismo y Transporte de aminoácidos	4	1	3
Metabolismo y Transporte de carbohidratos	1	0	1
Metabolismo y Transporte de nucleótidos	1	0	1
Biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo	1	0	1
Producción de energía y conversión	10	8	2
<b>Procesos celulares y señalización</b>			
Motilidad celular y secreción	3	3	0
Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas	4	2	2
Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular	1	0	1
<b>Almacenamiento de información y procesamiento</b>			
Procesamiento del RNA y modificación	1	0	1
Replicación, recombinación y reparación	2	1	1
Transcripción	1	1	0
<b>Proteínas no caracterizadas</b>			
Solo con función general predicha	2	1	1
Función desconocida	10	4	6
<b>TOTAL</b>	<b>47</b>	<b>24</b>	<b>23</b>

FIGURA 14. Categorías funcionales y número de proteínas que cambian sus niveles de síntesis en células crecidas en azufre y en presencia de cobre. El gráfico de torta se refiere a las proteínas indicadas en la Tabla.

## 5.6. Cambios cuantitativos en el proteoma total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en hierro y en presencia de cobre 40 mM

Se analizaron muestras provenientes de *A. ferrooxidans* crecido en hierro y adaptados a  $\text{CuSO}_4$  0 o 40 mM por proteómica ICPL. Se observó proteínas que cambian sus niveles en presencia de cobre comparadas con la condición control (ausencia de cobre). La Tabla 4 señala el número global de proteínas identificadas, y las proteínas que aumentan y disminuyen sus niveles.

TABLA 4. Resultados globales de las proteínas de *A. ferrooxidans* crecidos en hierro y cuantificados por ICPL

Categoría	Número
Proteínas identificadas	594
Proteínas que experimentaron cambios	120
Proteínas que aumentaron sus niveles	76
Proteínas que disminuyeron sus niveles	44

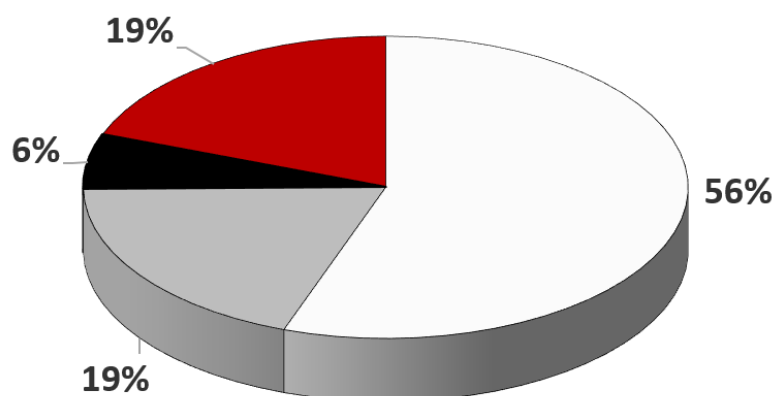
Al igual que las muestras de *A. ferrooxidans* crecidos en azufre, la categoría funcional que experimentó más cambios fue el metabolismo (56%) (figura 15). Al desglosar esta categoría en los diferentes procesos celulares, se observa que una de las funciones que mostró la mayor cantidad de cambios fue el metabolismo y transporte de aminoácidos, constituyendo el 23 % de la categoría.

Adicionalmente, un importante número de proteínas reguladas por la presencia de cobre están agrupadas dentro del proceso celular de metabolismo y transporte de iones inorgánicos, representando el 13% de la categoría.

La segunda categoría funcional más afectada por cobre corresponde a procesos celulares y señalización (19%), donde el proceso de modificación postraducciona, recambio de proteínas y chaperonas presenta la mayor cantidad de cambios, constituyendo un 57% de la categoría.

Finalmente, el 19 % de las proteínas corresponden a la categoría de proteínas no caracterizadas.

Las proteínas de *A. ferrooxidans* identificadas por ICPL y cuyos niveles de síntesis se modificaron por la presencia de cobre en ambos sustratos oxidables se señalan en las Tablas 5-8.



- Metabolismo
- Procesos celulares y señalización
- Almacenamiento de información y procesamiento
- Proteínas no caracterizadas

Categoría Funcional	n° prot.	prot. +	prot. -
<b>Metabolismo</b>			
Metabolismo y Transporte de iones inorgánicos	9	7	2
Metabolismo y Transporte de aminoácidos	16	15	1
Metabolismo y Transporte de carbohidratos	12	6	6
Metabolismo y Transporte de nucleótidos	5	2	1
Metabolismo y Transporte de lípidos	2	1	1
Metabolismo y Transporte de coenzimas	4	2	2
Producción de energía y conversión	20	10	10
<b>Procesos celulares y señalización</b>			
Motilidad celular y secreción	4	3	1
Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas	13	9	4
Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular	4	3	1
Mecanismo de traducción de señales	2	1	1
<b>Almacenamiento de información y procesamiento</b>			
Replicación, recombinación y reparación	1	1	0
Transcripción	4	1	3
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	2	0	2
<b>Proteínas no caracterizadas</b>			
Solo con función general predicha	3	3	0
Función desconocida	20	11	9
<b>TOTAL</b>	<b>120</b>	<b>76</b>	<b>44</b>

FIGURA 15. Categorías funcionales y número de proteínas que cambian sus niveles de síntesis en células crecidas en hierro y en presencia de cobre. El gráfico de torta se refiere a las proteínas indicadas en la Tabla.



TABLA 5. Proteínas aumentadas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en azufre en presencia de CuSO<sub>4</sub> 50 mM

Número de Acceso	AFE	Nombre / Función	Score	Cobertura (%)	Número de péptidos	Veces de cambio (Cu 50 mM/0 mM)
<b>Metabolismo</b>						
<b>Metabolismo y Transporte de iones inorgánicos</b>						
B7JC44	1948	Transportador, Eflujo de metales pesados, Subunidad MFP putativa (CusBAf)	41,43	8,88	6	8,07
B7JC43	1947	Bomba de eflujo de metales pesados, familia CzcA (CusAAf)	69,06	5,4	5	3,7
B7JBW5	1862	Proteína de unión a metales pesados putativa	191,6	78,37	8	1,3
<b>Producción de energía y conversión</b>						
B7JAQ6	3152	Citocromo <i>c</i> 552 (Cyc1)	39,67	7,39	2	6,7
B7JAQ7	3153	Citocromo <i>c</i> (Cyc2)	82,07	4,53	4	4,54
B7JAQ4	3149	Citocromo <i>c</i> oxidasa, <i>tipo-aa</i> 3, subunidad II (coxA)	116,6	5,42	4	4,2
B7J8G2	2731	Ubiquinol--citocromo <i>c</i> reductasa, citocromo <i>cI</i> subunidad (petC-2)	56,37	10,72	3	4,2
B7JAQ3	3150	Citocromo <i>c</i> oxidasa, <i>tipo-aa</i> 3, subunidad I (coxB)	57,63	6,69	2	2,2
B7J5Z3	697	S-(Hidroximetil)glutation deshidrogenasa/clase III alcohol deshidrogenasa	53,03	2,98	1	2,1
B7JAQ0	3146	Rusticianina	634,9	18,18	30	1,8
B7J8F9	2728	Oxidoreductasa, Familia de dehidrogenasa/reductasa de cadena corta (Sdr2)	49,98	7,8	2	1,8
<b>Metabolismo y Transporte de aminoácidos</b>						
B7J7V2	2638	Ribonucleósido-difosfato reductasa (nrdA)	91,41	7,8	8	1,49
<b>Procesos celulares y señalización</b>						
<b>Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas</b>						
B7J4B7	367	Antioxidante, Familia AhpC/Tsa	226,9	42,51	13	1,8
B7J7G1	985	Proteína con dominio glutaredoxina, Familia AhpC/Tsa	833,6	51,5	90	1,75
<b>Motilidad celular y secreción</b>						
B7J4F9	416	Pilin, putativa	53,96	12,35	7	6,25
B7J8D4	2702	Proteína de adherencia estrecha TadA, putativa	103,9	8,55	4	2,3
B7J8D3	2701	Proteína de adherencia estrecha TadB, putativa	57,01	9,58	2	2,3
<b>Almacenamiento de información y procesamiento</b>						
<b>Transcripción</b>						
B7J9S8	2955	Regulador de respuesta de unión al DNA dependiente de Sigma-54 , putativo	153	6,56	3	1,5
<b>Replicación, recombinación y reparación</b>						
B7JB75	3194	Helicasa de DNA dependiente de ATP, Proteína con dominio RecG	63,1	5,95	3	14,3
<b>Proteínas no caracterizadas</b>						
<b>Solo función General predicha</b>						
B7JBY6	1884	Chaperona RNA Hfq	82,45	26,13	5	2,6
<b>Función desconocida</b>						
B7J8C6	2694	Proteína hipotética	113	20,75	6	4
B7J6X0	2430	Proteína hipotética	45,81	6,57	2	3,8
B7J8D7	2705	Proteína hipotética	61,65	6,19	2	3,3
B7JAQ5	3151	Proteína hipotética	61,58	9,28	2	2,9

TABLA 6. Proteínas disminuidas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en azufre en presencia de CuSO<sub>4</sub> 50 mM

Número de Acceso	AFE	Nombre / Función	Score	Cobertura (%)	Número de péptidos	Veces de cambio (Cu 50 mM/0 mM)
<b>Metabolismo</b>						
<b>Metabolismo y Transporte de iones inorgánicos</b>						
B7JBD8	3260	Canal mecanosensitivo de larga conductancia (MscL)	71,95	9,93	3	0,133
B7J3K3	105	Transportador de iones metálicos, familia NRAMP	50,74	5,46	5	0,22
B7J8H1	2741	Proteína de membrana externa Omp 40 (Omp40)	87,29	2,48	6	0,31
<b>Metabolismo y Transporte de aminoácidos</b>						
B7JA14	3041	Histidinol dehidrogenasa (HisD)	71,07	5,77	2	0,47
B7JBF5	3277	Argininosuccinato liase (ArgH)	52,71	4,98	2	0,47
B7JBS5	1819	Succinil-diaminopimelato desuccinilase (DapE)	48,53	2,88	1	0,48
<b>Metabolismo y Transporte de carbohidratos</b>						
B7J7C0	943	Fosfomanomutasa putativa	42,95	3,31	1	0,44
<b>Metabolismo y Transporte de nucleótidos</b>						
B7J4N4	2023	Fosforibosilglicinamida formiltransferasa 2	63,09	7,11	2	0,45
<b>Biosíntesis de metabolitos secundarios</b>						
B7J3C9	29	Tetrionato hidrolasa (TetH)	303,7	9,62	21	0,31
<b>Producción de energía y conversión</b>						
B7J6F2	2388	2-octaprenil-6-metoxifenol hidroxilasa (UbiH-2)	62,16	5,87	2	0,46
B7J7U3	2628	NADH-quinona oxidoreductasa subunidad C (NuoC)	60,49	6,44	2	0,5
<b>Procesos celulares y señalización</b>						
<b>Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas</b>						
B7JA11	3038	Proteína similar a Glutaredoxina	49,55	11,82	1	0,45
B7JAR2	3158	Proteína Heat shock HtpG	229,5	11,29	9	0,64
<b>Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular</b>						
B7J9U9	2976	Glicosil transferasa Group 1	95,4	3,6	1	0,43
<b>Almacenamiento de información y procesamiento</b>						
<b>Procesamiento del RNA y modificación</b>						
B7JBN1	1775	PoliA polimerasa (PcnB)	123,9	5,24	3	0,52
<b>Replicación, recombinación y reparación</b>						
B7JAG0	1584	Proteína de la familia HU, proteína de unión al DNA	267,7	35,16	9	0,64
<b>Proteínas no caracterizadas</b>						
<b>Solo función General predicha</b>						
B7J5N8	2251	Proteína con dominio PQQ	167,1	14,68	10	0,08
<b>Función desconocida</b>						
B7J8Z8	2805	Proteína hipotética	60,77	6,21	1	0,19
B7J7S0	2603	Proteína hipotética	42,04	8,87	1	0,29
B7J7F3	977	Proteína hipotética	45,94	11,8	6	0,45
B7JB10	1671	Proteína hipotética	65,13	4,84	3	0,49
B7JC39	1942	Proteína hipotética	46,19	12,2	5	0,5
B7J7W2	2648	Proteína hipotética	147,6	9,03	2	0,53

TABLA 7. Proteínas incrementadas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en hierro en presencia de CuSO<sub>4</sub> 40 mM

Número de Acceso	AFE	Nombre / Función	Score	Cobertura (%)	Número de péptidos	Veces de cambio (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Metabolismo</b>						
<b>Metabolismo y Transporte de iones inorgánicos</b>						
B7JBW5	1862	Proteína de unión a metales pesados putativa	353,9	78,38	11	14,78
B7JC44	1948	Transportador, Eflujo de metales pesados, Subunidad MFP putativa (CusBAf)	240	23,23	16	14,68
B7JC45	1949	Proteína de membrana externa, eflujo de metales pesados putativa (CusCAf)	188,6	16,16	13	11,41
B7JC43	1947	Bomba de eflujo de metales pesados, familia CzcA (CusAAf)	114,4	10,23	12	6,86
B7J3E4	43	Proteína de unión a soluto periplasmático putativa	363,6	31,25	24	5,54
B7J5B8	602	Transportador de cationes del tipo ABC, proteína de unión a cationes periplasmáticos putativa	43,78	9,18	2	4,97
B7JAJ7	3093	Proteína de canal de cation putativa	95,58	8,81	4	4,39
<b>Metabolismo y Transporte de aminoácidos</b>						
B7J7F7	981	Glicina deshidrogenasa, descarboxilacion(GcvP)	45,53	2,68	1	8,86
B7JAM5	3121	Componente alfa de sulfito reductasa [NADPH] flavoproteína (CysJ)	815,5	37,07	36	6,99
B7JA16	3043	Imidazol glicerol-fosfato deshidratasa (HisB)	70,64	10,55	3	6,15
B7JAH3	3064	Glutamato-cisteína ligasa	115,3	10,32	8	5,83
B7JA14	3041	Histidinol deshidrogenasa (HisD)	170,8	16,86	9	5,56
B7JA17	3044	Subunidad de Imidazol glicerol fosfato sintasa (HisH)	59,14	27,35	5	4,84
B7JAM9	3125	Sulfato adenililtransferasa, subunidad grande (CysN)	560,8	30,88	26	4,8
B7JAM8	3124	Sulfato adenililtransferasa, subunidad pequeña (CysD-2)	189,7	21,79	13	4,68
B7J9U4	2971	Sulfato adenilato transferasa, subunidad grande/adenilil sulfato kinasa (CysNC)	72,4	3,47	2	4,6
B7JAM6	3122	Sulfito reductase [NADPH] hemoproteína, componente beta (CysI)	454	22,02	23	4,56
B7JAM7	3123	Adenilil sulfato reductasa, dependiente de tioredoxina	72,73	18,78	6	4,18
B7JA15	3042	Histidinol-fosfato aminotransferasa (HisC-1)	122,9	7,52	3	4,04
B7JA13	3040	ATP fosforibosiltransferasa (HisG)	65,42	17,67	7	4,04
B7JA19	3046	Subunidad de Imidazol glicerol fosfato sintasa (HisF)	423,1	35,97	13	3,96
B7JA18	3045	1-(5-fosforibosil)-5-[(5-fosforibosilamino)metilideneamino] imidazol-4-carboxamida isomerasa (HisA)	200,3	22,31	7	3,96
<b>Metabolismo y Transporte de carbohidratos</b>						
B7J693	2324	Fosfoglucomutasa putativa	162,6	12,71	10	7,91
B7JA25	3052	Ribulosa bisfosfato carboxilasa, subunidad pequeña (CbbS-1)	255,9	44,07	10	7,24
B7JA24	3051	Ribulosa bisfosfato carboxilasa, subunidad grande (CbbL-1)	523,8	39,11	37	6,94
B7J9Z1	3018	Fosfoenolpiruvato-proteína fosfotransferasa (PtlI)	106	9,3	7	5,77
B7J9Z6	3023	Fosfoenolpiruvato dependiente de azúcar Sistema PTS, componente EIIA	192,7	37,84	13	4,58
B7JBW0	1857	Glucosa 1-deshidrogenasa, putativa	188,5	15,33	6	4,49
<b>Metabolismo y Transporte de nucleótidos</b>						
B7JAG8	3059	Aspartato carbamoiltransferasa (PyrB)	104,6	11,62	4	6,39
B7JAG9	3060	Proteína bifuncional PyrR	49,15	28,57	4	4,4
<b>Producción de energía y Conversión</b>						
B7J6F2	2388	2-octaprenil-6-metoxifenol hidroxilasa (UbiH-2)	53,51	6,36	2	15,92
B7J7D1	955	Citocromo <i>d</i> ubiquinol oxidasa, subunidad I (CydA)	136,5	6,83	9	11,01
B7J7D0	954	Citocromo <i>d</i> ubiquinol oxidasa, subunidad II (CydB)	74,49	7,16	8	6,44
B7JAH4	3065	Citrato sintasa II (CitZ)	80,53	15,8	11	5,77
B7JAI8	3079	Proteína de la familia Nitroreductasa	101,3	31,66	8	5,62
B7JBR9	1813	Complex deshidrogenasa, componente E1, subunidad alfa, putativa	134	14,97	8	4,62
B7J8A9	2677	Proteína con dominio 3-deoxi-D-mano-octulosónico-ácido transferasa	80,05	10,58	2	4,48
B7JAH7	3068	Complejo Piruvato deshidrogenasa, componentes E2 y E3	836,4	21,46	32	4,17
B7JBR4	1808	Fosfato acetil/butiril transferasa	57,83	9,12	4	4,1
B7JBR7	1811	Ácido 2-oxo deshidrogenasa, aciltransferasa, putativa	103,9	13,27	8	3,86

TABLA 7. Continuación

Número de Acceso	AFE	Nombre / Función	Score	Cobertura (%)	Número de péptidos	Veces de cambio (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Metabolismo y Transporte de lípidos</b>						
B7J498	2017	Familia PspA/IM30	362	49,59	32	6,51
<b>Metabolismo y Transporte de coenzimas</b>						
B7J5J4	2206	Nicotinato-nucleótido pirofosforilasa	43,74	9,09	3	4,14
B7JAC2	1545	Proteína de unión a pterina -Molibdeno	335,5	42,65	32	4,07
<b>Procesos celulares y señalización</b>						
<b>Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas</b>						
B7JC40	1943	Proteína con dominio DsbG (DsbG-L)	45,66	10,67	7	15,54
B7JAL7	3113	Proteína de la biogénesis del Citocromo tipo - c (ResC)	87,82	2,55	2	10,11
B7JA11	3038	Glutaredoxina	224,3	40	7	5,84
B7JAL6	3112	Proteína de la biogénesis del Citocromo tipo - c (ResB)	428,5	21,5	19	4,86
B7J3S3	177	Proteína de la familia Glutathion S-transferasa	73,28	11	2	4,71
B7J4U6	2086	Proteína Heat shock, familia Hsp20	345,7	59,31	23	3,9
B7JAH2	3063	Glutathion sintetasa	60,93	8,65	3	3,88
B7J927	2834	Proteína con dominio SPFH/Band 7	49,64	13,14	5	3,84
<b>Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular</b>						
B7J3V6	210	UDP-N-acetilmuramilo-tripeptido--D-alanil-D-alanina ligasa (MurF)	53,47	6,22	2	27,81
B7JA12	3039	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa (MurA)	111,5	10,4	5	5,13
B7J7B8	941	Mureína transglucosilasa, putativa	49,34	3,13	2	3,91
<b>Motilidad celular y secreción</b>						
B7JA21	3048	Proteína translocase TaaA 1 (Independiente de sec)	218,1	41,66	6	15
B7J3D3	32	Proteína de membrana interna (OxaA)	50,78	6,62	4	12,05
B7J8E2	2710	Pilin, putative	63,91	10,13	1	6,52
<b>Mecanismo de traducción de señales</b>						
B7J9Z5	3022	Hpr(Ser) kinasa/Fosfatasa (HprK)	68,64	16,45	6	5,05
<b>Almacenamiento de información y procesamiento</b>						
<b>Replicación, recombinación y reparación</b>						
B7JAJ8	3094	DNA polimerasa I	152,3	7,89	8	4,91
<b>Traducción, estructura ribosomal y biogénesis</b>						
B7J9Z7	3024	Subunidad Ribosomal proteína de interfase (YfiA)	77,87	28,32	4	4,64
<b>Proteínas no caracterizadas</b>						
<b>Solo función General predicha</b>						
B7J4E4	401	Proteína con dominio Roadblock/LC7	40,85	10,29	1	12,04
B7J7R8	3118	Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa	1370	65,69	111	7,81
B7J6R1	846	Alcohol dehidrogenasa que contiene zinc	74,22	12,89	10	5,36
B7JAK7	3103	Proteína con dominio Fosforibosil transferasa	53,69	10,81	2	4,83
<b>Función desconocida</b>						
B7J3N6	139	Proteína hipotética	57,69	4,33	1	16,13
B7J3E3	42	Proteína hipotética	83,41	8,89	5	11,24
B7JAM4	3120	Proteína hipotética	40,54	12,5	2	8,55
B7J4M9	2018	Proteína hipotética	188,5	12,41	9	6,98
B7J8K8	2783	Proteína hipotética	164,7	31,37	8	6,83
B7J4N0	2019	Proteína hipotética	68,65	10,76	6	6,42
B7J446	302	Proteína hipotética	88,28	37,63	5	5,32
B7JAN1	3127	Proteína hipotética	124,5	26,49	4	4,86
B7J4X2	2114	Proteína hipotética	76,71	10,05	5	4,21
B7JAL8	3114	Proteína hipotética	52,3	7,44	1	4,21
B7JBF1	3273	Proteína hipotética	103	31,78	7	3,86

TABLA 8. Proteínas disminuidas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en hierro en presencia de CuSO<sub>4</sub> 40 mM

Número de Acceso	AFE	Nombre / Función	Score	Cobertura (%)	Número de péptidos	Veces de cambio (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Metabolismo</b>						
<b>Metabolismo y Transporte de iones inorgánicos</b>						
B7J8H1	2741	Proteína de membrana externa Omp 40 (Omp40)	71,95	4,46	4	0,14
B7J4Q1	2040	Receptor dependiente de TonB	72,83	2,41	2	0,43
<b>Metabolismo y Transporte de aminoácidos</b>						
B7J4S9	2069	Triptofano sintasa cadena beta	42,89	3,01	2	0,94
<b>Metabolismo y Transporte de carbohidratos</b>						
B7J5W5	669	Proteína de la familia Inositol monofosfato	39,64	16,1	3	0,44
B7JB29	1690	Ribulosa bifsosfato carboxilasa, subunidad pequeña (CbbS-2)	212,7	59,1	9	0,5
B7JB06	1667	Proteína con dominio de unión a transcetolasa piridina	339,3	25,62	33	0,5
B7JB15	1676	Proteína de la familia Fructosa bifsosfato aldolasa clase II	211,5	21,12	10	0,55
B7JB30	1691	Ribulosa bifsosfato carboxilasa, subunidad grande (CbbL-2)	730,5	31,5	45	0,58
B7J9Z3	3020	Sistema PTS, componente IIA, putativa	48,53	5,8	2	0,88
<b>Metabolismo y Transporte de nucleótidos</b>						
B7J5P8	2261	Fosforibosilamina glicina ligasa (PurD)	38,44	2,14	1	0,57
<b>Producción de energía y conversión</b>						
B7JB01	1662	NADH dehidrogenasa, putativa	96,42	4,57	2	0,32
B7JB85	3204	ATP sintasa cadena gama (AtpG)	44,96	3,47	1	0,33
B7J6S4	861	Flavoproteína con dominio globina	75,14	21,57	6	0,4
B7JAQ6	3152	Citocromo <i>c</i> <sub>552</sub> (Cyc1)	108,2	22,17	7	0,56
B7J7L8	2551	Proteína cluster unión Hierro azufre	125,1	12,97	9	0,65
B7JAL5	3111	Ubiquinol--cytochrome c reductasa, subunidad citocromo <i>c</i> <sub>1</sub> (PetC-1)	124	14,46	4	0,81
B7JAQ7	3153	Citocromo <i>c</i> (Cyc2)	146	7,42	11	0,85
B7J7L7	2550	Succinate dehidrogenasa / fumarato reductasa, subunidad C (SdhC)	89,56	6,27	4	0,91
B7J7M0	2553	Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa	391,8	24,5	16	0,92
B7J4H0	427	Succinil-CoA ligasa [que forma ADP] subunidad alfa (SucD)	59,35	12,41	3	0,93
<b>Metabolismo y Transporte de lípidos</b>						
B7J4G3	420	Enoil-[acil-proteína transportadora] reductasa [NADH] (FabL)	340,5	32,29	10	0,93
<b>Metabolismo y Transporte de coenzimas</b>						
B7JB14	1675	Detriobiotina sintetasa (BioD-1)	72,52	3,98	1	0,2
B7J7N6	2569	Octanoiltransferasa	57,81	11,79	2	0,94
<b>Procesos celulares y señalización</b>						
<b>Modificación postraduccional, recambio de proteínas y chaperonas</b>						
B7J7X8	2664	Proteína Chaperone DnaJ	50,23	4,8	2	0,23
B7J5Z2	696	S-(Hidroximetil) glutation sintase (GfA)	124,4	16,49	4	0,63
B7J5N4	2246	Proteína con dominio DsbG	38,44	9,95	2	0,85
B7J789	909	Factor Trigger (TiG)	220,6	14,98	6	0,87
<b>Motilidad celular y secreción</b>						
B7J4F9	416	Pilin, putativa	50,43	10,67	3	0,34
<b>Biosíntesis de envoltura/membrana/ pared celular</b>						
B7J8B7	2685	Proteína de la familia OmpA	43,09	7,65	2	0,2
<b>Mecanismo de traducción de señales</b>						
B7J4Z0	2133	Proteína de la familia de estrés universal	77,39	9,38	1	0,76
<b>Almacenamiento de información y procesamiento</b>						
<b>Traducción, estructura ribosomal y biogénesis</b>						
B7J7G7	991	tRNA (Guanosina-2'-O-)-metiltransferasa, putativa	40,69	3,53	1	0,52
B7J3F7	56	Aspartil-tRNA sintetasa (AspS)	61,18	5,03	4	0,95

TABLA 8. Continuación

Número de Acceso	AFE	Nombre / Función	Score	Cobertura (%)	Número de péptidos	Veces de cambio (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Transcripción</b>						
B7JB07	1668	Regulador transcripcional, familia IclR	46,96	4,63	1	0,67
B7JB92	3211	Proteína de la familia ParB	61,65	7,48	2	0,79
B7J5Q8	2271	Regulador transcriptional, putativo	60,26	8,82	2	0,92
<b>Proteínas no caracterizadas</b>						
<b>Función desconocida</b>						
B7JC77	1982	Proteína hipotética	115,6	18,24	3	0,31
B7JB19	1680	Proteína hipotética	49,15	5,21	1	0,35
B7JB00	1661	Proteína hipotética	302,5	14,06	24	0,37
B7JB09	1660	Proteína hipotética	200,1	18,42	9	0,48
B7JAZ9	1670	Proteína hipotética	52,24	8,56	3	0,48
B7JB05	1666	Proteína hipotética	119,5	15,28	8	0,65
B7JAG1	1585	Proteína hipotética	176,4	41,88	14	0,8
B7JAN9	3135	Proteína hipotética	48,14	17,91	4	0,84
B7J8C6	2694	Proteína hipotética	49,75	3,77	1	0,87

## 6. Discusión

La presencia de determinantes de resistencia a cobre canónicos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 probablemente no explican completamente cómo este microorganismo es capaz de resistir concentraciones de cobre extremas, sugiriendo la existencia de otros mecanismos de resistencia al metal.

*A. ferrooxidans* es capaz de resistir altas concentraciones de cobre (>100 mM) muy por sobre otras bacterias neutrófilas y acidófilas cuyos rangos de resistencia van de 1-8 mM. Por ello, la hipótesis de esta tesis señala que *A. ferrooxidans* presentaría nuevos y eficientes mecanismos de resistencia.

A través de un enfoque proteómico y transcriptómico se ha identificado varias proteínas que cambian sus niveles de síntesis cuando *A. ferrooxidans* crece en presencia de cobre en diferentes medios de crecimiento. Algunas de ellas podrían tener un papel importante en la adaptación del microorganismo a su medio ambiente.

Estas proteínas presentan una amplia variedad de funciones, sugiriendo que *A. ferrooxidans* utilizaría una amplia variedad de estrategias para hacer frente al estrés de cobre.

Dada la diversidad de las proteínas que presentan una expresión diferencial en presencia de cobre, los resultados se han organizado de acuerdo a las diferentes categorías funcionales de los genes implicados.

## 6.1. Metabolismo y transporte de iones inorgánicos

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

*A. ferrooxidans* forma parte de un grupo de microorganismos denominados "acidófilos", cuyo pH óptimo de crecimiento es  $< 3$ . Evolutivamente los acidófilos corresponderían a microorganismos primordiales desde los cuales evolucionaron formas de vida más complejas. Sus procesos metabólicos y características fenotípicas probablemente se originaron y evolucionaron sobre la superficie de minerales como los sulfuros metálicos y la estructuración de su código genético habría tomado lugar en ambientes altamente ácidos y ricos en metales (Baker-Austin y Dopson, 2007). Por ello, se podría pensar que muchas características presentes en *A. ferrooxidans* están fuertemente relacionadas con el medio ambiente extremo en el cual sobrevive. El diseño de mecanismos de resistencia a metales en esta bacteria podría no ser la excepción y es probable que exista una estrecha relación entre la resistencia a metales y el pH de su medio ambiente.

Si bien *A. ferrooxidans* sobrevive a un pH externo ácido, su pH citoplasmático es típicamente 4 a 5 unidades por sobre el pH externo, es decir tolera gradientes de pH ( $\Delta\text{pH} = \text{pH interno} - \text{pH externo}$ ) varios ordenes de magnitud mayores que microorganismos neutrófilos. El gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática contribuye a la fuerza protón motriz (FPM), medida del estado energético de la membrana celular generada por una separación de carga entre el citoplasma y el medio externo creada por un potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) y el  $\Delta\text{pH}$  a través de la membrana. La FPM es utilizada típicamente en procesos



bioenergéticos y por proteínas de membrana que actúan como transportadores secundarios activos que obtienen la energía necesaria para la eliminación del sustrato directamente a partir de la gradiente de protones.

Entre estas proteínas, se encuentran las bombas de eflujo clasificadas en la familia de transportadores RND involucradas en el transporte de sustancias orgánicas, metales de transición y polipéptidos (Piddock, 2006).

Estos sistemas de eflujo tripartito están compuestos por una proteína RND central antiporte protón-sustrato ubicada en la membrana interna, una proteína periplasmática de fusión de membrana y un factor de membrana externa. En *Escherichia coli* el sistema de eflujo del tipo RND involucrado en la resistencia a cobre mejor caracterizado corresponde al translocador de cobre CusCFBA (Magnani y Solioz, 2007; Rensing y Grass, 2002). El sistema Cus transporta cobre desde el periplasma y/o citoplasma a través de la membrana externa hacia el espacio extracelular. Codificado en el operón *cusCFBA*, el gen *cusA* codifica para una proteína de membrana interna que funciona como un transportador secundario central energizado por la FPM y que es responsable de la especificidad del sustrato. Dado el gran  $\Delta pH$  presente en *A. ferrooxidans*, intuitivamente se pensaría que un mecanismo de transporte energizado por el gradiente de protones podría ser más eficiente y favorecido energéticamente, y por lo tanto utilizado preferentemente por este microorganismo como mecanismo de destoxificación en presencia de una sustancia tóxica.

Si bien no existen antecedentes que en microorganismos acidófilos el pH ácido module positivamente la expresión o actividad de bombas de eflujo del tipo RND, existen datos que señalan que *E. coli* durante su paso por el sistema

gastrointestinal, cuyo pH es ácido, elimina agentes tóxicos a través de bombas del tipo RND, mientras que a pH mayores lo hace por transportadores del tipo ABC que utilizan directamente ATP para su funcionamiento (Martins y cols., 2009).

En conexión con estos antecedentes los resultados de este trabajo demostraron que dos sistemas de eflujo del tipo RND se sobreexpresan fuertemente cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se adapta a crecer en altas concentraciones de cobre, lo que sugiere que estos componentes podrían ser parte de importantes sistemas de resistencia al cobre.

En nuestro trabajo, mediante electroforesis en geles 2D identificamos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en presencia de cobre la sobreexpresión de la proteína codificada por AFE\_1949, tanto en el crecimiento de la bacteria en hierro como en azufre.

Por análisis bioinformático se identificó al gen AFE\_1949 como un posible componente de un sistema del tipo RND involucrado en la resistencia a metales similar al sistema Cus de *E. coli* (y que se denominó sistema Cus<sub>Af</sub>), codificado en un operón junto con los genes AFE\_1948 y AFE\_1947 (Navarro y cols., 2009).

Los experimentos de PCR en tiempo real señalaron que los genes AFE\_1949, AFE\_1948 y AFE\_1947 se sobreexpresan fuertemente en presencia de concentraciones elevadas de cobre.

Adicionalmente, a través de proteómica cuantitativa ICPL se detectó un fuerte incremento en los niveles de los componentes del sistema Cus<sub>Af</sub> en presencia de cobre en ambas condiciones de crecimiento (azufre y hierro).

Por otro lado, a través de 2D-PAGE se detectó que otra proteína de membrana externa, codificada por el gen AFE\_1880, también se sobreexpresa en presencia de

cobre en ambas condiciones de crecimiento. Al analizar su contexto génico, se observó que vecino a este gen se encuentran ORFs que codifican para una proteína de fusión de membrana (MFP) (AFE\_1879) y una proteína de transporte de membrana interna (AFE\_1878), que formarían un sistema de transporte del tipo RND con sustrato desconocido, cuyo contexto genético es similar al sistema Cus de *E. coli*. Por PCR en tiempo real se observó un aumento en los niveles de mRNA de los tres genes.

Los sistemas de transporte del tipo RND están tradicionalmente formados por tres proteínas estructurales codificadas en un operón (Nikaido, 2011). Mediante RT-PCR se demostró que los componentes de este posible sistema del tipo RND se co-transcriben, lo que sugiere fuertemente que forman una unidad estructural y por lo tanto, un posible operón.

Estos resultados sugieren que este operón codificaría un nuevo sistema de eflujo del tipo RND con una posible función en la destoxificación de cobre en *A. ferrooxidans*.

El aumento observado en la síntesis de las proteínas que forman parte de los sistemas de eflujo del tipo RND contrasta con la transcripción inalterada o el discreto cambio de otras posibles proteínas de resistencia a cobre de *A. ferrooxidans* como CopAs (CopA1 y CopA2), CopC y CopD en las condiciones analizadas (figuras 8 y 10). Dado que *A. ferrooxidans* es un microorganismo acidófilo, el mecanismo llevado a cabo por las bombas del tipo RND probablemente sea más eficiente y de menor costo energético comparado con el mecanismo de eflujo de cobre llevado a cabo por otros transportadores como ATPasas (las cuales utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP), sugiriendo que la diferencia en la expresión

probablemente se deba a una necesidad de conseguir una mayor eliminación del metal a un menor costo energético.

Sin embargo, resultados previos mostraron la sobreexpresión de genes que codifican posibles proteínas de resistencia a cobre en *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de concentraciones más bajas de cobre (<25 mM) (Navarro y cols., 2009), sugiriendo que este requerimiento energético podría ser observado principalmente en concentraciones de cobre más altas.

Hay que destacar que el estudio de los componentes del sistema Cus de *E.coli* ha permitido comprender que la proteína de membrana interna RND CusA sería la responsable de la especificidad del sustrato y que uniría cobre a través de un sitio formado por tres o cuatro residuos de metionina esenciales (Kim y cols., 2011). Sin embargo, al realizar un análisis de alineamiento de aminoácidos entre las proteínas RND CusA de *E.coli*, AFE\_1949 (CusA<sub>Af</sub>) y AFE\_1880 de *A. ferrooxidans* se observó que sólo AFE\_1949, que presenta un 48% de identidad con CusA posee estos residuos (figura 16). AFE\_1880, que presenta un 21,8 % de identidad con CusA, sólo posee uno de los residuos de metionina, de manera que con nuestros resultados no se puede afirmar si el posible sistema RND pueda unir y transportar cobre directa o indirectamente. Obviamente, se requieren estudios adicionales para determinar la función de este posible transportador de cobre.

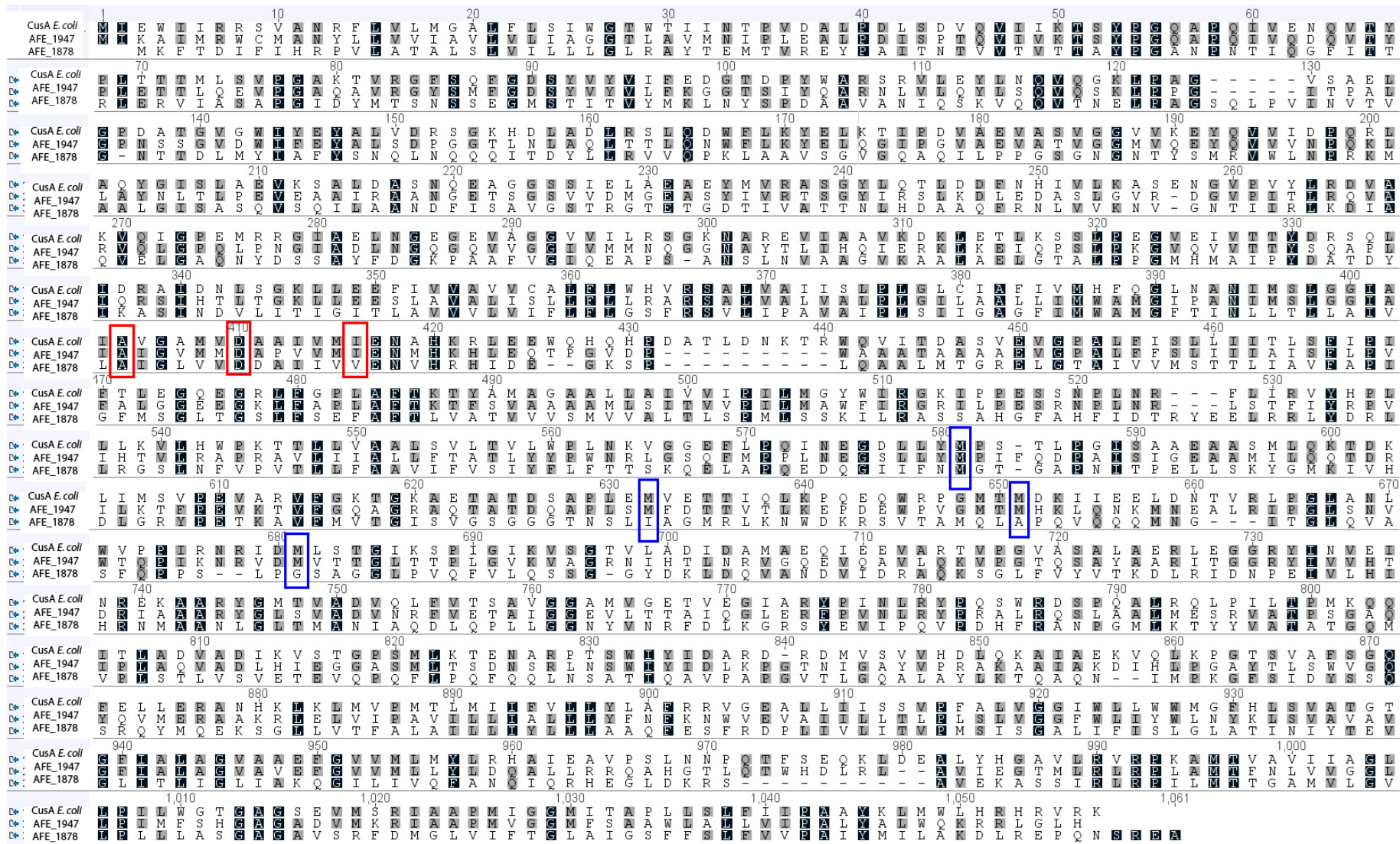


FIGURA 16. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre las proteínas RND, CusA de *E.coli* y AFE\_1947 y AFE\_1878 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Los rectángulos azules indican residuos de metionina conservados que formarían un posible sitio de unión a cobre citoplasmático, y los rectángulos rojos señalan residuos conservados en proteínas RND que transportan metales. El alineamiento de secuencia se realizó con el programa Uber Geneious.

### 6.1.2. Represión de canales iónicos

Los niveles de síntesis de Omp40 (AFE\_2741) disminuyeron fuertemente cuando las células se crecieron en hierro en presencia de cobre (figura 6, Tabla 8). Esta proteína es una de las porinas más abundantes en la membrana externa de *A. ferrooxidans* (Silva y cols., 1992). Se ha propuesto que los “loops” internos cargados positivamente de la porina Omp40 son parte de un mecanismo pasivo que regula la entrada de protones a través de la membrana externa evitando un exceso de ácido en el citoplasma de *A. ferrooxidans* (Guiliani y Jerez, 2000). El mismo fenómeno podría prevenir la entrada en exceso de otros cationes como cobre.

Se ha encontrado resultados similares en *P. aeruginosa*, en la que se observó la disminución de la expresión de ocho diferentes porinas en bacterias adaptadas a cobre (Teitzel y cols., 2006). Como una porina, Omp40 podría cumplir un importante papel en controlar la difusión de iones a través de la membrana externa (Silva y cols., 1992; Guiliani y Jerez, 2000). Por lo tanto, la disminución en la síntesis de Omp40 sugiere un cambio en la permeabilidad de la membrana externa, disminuyendo el influjo de iones de cobre hacia el interior de la célula, y de esta manera se prevendría la toxicidad intracelular por metales pesados.

Una situación similar ocurre con la represión de una proteína de la familia OmpA (AFE2685) en presencia de cobre (Tabla 8). OmpA no sólo proporciona estabilidad estructural a la célula, sino que también constituye canales de difusión que permiten la entrada lenta de pequeños solutos (Sugawara y cols., 1992). La disminución de OmpA también podría reducir la entrada de iones cobre a la célula.

La disminución en los niveles de Omp40 en presencia de cobre también se observó en *A. ferrooxidans* crecido en azufre (Figura 5 y Tabla 6).

En esta condición también se observó la disminución de los niveles de una proteína de la familia Nramp (proteína del macrófago asociada a la resistencia natural) (AFE\_105) (Tabla 6). Algunos homólogos Nramp son transportadores de metales divalentes dependientes de protón con alta afinidad por  $Mn^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ . Sin embargo, en *Mycobacterium tuberculosis* y en *Saccharomyces cerevisiae* se ha identificado homólogos con afinidad por  $Cu^{+2}$  (Nevo y Nelson, 2006; Zhuoer y cols., 2009). En términos generales, los transportadores Nramp corresponden a proteínas de membrana interna encargados del influjo y captura de cationes. Es por ello que, una reducción en sus niveles a nivel de la membrana podría implicar una disminución en la entrada de iones tóxicos como el cobre hacia el citoplasma.

Además, los resultados de proteómica cuantitativa mostraron la disminución de los niveles de un receptor dependiente de TonB (TBRD; AFE\_2040) en presencia de cobre (Tabla 8). Estos receptores son proteínas de membrana externa que forman canales permeables a solutos como vitamina B12 y sideróforos (Noinaj y cols., 2010; Schauer y cols., 2008). En *A. ferrooxidans* se han descrito varios genes y proteínas similares a TBRD (Valdés y cols., 2008; Chi y cols., 2007), aunque sus sustratos específicos son desconocidos. El análisis bioinformático sugiere que este locus codificaría un receptor de membrana externa CirA involucrado en el transporte de hierro mediado por catecol sideróforos lineales (Osorio y cols., 2008). Se sabe que los catecoles pueden reducir Cu (II) a Cu (I) generando un fuerte estrés a las células expuestas a este metal, ya que la forma reducida presenta mayor toxicidad que la forma oxidada (Grass y cols., 2004; Chaturvedi y cols., 2012). Quizás AFE\_2040 corresponde a un TBRD que es regulado por la presencia de cobre en *A. ferrooxidans*. De acuerdo con esto, la síntesis de proteínas de membrana externa

con similitudes estructurales a TBRDs disminuye fuertemente en presencia de cobre exógeno y aumenta en condiciones limitadas de cobre en *P. stutzeri*, *P. putida* y *P. aeruginosa* (Schauer y cols., 2008). Es posible que la disminución en los niveles de la proteína codificada por AFE\_2040 también sea una defensa contra la toxicidad del cobre, ya que podría reducir la entrada de catecoles reductores o del metal vía catecoles.

En conjunto, estos resultados sugieren un interesante y eficiente mecanismo de resistencia a cobre presente en *A. ferrooxidans*, el cual evitaría la entrada del metal en exceso por disminución de la difusión y transporte mientras que al mismo tiempo eliminaría activamente el cobre intracelular a través de bombas del tipo RND.

### **6.1.3. Síntesis aumentada de proteínas que participarían en la unión y transporte de cationes**

Se determinó que en ambas condiciones de crecimiento en presencia de cobre se produce un aumento de los niveles de una posible proteína soluble de unión a metales pesados (AFE\_1862) (Tablas 5 y 7), con un probable sitio de unión a metales pesados CGHC. Este sitio de unión a metales sería similar al encontrado en CopZ, una chaperona de cobre que transfiere cobre a transportadores de membrana interna como ATPasas (Padilla-Benavides y cols., 2013).

Además se observó que en hierro un posible canal de catión (AFE\_3093) aumentó sus niveles en presencia de cobre (Tabla 7).



La función, localización subcelular y especificidad de ambas proteínas es desconocida, pero probablemente están involucradas en la unión y transporte de cationes.

## **6.2. Producción y conversión de energía**

### **6.2.1. Cambios en los niveles de proteínas que participan en la oxidación de hierro**

Los operones *rus* y *petI* de *A. ferrooxidans* contienen genes que codifican proteínas que participan en la oxidación de hierro (Valdés y cols., 2008). La unidad transcripcional *petI* codifica las tres subunidades del complejo *bc<sub>1</sub>* (PetCAB), una deshidrogenasa de cadena corta (Sdr) de función desconocida y un citocromo *c<sub>4</sub>* que se ha sugerido recibe electrones desde la rusticianina, para pasarlos al complejo *bc<sub>1</sub>* (Valdés y cols., 2008, y sus referencias). El operón *rus* codifica dos citocromos tipo *c* (*Cyc1* y *Cyc2*), componentes de la citocromo oxidasa tipo *aa<sub>3</sub>* (*CoxBACD*) y rusticianina (Appia-Ayme y cols., 1999). Se ha mostrado que *Cyc2* acepta electrones directamente desde Fe (II) y este puede ser el primer paso de la oxidación de Fe (II) (Valdés y cols., 2008).

Las proteínas ResC y ResB están involucradas en la maduración del complejo *bc<sub>1</sub>* (operón *petI*) y mostraron un aumento en sus niveles en hierro en presencia de cobre (Tabla 7). Sin embargo, se detectó cantidades reducidas de PetC-1 (Tabla 8). Sorpresivamente, se detectó una reducida expresión de *Cyc2* y *Cyc1* en células

crecidas en presencia de cobre (Tabla 8). Se ha observado un incremento en el tiempo de crecimiento en *A. ferrooxidans* en presencia de cobre (datos no mostrados), sugiriendo que la respiración es afectada y la oxidación ocurre más lentamente en la presencia de cobre. Esto puede ser crucial y podría tener un impacto en la biolixiviación.

Resultados contradictorios se observaron en *A. ferrooxidans* crecidos en azufre, donde aumentaron los niveles de proteínas codificadas por el operón *rus* en presencia de cobre (Tabla 5). Resultados previos mostraron que la expresión del operón *rus* se induce por hierro (Yarzabal y cols., 2004; Ramírez y cols., 2004), y se observó una disminución en la expresión del operón cuando *A. ferrooxidans* creció en covelita (CuS), comparada con su expresión en bacterias crecidas en hierro, probablemente por la ausencia de hierro en el medio de cultivo con mineral (Carlos y cols., 2008). Estos resultados sugieren que el operón *rus* participaría en la oxidación de hierro.

En la actualidad no existen antecedentes que sugieran una posible función del operón *rus* en azufre, a pesar de observarse una leve expresión en células crecidas en este sustrato (Yarzabal y cols., 2004), ni tampoco que relacione la expresión del operón y la presencia de otros metales diferentes a hierro. Se puede especular que la inducción del operón *rus* en azufre no está relacionado a la obtención de energía, sino más bien a una función del operón o de algunas proteínas codificadas por éste aún no identificada, y que tenga relación directa o indirecta con la resistencia a metales. De acuerdo con esto, en nuestro laboratorio se ha sugerido una posible función para la proteína rusticianina (AFE\_3146) en la resistencia a cobre en *A.*

*ferrooxidans* ATCC 23270 (Navarro y cols., datos no publicados), proteína que se sobreexpresó en los resultados con azufre (Tabla 5).

### **6.2.2. Inducción de citocromos alternativos**

También se encontró niveles incrementados de las proteínas CydA (AFE\_955) y CydB (AFE\_954) en células crecidas en hierro en la presencia de cobre (Tabla 7). Estas proteínas son componentes del complejo citocromo oxidasa terminal *bd*. Este es el componente de la cadena respiratoria aeróbica en *E. coli* que predomina en células que crecen en baja aeración. Además, estas citocromo oxidasas *bd* tienen una mayor afinidad por oxígeno que otras citocromo oxidasas. Por lo tanto, se piensa que son usadas por microorganismos para continuar la respiración aeróbica en condiciones bajas de oxígeno (Cook y Poole, 2000), ayudando a la bacteria a sobrevivir en períodos con limitación de oxígeno. Aparentemente la expresión incrementada de múltiples citocromo oxidasas confiere ventajas a la bacteria para sobrevivir a condiciones de estrés (Jünemann, 1997; VanOrsdel y cols., 2013). De esta manera, *A. ferrooxidans* con una reducida velocidad de respiración debido al estrés por cobre podría también usar una citocromo oxidasa terminal alternativa además de la citocromo oxidasa tipo *aa3* estándar.

Los resultados observados en la Tabla 7 muestran que en *A. ferrooxidans* se sobreexpresan las proteínas de varias vías metabólicas que generan energía para manejar el estrés celular que causa el metal. *A. ferrooxidans* tiene un ciclo de ácido tricarboxílico (TCA) incompleto que carece del complejo  $\alpha$ -cetoglutarato

deshidrogenasa, pero en el que el piruvato puede ser usado como una fuente para reoxidar NADH y para la formación de citrato y  $\alpha$ -cetoglutarato (Cárdenas y cols., 2010). De acuerdo con esto, varias proteínas como citrato sintetasa II (Citz) (AFE\_3065), un componente del complejo deshidrogenasa E1 (AFE\_1813) y el complejo piruvato deshidrogenasa (AFE\_3068), las que alimentan o son parte del ciclo TCA, muestran un incremento en sus niveles en *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de cobre (Tabla 7). Resultados similares se han comunicado en *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 tratados con As (III) (Baker-Austin y cols., 2007) y en *Exiguobacterium* sp. S17 bajo condiciones de estrés por arsénico (Belfiore y cols., 2013).

### **6.2.3. Incremento en la biosíntesis de ubiquinonas**

Por otro lado, una posible 2-octaprenil-6-metoxifenol hidrolasa (UbiH-2) (AFE\_2388) mostró un fuerte aumento de sus niveles en *A. ferrooxidans* crecidos en hierro en presencia de cobre (Tabla 7). Esta enzima está involucrada en la biosíntesis de ubiquinona, la cual es un importante componente en la cadena respiratoria en *E. coli* y otras bacterias. Se ha comunicado que ubiquinonas solubles en lípidos limitan el estrés oxidativo causado por peróxido y superóxido en la membrana citoplasmática de *E. coli* (Soballe y Poole, 2000). Como el cobre genera especies reactivas de oxígeno que dañan las membranas, un incremento en los niveles de una proteína involucrada en la formación de ubiquinona en la presencia de cobre puede contribuir a la defensa contra el metal tóxico. La regulación de UbiH-2

también fue reportado en *A. ferrooxidans* bajo condiciones de limitación de oxígeno (Kucera y cols., 2012).

### **6.3. Metabolismo y transporte de carbohidratos y aminoácidos**

Relacionado con el transporte de carbohidratos y metabolismo, se encontró niveles elevados de una posible fosfoglucomutasa en células crecidas en hierro y en presencia de cobre (Tabla 7). Esta enzima genera glucosa-6P a partir de glucosa-1P, lo cual generaría energía de este azúcar fosforilado o podría ir a la vía de las pentosas fosfato para generar ribosa y obtener poder reductor en forma de NADPH.

#### **6.3.1. Cambios en los niveles de RuBisCO**

*A. ferrooxidans* 23270 fija CO<sub>2</sub> por medio de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) (Gale y Beck, 1967) en el ciclo fosfato pentosa reductivo Calvin-Benson-Bassham (ccb). RuBisCO es la principal enzima para quimiolitautótrofos como *A. ferrooxidans*. Esta bacteria tiene dos operones *ccb* que contienen genes que codifican para RuBisCO (Esparza y cols., 2010). En todas las especies que requieren fijar CO<sub>2</sub> para su metabolismo, RuBisCO está formada por una subunidad pequeña (CbbS) y una grande (CbbL). Nuestros resultados muestran que uno de los operones (Cbb1) (AFE\_3052/AFE\_3051) se sobreexpresó en presencia de cobre (Tabla 7), mientras que el otro operón (Cbb2) (AFE\_1691 / AFE\_1690) disminuyó su expresión cuando *A. ferrooxidans* creció en presencia del metal (Tabla 8). La identidad entre estos dos tipos de subunidad pequeña de

RuBisCO es de 60% y las subunidades grandes mostraron un 84 %, sugiriendo que ambas no corresponden a genes duplicados.

La comparación en los niveles de síntesis proteica entre *A. ferrooxidans* crecidos en hierro versus azufre mostró que CbbS-1/CbbL-1 fue fuertemente disminuida en células crecidas en azufre. Por otro lado, no se detectó CbbS-2/CbbL-2 entre las proteínas que cambian sus niveles en estas condiciones (Ramírez y cols., 2004).

En la actualidad no hay información sobre los efectos del cobre en la expresión de RuBisCO en microorganismos autotróficos. Sin embargo, se comunicó una represión de RuBisCO en hojas de *Oryza sativa* sometidas a cobre (Hajdich y cols., 2001). Por otro lado, cuando se analizó proteínas que unen cobre en la raíz de *Arabidopsis thaliana*, una de las proteínas encontradas fue la subunidad pequeña de RuBisCO (Kung y cols., 2006). Esta proteína muestra un 39 % y 31 % de identidad con CbbS-1 y CbbS-2 de *A. ferrooxidans*, respectivamente.

Dado los resultados previos es posible que bajo condiciones estresantes por cobre ocurra una represión del operón *cbb2*.

Por otro lado, el otro operón de *A. ferrooxidans* *cbb1* codifica una proteína con alta identidad a la subunidad pequeña de RuBisCO de *A. thaliana*, como fue mencionado anteriormente, proteína que une cobre (Kung y cols., 2006). La inducción de Cbb1 cuando *A. ferrooxidans* crece en presencia de cobre sugiere que este operón no solo puede participar en la fijación de carbono, sino que también podría contribuir a la resistencia al metal. Sin embargo, la expresión diferencial podría ser provocada

por el estrés oxidativo causado por el cobre (Esparza y cols., 2010) o por el crecimiento bajo condiciones anaeróbicas (Osorio y cols., 2013).

### 6.3.2. Síntesis de aminoácidos en presencia de cobre

Sorpresivamente, siete de ocho posibles proteínas codificadas por el operón histidina (HisF, HisA, HisH, HisB, HisC-1, HisD y HisG) (AFE\_3046 a AFE\_3040) (figura 17) aumentaron sus niveles en *A. ferrooxidans* crecidos en hierro y en presencia de cobre (Tabla 7).



FIGURA 17. Organización del operón *his* en *A. ferrooxidans*. En gris se indican los genes que codifican las proteínas que aumentaron en presencia de cobre y que se identificaron por proteómica cuantitativa.

Las ocho proteínas de este operón His participan en diez reacciones para la biosíntesis de histidina (Alifano y cols., 1996), sugiriendo que las células requieren altos niveles de histidina para responder a la presencia de cobre.

Antecedentes previos señalan que cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficientes en la síntesis de histidina (His<sup>-</sup>) presentaron sensibilidad a cobre, cobalto y níquel. Esta sensibilidad se revertió al agregar histidina al medio de cultivo, sugiriendo que la síntesis de este aminoácido otorgaría resistencia a estos metales. Los resultados también sugirieron que la histidina intracelular aliviaría la toxicidad del Cu, Co y Ni probablemente por interacción directa con los metales (Pearce y Sherman, 1999).

Resultados similares se encontraron en plantas, donde una alta expresión de la vía biosintética de la histidina contribuiría a la resistencia a níquel, probablemente por una interacción directa entre el aminoácido y el metal (Ingle y cols., 2005). En conexión con esto, experimentos recientes sugieren la formación de un complejo Ni-(L-His)<sub>2</sub> necesario para la captura del níquel a través de posibles transportadores del tipo ABC presentes en la membrana interna de *E. coli* (Chivers y cols., 2012).

Estos antecedentes sugieren una interesante y novedosa explicación al aumento de la vía biosintética de histidina en *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de cobre. Esto es, un incremento en la síntesis de histidina podría contribuir directamente a la resistencia a cobre de la bacteria a través de la interacción entre el aminoácido y el metal libre, lo cual obviamente debe ser demostrado.

Además de la sobreexpresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de histidina, observamos un aumento en los niveles de proteínas que participan en la biosíntesis de cisteína, CysD-2 (AFE\_3124), CysJ (AFE\_3121), CysI (AFE\_3122), CysN (AFE\_3125) y CysNC (AFE\_2971) (Tabla 7). Similar a estos resultados, se reportó en *Staphylococcus aureus* un incremento en la síntesis de cisteína y glutatión S-transferasa en la presencia de cadmio (Sochor y cols., 2011). Experimentos recientes en *E. coli* indican que la mayoría de los genes de la biosíntesis de cisteína se requieren para manejar el estrés inducido por telurito, en que todos los genes del regulón Cys se sobreexpresaron en presencia de este metal tóxico (Fuentes y cols., 2007). Los autores sugirieron que esta respuesta podría ser debido a la disminución de tioles celulares o moléculas que contienen azufre como glutatión.



Como en el caso de la histidina, la cisteína también muestra una fuerte afinidad por metales divalentes. Por lo tanto, ambos aminoácidos podrían proteger a la célula de los metales pesados de manera similar. Obviamente, estas conjeturas habría que comprobarlas midiendo los niveles de histidina y/o cisteína libres en el espacio intracelular de las células crecidas en presencia de cobre.

Por otro lado, un aumento de la síntesis de histidina y cisteína puede ser inducido por un aumento en la demanda de estos aminoácidos. Por ejemplo, durante el incremento en la expresión de proteínas que presenten histidinas y cisteínas en su estructura primaria, como es el caso de proteínas transportadoras o chaperonas capaces de unir cobre, las cuales poseen estos aminoácidos en el sitio de unión al metal.

## **6.4. Procesos celulares y señalización**

### **6.4.1. Aumento de la defensa enzimática contra el estrés oxidativo**

Dentro de esta categoría, una glutaredoxina (AFE\_3038) incrementó sus niveles de síntesis cuando *A. ferrooxidans* creció en hierro en presencia de cobre (Tabla 7).

Las glutaredoxinas son enzimas que intervienen en reacciones redox y cuya función principal consiste en proteger las células contra el estrés oxidativo a través del mantenimiento del estado redox adecuado de los grupos sulfhidrilo de las proteínas celulares (Lillig y cols., 2008). El cobre como agente oxidante facilitaría la formación de puentes disulfuro en proteínas con grupos sulfhidrilo funcionales. Por lo tanto, un

aumento en la expresión de glutaredoxinas contribuiría a mantener los grupos tiol reducidos.

El nombre glutaredoxina deriva del hecho que utiliza glutatión como cofactor. Este se sintetiza en dos pasos independientes, siendo el segundo catalizado por la enzima glutatión sintetasa. Esta enzima cataliza la condensación de glicina al C-terminal de la gamma-glutamilcisteína.

En la Tabla 7 se observa un aumento de los niveles de la glutatión sintetasa (AFE\_3063), probablemente necesario para sintetizar una mayor cantidad de glutatión, el que es utilizado en parte por glutaredoxinas y glutatión s-transferasa (AFE\_0177) (también aumentada en presencia de cobre) en procesos de detoxificación. En conexión con estos resultados, una posible glutamato-cisteína ligasa (AFE\_3064) involucrada en la formación de glutatión también aumentó en presencia del metal (Tabla 7). Estos resultados coinciden con mediciones previas de los niveles de mRNA de estas enzimas en *A. ferrooxidans* (Orell y cols., 2010), y con el set de genes en el genoma de esta bacteria que se predijo ser necesarios para la neutralización de especies reactivas de oxígeno (Valdés y cols., 2008; Cárdenas y cols., 2010).

La acumulación de especies reactivas de oxígeno generadas por el metal pueden ser contrarrestadas por la acción de varios tipos de proteínas antioxidantes. La familia de antioxidantes específicas de tioles (TSA) y actividad alquil hidroperóxido reductasa o alquilhidroperoxidasas (AhpC/TSA) son un grupo altamente conservado de enzimas que pueden reducir hidroperóxidos (por ejemplo alquil hidroperóxidos generados durante la lipoperoxidación en el estrés oxidativo) por medio de NADH o

NADPH en presencia de tioredoxina o de dadores de electrones que contengan tioles (Chae y cols., 1994; Jeong y cols., 2000; Cha y cols., 1995).

Las especies alquil hidroperóxidos pueden iniciar y propagar una reacción en cadena de radicales libres que resulta en daño al DNA y a membranas. Las enzimas AhpC/TSA pueden destruir intermediarios hidroperóxidos tóxicos y reparar el daño en moléculas que fueron peroxidadas cumpliendo una importante función en la detoxificación derivada del estrés oxidativo (Baillon y cols., 1999).

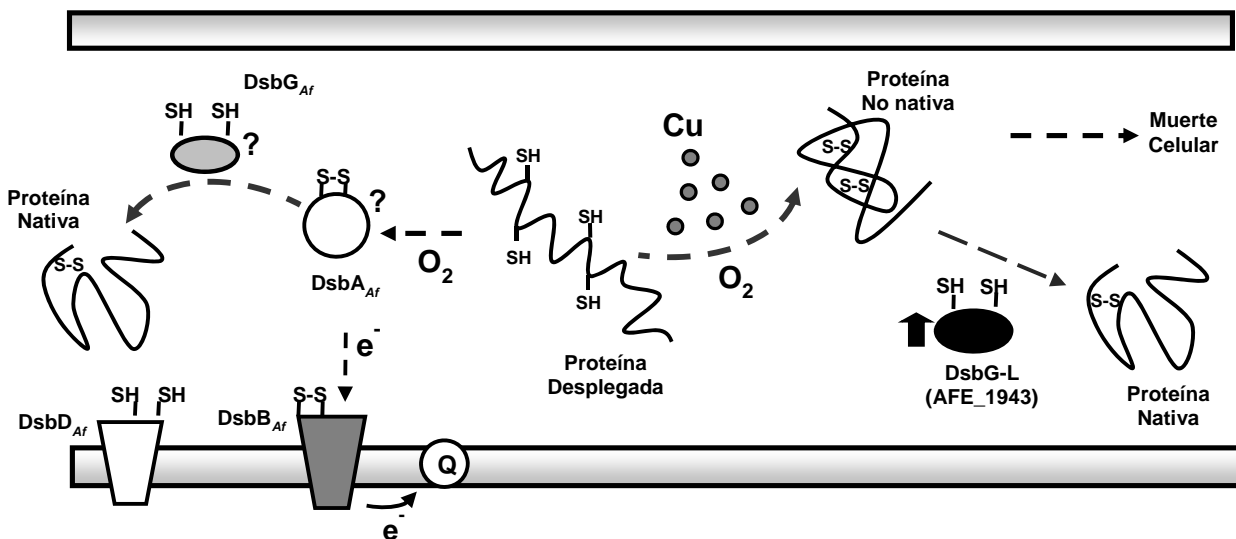
Se ha sugerido que estas enzimas corresponderían a equivalentes de la enzima glutatión peroxidasa en procariontes (Cha y cols., 1995).

En *A. ferrooxidans* crecido en azufre y en presencia de cobre aumentaron los niveles de dos proteínas AhpC/TSA (AFE\_0367 y AFE\_0985) (Tabla 5), lo que sugiere la participación de estas proteínas en la protección contra el estrés oxidativo provocado por el metal. Este resultado concuerda con análisis previos donde se observó la sobreexpresión de un gen *ahpC* en *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de cobre o un mineral sulfurado como calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) (Orell y cols., 2010).

#### **6.4.2. Reparación del daño oxidativo provocado por el cobre**

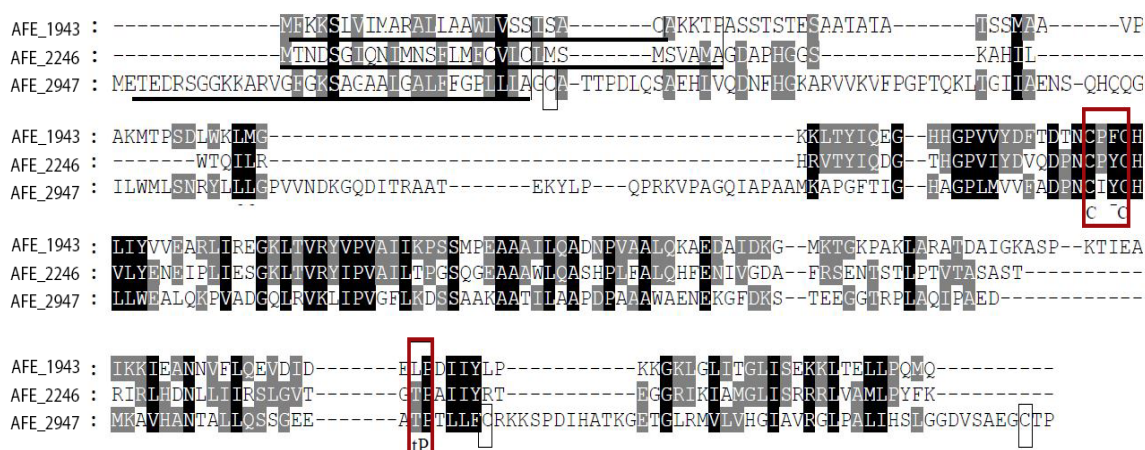
En *A. ferrooxidans* crecido en hierro y en presencia de cobre se observó un incremento de una proteína anotada como una proteína con dominio DsbG (AFE\_1943), que podría corresponder a una isomerasa de puentes disulfuro, y que se denominó DsbG-L (DsbG-like). AFE\_1943 mostró un incremento en sus niveles en el análisis de ICPL (Tabla 7). También, como se observa en la figura 6, esta proteína se sintetizó en altos niveles cuando el microorganismo creció en presencia de cobre. Además, el análisis por qRT-PCR determinó que los niveles

transcripcionales del gen que codifica DsbG-L se incrementó fuertemente y este aumento fue proporcional a la concentración de cobre en el medio (figura 11). DsbG-L podría ser parte de una familia de tiol-disulfuro oxidoreductasas involucradas en la formación y reordenamiento de puentes disulfuro y el correcto plegamiento de proteínas periplasmáticas (figura 18). Específicamente, esta proteína podría ser una isomerasa de puentes disulfuro capaz de reordenar enlaces disulfuro no nativos para generar enlaces correctos (Ito e Inaba, 2008; Zhang y cols., 2010).



**FIGURA 18. Posible sistema de formación de puentes disulfuro de proteínas en el periplasma de *A. ferrooxidans* catalizados por varias posibles proteínas tiol:disulfuro oxidoreductasas según el modelo identificado en *E. coli* (Ito e Inaba, 2008).** En condiciones fisiológicas, DsbA<sub>Af</sub> (AFE\_1088), una proteína tiol:disulfuro oxidasa catalizaría la formación azarosa de puentes disulfuro mientras que DsbB<sub>Af</sub> (AFE\_0275) sería responsable de re-oxidar DsbA<sub>Af</sub>. Las proteínas disulfuro isomerasas DsbG<sub>Af</sub> reordenarían eficientemente los puentes disulfuro preformados por DsbA<sub>Af</sub>, generando proteínas nativas y funcionales. Por su parte DsbD<sub>Af</sub> (AFE\_0545) mantendría a DsbB<sub>Af</sub> en estado reducido y funcional. Finalmente quinonas (Q) y tioredoxina 1 (Trx1) restaurarían funcionalmente a DsbB<sub>Af</sub> y DsbD<sub>Af</sub> respectivamente. Sin embargo, bajo condiciones de estrés de cobre ocurriría la formación de puentes disulfuro erróneos y la formación de proteínas mal plegadas, provocando eventualmente la muerte celular. La sobreexpresión y actividad de DsbG-L restauraría los puentes de disulfuro nativos y la actividad de las proteínas evitando la muerte de la bacteria.

Como en el caso de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas, *A. ferrooxidans* posee genes que codifican posibles tiol-disulfuro oxidoreductasas las que son homólogas a DsbA, DsbB y DsbD. Sin embargo, a diferencia de *E. coli*, *A. ferrooxidans* no tiene en su genoma una secuencia de DNA que codifique la proteína isomerasa DsbC. Por el contrario, *A. ferrooxidans* contiene tres genes que codifican para posibles disulfuro isomerasas: AFE\_2947 para una DsbG, y genes AFE\_1943 y AFE\_2246 que codificarían para proteínas disulfuro isomerasas que contienen dominio DsbG (figura 19). Esto sugiere que *A. ferrooxidans* podría usar copias extra de proteínas tipo DsbG para compensar la carencia de DsbC.



**FIGURA 19. Alineamiento de las secuencias de proteínas disulfuro isomerasas de *A. ferrooxidans*.** DsbG-L (AFE\_1943) difiere de las otras proteínas isomerasas en los motivos conservados CXXC (Sitio catalítico) y TP (marcados por rectángulos rojos), ya que posee una fenilalanina en lugar de tirosina y leucina en lugar de treonina, respectivamente. Tales diferencias pueden estar relacionadas con el tipo de sustrato reconocido por de DsbG-L y la función de esta proteína (adaptado de Zhang y cols., 2010).

Aunque *A. ferrooxidans* puede contener un sistema Dsb completo, se ha comunicado un reciente estudio de este posible sistema. Se demostró que la posible proteína DsbG codificada por el gen AFE\_2947 mostró actividad isomerasa de

puentes disulfuro, aunque su rol fisiológico aún no es claro (Zhang y cols., 2010). Sin embargo, la sobreexpresión del gen que codifica esta proteína, observado en la figura 11, también sugiere un posible papel de esta proteína durante el estrés con el metal.

Estudios previos identificaron a las proteínas codificadas por los genes AFE\_2947 y AFE\_2246 en el periplasma de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato (Chi y cols., 2007). Estos resultados sugieren una posible función fisiológica de estas proteínas periplasmáticas. Sin embargo en este estudio proteómico previo, la proteína codificada por el gen AFE\_1943 no se detectó en estas células que crecieron en ausencia cobre.

El aumento de proteínas redox involucradas en el plegamiento periplasmático fue previamente observado en *P. aeruginosa* adaptados a altas concentraciones de cobre (DsbD, DsbE y DsbG) (Teitzel y cols., 2006). Además, se demostró que en *E. coli* una disulfuro isomerasa miembro del sistema *dsb* (DsbC) es un importante determinante de resistencia a cobre para este microorganismo (Hiniker y cols., 2005).

Se reportó que los iones cobre catalizan la formación de puentes disulfuro incorrectos en proteínas. Esto genera proteínas inactivas que eventualmente pueden causar la muerte celular (Hiniker y cols., 2005). Por lo tanto, una disulfuro isomerasa como DsbG-L también podría ser un importante determinante de resistencia a cobre de *A. ferrooxidans* y su aumento podría ayudar a restaurar puentes disulfuro nativos, permitiendo la supervivencia de la bacteria en condiciones de estrés de cobre (figura 18).

La expresión heteróloga de DsbG-L en *E. coli* incrementó la resistencia a cobre de esta bacteria, determinado por el menor tamaño de halos de inhibición y la recuperación parcial del crecimiento en cepas transformadas después de la adición de cobre luego de 2 h de crecimiento (figura 12). Una posible explicación del efecto limitado de DsbG-L, es que esta proteína actuaría en el periplasma de *A. ferrooxidans* normalmente a un pH aproximado a 2. Sintetizada en *E. coli*, esta proteína actuaría a pH 6-7 y por lo tanto su eficiencia disminuiría bajo estas condiciones.

## **6.5. Motilidad celular y secreción**

### **6.5.1. Posible incremento en la formación de biopelícula**

Dentro de esta categoría, dos proteínas, TadA (AFE\_2702) y TadB (AFE\_2701) incrementaron sus niveles de síntesis cuando *A. ferrooxidans* creció en azufre en presencia de cobre (Tabla 5). Los niveles de síntesis de estas proteínas no cambiaron cuando *A. ferrooxidans* creció en hierro y en presencia de cobre (Tabla 7).

TadA y TadB forman parte de una estructura macromolecular conformada por un grupo de proteínas (codificadas en el locus *tad*) cuyo ensamblaje permitiría la formación y secreción del pili Flp (proteína fimbrial de bajo peso molecular) requerido para la adherencia de la bacteria a distintas superficies (Kachlany y cols., 2000; Tomich, 2007).

Los genes *tad* son esenciales para la formación de biopelículas, colonización y patogénesis de géneros bacteriales como *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*), *Haemophilus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Caulobacter*, entre otros (Tomich, 2007).

Otros trabajos han señalado la importancia del pili en la formación de las biopelículas. Antecedentes experimentales señalan que variantes de *P. aeruginosa* con fenotipos hiperpiliados aumentan sus capacidades para formar biopelículas (Chiang y Burrows, 2003). Mientras que cepas mutantes de *S. solfataricus* con delección del pili muestran incapacidad en la adhesión y formación de biopelículas (Koerdt y cols., 2010). En *A. ferrooxidans* crecido en azufre y en presencia de cobre también aumentó una posible proteína pilina (AFE\_0416) (Tabla 5), cuya disposición helicoidal con otras subunidades de pilina formarían una fimbria o pili bacterial.

Las biopelículas son estructuras formadas por grandes agregados de bacterias dentro de una matriz muy hidratada compuesta por exopolisacáridos (EPS), los que constituyen su componente principal, producidos por los propios microorganismos. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y lípidos se conocen bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) o matriz exopolimérica (Flemming y Wingender, 2010).



Los componentes de la matriz de la biopelícula forman una barrera física que dificulta el acceso de sustancias antibacteriales hacia el componente celular (Lewis, 2001).

Las biopelículas bacterianas representan una eficiente estrategia de supervivencia procariótica debido a que las bacterias logran ventajas significativas al proporcionarles protección frente a sustancias tóxicas como antibióticos, fluctuaciones medioambientales de humedad, temperatura y pH, entre otros.

Se ha demostrado que las células en biopelículas son menos susceptibles a cobre y otros metales que células planctónicas y la cantidad de EPS presente en la biopelícula está directamente relacionada a la resistencia (Rodrigues y cols., 2008). Se han encontrado antecedentes similares en *P. aeruginosa* las que, al formar biopelículas, mostraron ser más resistentes a metales pesados como cobre, plomo o zinc (Teitzel y Parsek, 2003).

Otros trabajos mostraron que concentraciones subinhibitorias de algunos antibióticos inducen la formación de biopelículas resistentes a antibióticos en *P. aeruginosa* y *E. coli*, proceso que sería clínicamente relevante (Hoffman y cols., 2005; Harrison y cols., 2007; Kaplan, 2011). Por otro lado, *Archaeoglobus fulgidus* aumentó la formación de biopelícula en respuesta a condiciones medioambientales desfavorables, incluyendo altas concentraciones de metales, pH y cambios de temperatura (Lapaglia y Hartzell, 1997).

También se observó que la exposición del alga unicelular *Euglena gracilis* a  $\text{CuSO}_4$  incrementa la formación de biopelículas, sugiriendo que la formación de esta

estructura podría ser considerada como un mecanismo de protección frente al metal (Morales y cols., 2012).

Por lo tanto, nuestros resultados junto con los antecedentes señalados previamente sugieren que en cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en azufre y en presencia de cobre, podría aumentar el número de bacterias adheridas a los gránulos de azufre, lo que incrementaría la formación de una biopelícula sobre la superficie del mineral mejorando la resistencia de la bacteria al metal. Esta respuesta correspondería a una interesante estrategia de resistencia de *A. ferrooxidans* frente a los iones de cobre presentes en el medio.

En conexión con esta idea, los análisis también mostraron la inducción de la proteína nucleótido-difosfato reductasa (NrdA) (AFE\_2638) en *A. ferrooxidans* crecidos en azufre en presencia de cobre (Tabla 5). Recientes antecedentes identificaron un aumento en los niveles de esta proteína en biopelículas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Vera y cols., 2013).

Es importante destacar que los estudios proteómicos se realizaron con células suspendidas en el medio obtenidas desde cultivos crecidos en presencia de gránulos de azufre. Sin embargo, es probable que las muestras utilizadas para el análisis proteómico correspondan a células que presentan un fenotipo en transición desde la biopelícula al fenotipo de células planctónicas, proceso que ocurre durante la etapa de dispersión o remoción de bacterias desde la biopelícula. Durante el crecimiento, esta dispersión puede ser provocada por razones físicas como la agitación constante del medio de cultivo líquido. Se ha observado que durante la etapa de la dispersión los patrones proteicos de las células planctónicas son muy

similares a los de la biopelícula (Sauer y cols., 2002), de manera que la presencia de proteínas de adhesión y formación de biopelículas observadas en *A. ferrooxidans* en suspensión crecidos en azufre y en presencia de cobre podrían ser consecuencia de las condiciones de cultivo empleados. Sin embargo, los cambios observados pueden corresponder en parte a la formación de la biopelícula en los gránulos de azufre.

### **6.5.2. Aumento en la secreción de proteínas con señal de exportación Tat**

La Tabla 7 muestra que una translocasa de proteínas independiente de sec (TatA-1) (AFE\_3048) aumentó sus niveles fuertemente cuando *A. ferrooxidans* creció en hierro en presencia de cobre. Esta proteína sería parte de una vía de translocación “twin – arginina” en bacterias y otros microorganismos (Lee y cols., 2006; Fröbel y cols., 2012). Aunque lo que se conoce en *A. ferrooxidans* de esta vía es muy poco, de 131 proteínas identificadas previamente usando MS FT con trampa de iones de alta resolución lineal se predijo que sólo 5 tenían señal de exportación Tat (Chi y cols., 2007). El aumento de TatA-1 puede indicar un incremento en la exportación de este tipo de proteínas hacia el periplasma de *A. ferrooxidans*, por ejemplo la proteína hipotética AFE\_0042 que presenta señal de exportación Tat y cuya síntesis aumentó fuertemente en presencia de cobre (Tabla 7). alguna de estas proteínas podría tener una función frente al estrés periplasmático causado por el cobre.

## 6.6. Biosíntesis de envoltura, membrana y pared celular

Las bacterias poseen una envoltura celular que mantiene la forma de la célula y evita la lisis. Esta estructura es rígida debido a la presencia de un polímero de peptidoglicano formado por dos derivados de azúcar, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidos por enlaces  $\beta$ 1-4 formando una cadena lineal. En bacterias Gram-negativas esta capa es delgada y está localizada dentro del periplasma, entre la membrana interna y externa (Vollmer y cols., 2008).

La síntesis de peptidoglicano puede ser dividida en varias etapas donde participan proteínas denominadas Mur (Barreteau y cols., 2008).

La Tabla 7 muestra un aumento en los niveles de proteínas que pueden formar parte del proceso de biosíntesis del peptidoglicano, MurA (AFE\_3039) y MurF (AFE\_0210) en *A. ferrooxidans* crecido en hierro en presencia de cobre.

Resultados comunicados en la literatura señalan que la activación del “estimulón de estrés de pared celular” por antibióticos resulta en la sobreexpresión de los genes asociados a la biosíntesis de peptidoglicanos, permitiendo una mayor velocidad de biosíntesis con el objetivo de hacer frente al daño celular (Bertsche, 2009).

Nuestros resultados sugieren que el aumento de la síntesis de peptidoglicanos por MurA y MurF podría prevenir el posible daño en la pared celular de *A. ferrooxidans* por la presencia de cobre.

Alternativamente, el polímero de peptidoglicano y otras proteínas de superficie pueden secuestrar metales en parte para prevenir sus efectos tóxicos sobre los procesos metabólicos sensibles. Esto ocurre principalmente cuando las bacterias están formando biopelículas (Harrison y cols., 2007).

## 6.7. Mecanismos de traducción de señales

La Tabla 7 muestra un aumento de AFE\_3022, una Hpr (Ser) kinasa/fosfatasa (HprK) que forma parte de un posible sistema fosfotransferasa (PTS). Se ha descrito recientemente que este sistema se sobreexpresó en *A. ferrooxidans* que crecieron en una biopelícula unida al mineral pirita (Vera y cols., 2013). Este sistema PTS es fundamental para la captura de carbohidratos y por lo tanto para formar el polisacárido capsular y otras moléculas (Deutscher y cols., 2006). Es un fenómeno bien conocido que las membranas celulares y la pared celular de microorganismos que forman una biopelícula secuestran metales tóxicos (Harrison y cols., 2007). En este caso, el cobre podría inducir la formación de estos polímeros para prevenir en parte la entrada de los metales tóxicos a la célula. Sin embargo, no es claro si el posible sistema PTS de *A. ferrooxidans* funcionaría de la misma forma que en otras bacterias (Valdés y cols., 2008).

La iniciación de la transcripción es un paso crítico para la regulación de la expresión génica bacteriana y es controlado por un amplio número de factores transcripcionales. El factor sigma 54 alternativo ( $\sigma^{54}$ ) juega una función crucial en la activación de la respuesta frente a un gran número de señales externas.

Para ello,  $\sigma^{54}$  se une reversiblemente a la RNA polimerasa y permite el reconocimiento de elementos específicos del promotor del gen que va ser transcrito (Hechard y cols., 2001).

La transcripción por la RNA polimerasa que utiliza el factor  $\sigma^{54}$ , además es regulada por una clase distinta de factores transcripcionales que pertenecen a la familia de reguladores dependiente de  $\sigma^{54}$  y que son fundamentales para la iniciación de la transcripción. Estos reguladores corresponden a proteínas de unión a una

secuencia potenciadora o “enhancer” y cuya función en la activación transcripcional requiere la hidrólisis de nucleótidos (Buck y cols., 2000).

El factor  $\sigma^{54}$  cumple una importante función en la virulencia de varias bacterias. En *Vibrio fischeri* influye en la formación de biopelículas, motilidad y colonización (Wolfe y cols., 2004). También es requerido por *Burkholderia cenocepacia* para la formación de biopelículas y supervivencia dentro del macrófago (Saldías y cols., 2008). En *E. coli*  $\sigma^{54}$  regula la formación de biopelículas y la biosíntesis flagelar, entre otros procesos (Belik y cols., 2008; Zhao y cols., 2010). Mientras que en *Enterococcus faecalis*  $\sigma^{54}$  regula la adherencia inicial de las células al sustrato, así como la composición de la matriz de la biopelícula (Iyer y Hancock, 2011).

Nuestros resultados preliminares sugieren que *A. ferrooxidans*, en respuesta al estrés por cobre, incrementaría la formación de una biopelícula sobre los gránulos de azufre lo cual mejoraría la resistencia al metal.

La Tabla 5 muestra que en *A. ferrooxidans* crecidos en azufre y en presencia de cobre aumenta el nivel de un posible regulador de respuesta dependiente de  $\sigma^{54}$  (AFE\_2955). A través de análisis informáticos, se identificó esta proteína como un miembro de la familia de factores transcripcionales de unión a “enhancer” que formaría parte de un posible sistema de dos componentes (Hödar y cols. 2012).

Dados los antecedentes mencionados, el aumento en los niveles de un regulador dependiente de  $\sigma^{54}$  podría estar relacionado a un aumento en la expresión de genes regulados por  $\sigma^{54}$  y que podrían estar involucrados en la adherencia de *A. ferrooxidans* y la formación de una biopelícula sobre el mineral.

## **6.8. Proteínas no caracterizadas**

En esta categoría se encontró 20 proteínas en hierro (11 proteínas inducidas y 9 reprimidas en presencia de cobre) y 10 proteínas en azufre (4 proteínas inducidas y 6 reprimidas en presencia de cobre) (Tablas 5-8). Estas proteínas probablemente son propias de *A. ferrooxidans* y pueden tener importantes funciones en la resistencia a cobre aún no definidas.

Finalmente, varias otras proteínas mostraron niveles de síntesis variables en *A. ferrooxidans* crecidos en azufre o hierro en presencia de cobre. Sin embargo, no se encontró una posible explicación a su comportamiento. Evidentemente, se requerirán otros estudios para dilucidar una posible función de estas proteínas durante la adaptación a metales tóxicos.

## **6.9. Diferencias en la respuesta inducida por el cobre en *A. ferrooxidans* crecidos en hierro versus azufre**

Los resultados obtenidos mostraron un número importante de cambios en los niveles de varias proteínas provocados por la presencia de cobre. Al comparar el efecto del cobre en ambos sustratos oxidables observamos que éste fue más discreto en bacterias crecidas en azufre. En hierro, el número de proteínas afectadas fue mayor, sugiriendo que en esta condición estarían involucrados más procesos biológicos. Estas diferencias sugieren que el estrés provocado por el cobre es más fuerte en hierro, probablemente debido a que ambos son metales redox capaces de generar estrés oxidativo.

Por otro lado, el cobre presenta una alta afinidad por el azufre y sus derivados, de manera que en presencia de este elemento en el medio de cultivo, el cobre podría ser “atrapado” disminuyendo su concentración nominal inicial agregada al cultivo y por ende, su toxicidad.

Adicionalmente, el incremento en la síntesis de proteínas asociadas a la adhesión al sustrato y la formación de la biopelícula sugiere que *A. ferrooxidans* crecido en azufre y en presencia de altas concentraciones de cobre formaría una biopelícula sobre la superficie de los gránulos de azufre lo cual mejoraría su resistencia al metal debido a que la matriz exopolimérica secuestraría parte del metal tóxico, evitando o disminuyendo en algún grado la entrada del cobre a las células.

Antecedentes previos señalan que existirían diferentes mecanismos de resistencia a metales pesados en la biopelícula y las células planctónicas (Teitzel y Parsek, 2003), lo cual podría explicar, al menos en parte, las diferencias observadas entre las células que crecen en azufre, las que estarían protegidas por una biopelícula, y las células planctónicas crecidas en hierro, las que estarían más vulnerables y expuestas a la acción del metal.

Por otro lado, se observó la inducción de mecanismos de resistencia similares en ambos sustratos oxidables (Tabla 9).



TABLA 9. Algunas proteínas que cambian sus niveles en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidos en azufre o hierro y en presencia de CuSO<sub>4</sub>

<b>AFE</b>	<b>Mecanismo / Proteína</b>	<b>Azufre</b>	<b>Hierro</b>
<b>Incremento del eflujo de cobre</b>			
1949	Proteína de membrana externa, eflujo de metales pesados putativa (CusCAf)	+	+
1948	Transportador, Eflujo de metales pesados, Subunidad MFP putativa (CusBAf)	+	+
1947	Bomba de eflujo de metales pesados, familia CzcA (CusAAf)	+	+
1880	Lipoproteína de membrana externa, sistema de eflujo RND, familia NodT	+	+
1879	Transportador, Eflujo de metales pesados, Subunidad MFP putativa	+	+
1878	Transportador, familia AcrB/AcrD/AcrF	+	+
<b>Otros transportes de iones</b>			
1862	Proteína de unión a metales pesados putativa	+	+
<b>Disminución de la entrada de cobre</b>			
2741	Proteína de membrana externa Omp 40 (Omp40)	-	-
2040	Receptor dependiente de TonB		-
2685	Proteína de la familia OmpA		-
105	Transportador de iones metálicos, familia NRAMP	-	

(+) Aumentó sus niveles, (-) Disminuyó sus niveles

En la Tabla 9 se observa que en ambos sustratos (Fe y S<sup>0</sup>) aumentó la síntesis de dos sistemas de eflujo del tipo RND. Junto con el aumento de estas bombas, se detectó la disminución de los niveles de la proteína Omp40. Estos resultados sugieren que el eflujo de cobre llevado a cabo por las bombas del tipo RND y la disminución de la difusión del cobre hacia la bacteria serían mecanismos de resistencia fundamentales frente a la presencia del metal. En conjunto ambos mecanismos regularían los niveles de cobre intracelular y mantendrían la concentración de cobre en rangos manejables, lo cual evitaría o disminuiría el efecto nocivo del metal sobre la célula. Esto podría ser potenciado cuando *A. ferrooxidans* crece en un sustrato sólido formando una biopelícula por lo que un menor número de proteínas serían afectadas por la presencia del metal.

Por el contrario, células crecidas en hierro estarían expuestas a altas concentraciones de cobre de manera directa, y el nivel de cobre intracelular probablemente sobrepasaría los mecanismos de eflujo, aumentando el daño a nivel celular. Este hecho induciría proteínas adicionales con el objetivo de disminuir la toxicidad del metal y provocaría el aumento en los niveles de proteínas involucradas en la reparación del daño generado por el cobre intracelular permitiendo la supervivencia de la célula.

Finalmente, un esquema de trabajo que resume los resultados obtenidos en esta Tesis se incluye en la figura 20.

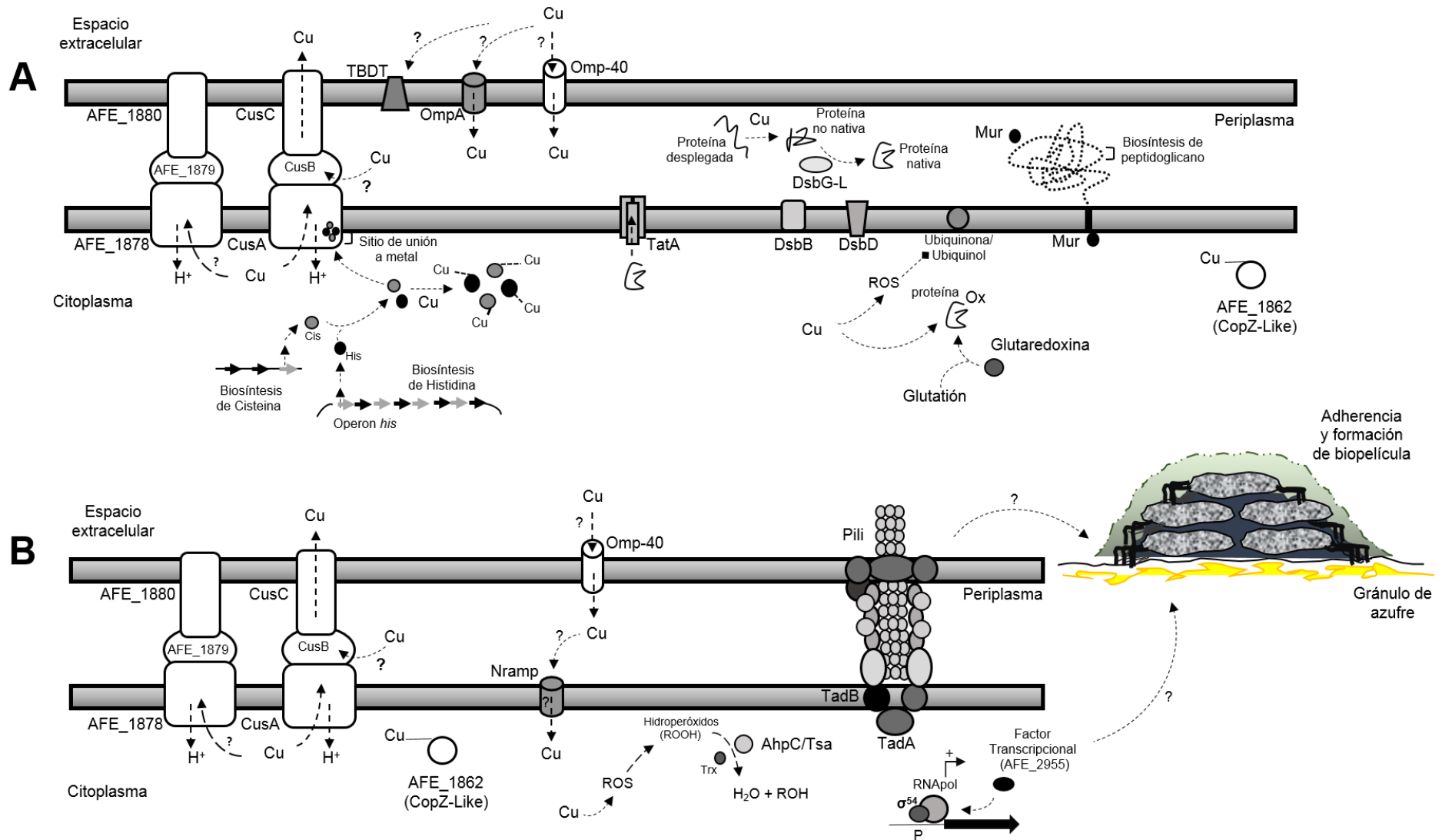


FIGURA 20. Modelo de trabajo que muestra esquemáticamente algunas proteínas que cambian sus niveles en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 adaptados a crecer en presencia de cobre en diferentes sustratos oxidables, hierro (A) o azufre (B), y sus posibles funciones. Las proteínas en blanco corresponden a aquellas que cambian en ambos sustratos.

## **6.10. Visión general de la respuesta de resistencia a cobre en *A. ferrooxidans***

Encontrar en *A. ferrooxidans* una proteína única y exclusiva o un único mecanismo ultraeficiente responsable de la gran capacidad de resistencia a cobre resulta poco factible. Probablemente la eficiencia biológica esté dada por la combinación de un conjunto de mecanismos llevados a cabo por diferentes proteínas.

Muchos de estos mecanismos probablemente se generaron y evolucionaron sobre la superficie de minerales como los sulfuros metálicos, ambientes altamente ácidos y ricos en metales, lo que pudo haber dotado a *A. ferrooxidans* de características únicas.

Es por ello que, si bien *A. ferrooxidans* presentaría los mismos determinantes de resistencia a cobre que otras bacterias mucho menos resistentes, la influencia de su medio ambiente pudo haber generado una ampliación en su repertorio de estrategias y la incorporación de novedosos mecanismos de resistencias con el objetivo de hacer frente a concentración de metales extremas.

Este estudio sobre estos mecanismos de resistencia puede dar cuenta de cómo *A. ferrooxidans* se adapta a las condiciones altamente estresantes de su medio ambiente y qué estrategias utilizaría para responder a las concentraciones de cobre altamente variables generadas en el proceso de biolixiviación o presentes en la naturaleza.

Una parte de los resultados obtenidos en esta Tesis fueron publicados recientemente (Almárcegui y cols., 2014).

## 7. Conclusión

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 tendría un amplio repertorio de estrategias para confrontar las altas concentraciones de cobre en su medio ambiente. Además de sistemas de resistencia canónicos previamente analizados y su duplicación, adquiriría resistencia a cobre por los siguientes mecanismos:

- a) Eflujo de cobre hacia el espacio extracelular llevado a cabo por bombas del tipo RND.
- b) Disminución del influjo de cobre, producto de la reducción de los niveles de las proteínas Omp40 y otros canales iónicos.
- c) Aumento de la biosíntesis de aminoácidos histidina y cisteína, fuertemente afines al cobre, cuya interacción disminuiría la toxicidad del cobre.
- d) Eficiente defensa antioxidante disminuyendo el daño oxidativo provocado por el cobre.
- e) Reparación del daño al plegamiento de proteínas periplasmáticas llevado a cabo por la disulfuro isomerasa DsbG-L.
- f) Posible incremento en la formación de biopelículas.
- g) Aumento en la biosíntesis de peptidoglicano como posible respuesta de reparación al daño del cobre sobre la pared celular.

## 8. Referencias

Aiking H, Stijnman A, Van Garderen C, Van Heerikhuizen H, Van 't Riet J. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1984;47:374-377.

Alifano P, Fani R, Lio P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, Bruni CB. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol. Rev.* 1996;60:44-69.

Almárcegui RJ, Navarro CA, Paradela A, Albar JP, von Bernath D, Jerez CA. New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: A quantitative proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 2014;13:946-960.

Alvarez S, Jerez CA. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004;70:5177-5182.

Amaro AM, Chamorro D, Seeger R, Arredondo R, Peirano I, Jerez CA. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 1991;173:910-915.

Appia-Ayme N, Guiliani N, Ratouchniak J, Bonnefoy V. Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa(3)-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999;65:4781-4787.

Argüello JM, Eren E, González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals.* 2007;20:233-248.

Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 1998;46:84-101.

Baillon ML, Van Vliet AH, Ketley JM, Constantinidou C, Penn CW. An iron-regulated alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) confers aerotolerance and oxidative stress resistance to the microaerophilic pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 1999;181:4798-4804.

Baker-Austin C, Dopson M. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* 2007;15:165-171.

- Baker-Austin G, Dopson M, Wexler M, Sawers RG, Stemmler A, Rosen BP, Bond PL. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Extremophiles*. 2007;11:425-434.
- Banci L, Bertini I, Del Conte R, Markey J, Ruiz-Dueñas FJ. Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ. *Biochemistry*. 2001;40:15660-15668.
- Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008;32:168-207.
- Belfiore C, Ordoñez OF, Farías ME. Proteomic approach of adaptive response to arsenic stress in *Exiguobacterium* sp. S17, an extremophile strain isolated from a high-altitude Andean Lake stromatolite. *Extremophiles*. 2013;17:421-431.
- Belik AS, Tarasova NN, Khmel IA. Regulation of biofilm formation in *Escherichia coli* K12: Effect of mutations in the genes *hns*, *strA*, *lon*, and *rpoN*. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* 2008;23:159-162.
- Bertsche U. The polysaccharide peptidoglycan and how it is influenced by (antibiotic) stress. In *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*; Ullrich, M., Ed.; Caister Academic Press: Norfolk, U.K. 2009;pp.3-26.
- Boyer A, Magnin JP, Ozil P. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass. *Biotechnol. Lett.* 1998;20:187-190.
- Braun R, Kinkl N, Beer M, Ueffing M. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007;398:1033-1045.
- Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BT, Rouch DA. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (*pco*) from *Escherichia coli* plasmid. pRJ1004. *Mol. Microbiol.* 1995;17:1153-1166.
- Buck M, Gallegos MT, Studholme DJ, Guo Y, Gralla JD. The bacterial enhancer-dependent sigma (54) (sigma (N)) transcription factor. *J. Bacteriol.* 2000;182:4129-4136.
- Cárdenas JP, Valdés J, Quatrini R, Duarte F, Holmes DS. Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;88:605-620.

Carlos C, Reis FC, Vicentini R, Madureira DJ, Ottoboni LM. The rus operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. *Curr. Microbiol.* 2008;57:375-380.

Cha JS, Cooksey DA. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991;88:8915-8919.

Cha MK, Kim HK, Kim IH. Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1995;270:28635-28641.

Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994;91:7017-7021.

Chaturvedi KS, Hung CS, Crowley JR, Stapleton AE, Henderson JP. The siderophore yersinia bactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat. Chem. Biol.* 2012;8:731-736.

Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* 2006;1:1852-1858.

Chi A, Valenzuela L, Beard S, Mackey AJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007;12:2239-2251.

Chiang P, Burrows LL. Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2003;185:2374-2378.

Chivers PT, Benanti EL, Heil-Chapdelaine V, Iwig JS, Rowe JL. Identification of Ni-(L-His)<sub>2</sub> as a substrate for NikABCDE-dependent nickel uptake in *Escherichia coli*. *Metallomics.* 2012;4:1043-1050.

Chisholm I, Leduc L, Ferroni G. Metal resistance and plasmid DNA in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73:245-254.

Cook GM, Poole RK. Oxidase and periplasmic cytochrome assembly in *Escherichia coli* K-12: CydDC and CcmAB are not required for haem-membrane association. *Microbiology.* 2000;146:527-536.



- Cooksey D. Copper uptake and resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* 1993;7:1-5.
- Das A, Modak JM, Natarajan KA. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1998;73:215-222.
- Deutscher J, Francke C, Postma PW. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006;70:939-1031.
- Dinh T, Paulsen IT, Saier MH. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 1994;176:3825-3831.
- Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi PR, Philip LB. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology.* 2003;149:1959-1970.
- Espariz M, Checa SK, Audero ME, Pontel LB, Soncini FC. Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology.* 2007;153:2989-2997.
- Esparza M, Cárdenas JP, Bowien B, Jedlicki E, Holmes DS. Genes and pathways for CO<sub>2</sub> fixation in the obligate, chemolithoautotrophic acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, carbon fixation, Carbon fixation in *A. ferrooxidans*. *BMC Microbiol.* 2010;10:229.
- Fan B, Grass G, Rensing C, Rosen BP. *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;286:414-418.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Rev. Microbiol.* 2010;8:623-33.
- Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2003;185:3804-3812.
- Fröbel J, Rose P, Müller M. Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philos. Trans. R. Soc.* 2012;367:1029–1046.
- Fuentes DE, Fuentes EL, Castro ME, Pérez JM, Araya MA, Chasteen TG, Pichuantes SE, Vasquez CC. Cysteine metabolism-related genes and bacterial resistance to potassium tellurite. *J. Bacteriol.* 2007;189:8953-8960.

- Gale NL, Beck JV. Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 1967;94:1052-1059.
- González-Guerrero M, Argüello JM. Mechanism of Cu<sup>+</sup>-transporting ATPases: soluble Cu<sup>+</sup> chaperones directly transfer Cu<sup>+</sup> to transmembrane transport sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008;105:5992-5997.
- Grass G, Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;286:902-908.
- Grass G, Thakali K, Klebba PE, Thieme D, Müller A, Wildner GF, Rensing C. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004;186:5826-5833.
- Guilliani N, Jerez CA. Molecular cloning, sequencing, and expression of omp-40, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000;66:2318-2324.
- Hajduch M, Rakwal R, Kumar-Awaral G, Yonekura M, Petrova A. High resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress related proteins. *Electrophoresis.* 2001; 22:2824-2831.
- Harrison JJ, Ceri H, Turner RJ. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007;5:928-938.
- Hechard Y, Pelletier C, Cenatiempo Y, Frere J. Analysis of sigma (54)-dependent genes in *Enterococcus faecalis*: a mannose PTS permease (EIIMan) is involved in sensitivity to a bacteriocin, mesentericin Y105. *Microbiol.* 2001;147:1575-1580.
- Hiniker A, Collet JF, Bardwell J. Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* 2005;40:33785-33791.
- Hödar C, Moreno P, di Genova A, Latorre M, Reyes-Jara A, Maass A, González M, Cambiazo V. Genome wide identification of *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270) transcription factors and comparative analysis of ArsR and MerR metal regulators. *Biometals.* 2012;25:75-93.
- Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature.* 2005;436:1171-1175.

Hu Q, Wu X, Jiang Y, Liu Y, Liang Y, Liu X, Yin H, Baba N. Differential gene expression and bioinformatics analysis of copper resistance gene *afe\_1073* in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Trace Elem. Res.* 2013;152:91-97.

Ingle R, Mugford S, Rees J, Campbell M, Smith A. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *Plant Cell.* 2005;17:2089-2106.

Ito K, Inaba K. The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008; 18:450-458.

Iyer VS, Hancock LE. Deletion of Sigma54 (*rpoN*) alters the rate of autolysis and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 2011;194:368-375.

Jeong W, Cha MK, Kim IH. Thioredoxin-dependent hydroperoxide peroxidase activity of bacterioferritin comigratory protein (BCP) as a new member of the thiol-specific antioxidant protein (TSA)/Alkyl hydroperoxide peroxidase C (AhpC) family. *J. Biol. Chem.* 2000;275:2924-2930.

Jerez, C. A. Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed; Moo-Young, M., Ed.;Elsevier: Boston, MA, 2011, Vol3, pp 717-729.

Jerez CA. The use of extremophilic microorganism in the industrial recovery of metals. In *Extremophiles: Sustainable resources and Biotechnological Implications*. (Om. V. Singh, ed.). 2013;pp.319-334. John Wiley and sons,Inc.

Jünemann S. Cytochrome bd terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997;1321:107-127.

Kachlany SC, Planet PJ, Bhattacharjee MK, Kollia E, DeSalle R, Fine DH, Figurski DH. Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* 2000;182:6169-6176.

Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs.* 2011;34:737-51.

Kim EH, Nies DH, Rensing C. Switch or funnel: how RND type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J. Bacteriol.* 2011;193:2381-2387.

- Koerdt A, Gödeke J, Berger J, Thormann KM, Albers SV. Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PLoS One*. 2010;5:e14104.
- Kohen R, Abraham A. Oxidation of biological systems, oxidative stress phenomena, antioxidant, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* 2002;30:620-650.
- Kornberg A, Rao N, Ault-Riche D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Ann. Rev. Microbiol.* 1999;68:89-125.
- Kucera J, Bouchal P, Cerna H, Potesil D, Janiczek O, Zdrahal Z, Mandl M. Kinetics of anaerobic elemental sulfur oxidation by ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and protein identification by comparative 2-DE-MS/MS. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2012; 101:561-573.
- Kung CS, Huang WN, Huang YC, Yeh KC. Proteome survey of copper binding proteins in *Arabidopsis thaliana* by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics*. 2006;6:2746-2758.
- Lapaglia C, Hartzell PL. Stress-Induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997;63:3158-3163.
- Lee PA, Tullman-Ercek D, Georgiou G. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006;60:373-395.
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001;45:999-1007.
- Lillig CH, Berndt C, Holmgren A. Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta*. 2008; 1780:1304-1317.
- Magnani D, Solioz M. How bacteria handle copper. *Microbiol. Monogr.* 2007;6:259-285.
- Martins A, Spengler G, Rodrigues L, Viveiros M, Ramos J, Martins M, Couto I, Fanning S, Pagès JM, Bolla JM, Molnar J, Amaral L. pH Modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: protection during its passage and eventual colonization of the colon. *Plos One*. 2009;4:e6656.
- Monsieurs P, Moors H, Van Houdt R, Janssen PJ, Janssen A, Coninx I, Mergeay M, Leys N. Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals*. 2011;24:1133-1151.

Morales L, Armenta N, Méndez V, Ruiz E, González D, Grimaldo O, Cervantes L, Aviles M. Copper induced biofilm formation and changes on photosynthetic pigment in *Euglena gracilis*. African J. Microbiol. Res. 2012;6:1833-1836.

Munson GP, Lam DL, Outten WL, O'Halloran TV. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 2000;182:5864-5871.

Navarro CA, Orellana LH, Mauriaca C, Jerez CA. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. Appl. Environ. Microbiol. 2009;75:6102-6109.

Nevo Y, Nelson N. The NRAMP family of metal-ion transporters. Biochim. Biophys. Acta. 2006;1763:609-620.

Nikaido H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 2011;77:1-60.

Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ, Buchanan SK. Ton-B dependent transporters: regulation, structure, and function. Annu. Rev. Microbiol. 2010;64:43-60.

Orell A, Navarro CA, Arancibia R, Mobarec JC, Jerez CA. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. Biotechnol. Adv. 2010;28:839-848.

Orell A, Navarro CA, Rivero M, Aguilar JS, Jerez CA. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. Extremophiles. 2012;16:573-583

Orellana LH, Jerez CA. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011;92:761-767.

Osorio H, Mangold S, Denis Y, Ñancucheo I, Esparza M, Johnson DB, Bonnefoy V, Dopson M, Holmes DS. Anaerobic sulfur metabolism coupled to dissimilatory iron reduction in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. 2013;79:2172-2181.

Osorio H, Martínez V, Nieto PA, Holmes DS, Quatrini R. Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. BMC Microbiol. 2008;8:203.

Outten FW, Outten CE, Hale J, O'Halloran TV. Transcriptional activation of an *E. coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. *J. Biol. Chem.* 2000;275:31024-31029.

Padilla-Benavides T, McCann CJ, Argüello JM. The mechanism of Cu<sup>+</sup> transport ATPases: interaction with Cu<sup>+</sup> chaperones and the role of transient metal-binding sites. *J. Biol. Chem.* 2013;288:69-78.

Paulsen IT, Park JH, Choi PS, Saier MH. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997;156:1-8.

Pearce DA, Sherman F. Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 1999;181: 4774-4779.

Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006;4:629-636.

Predki PF, Sarkar B. Effect of replacement of "zinc finger" zinc on estrogen receptor DNA interactions. *J. Biol. Chem.* 1992;267:5842-5846.

Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002;6:171-180.

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

Rawlings DE. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002;56:65-91.

Remonsellez F, Orell A, Jerez CA. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology.* 2006; 152:59-66.

Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000;97:652-656.

Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 2002;27:197-213.

Rodrigues CM, Takita MA, Coletta-Filho HD, Olivato JC, Caserta R, Machado MA, de Souza AA. Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008;77:1145-1157.

Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 2000;132:365-386.

Saier MH, Tam R, Reizer A, Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 1994;11:841-847.

Saldias MS, Lamothe J, Wu R, Valvano MA. 2008. *Burkholderia cenocepacia* requires the RpoN sigma factor for biofilm formation and intracellular trafficking within macrophages. *Infect. Immun.* 2008;76:1059-1067.

Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 2002; 184:1140-1154.

Schägger H, Von Jagow G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 1991;2:223-231.

Schauer K, Rodionov DA, DeReuse H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem. Sci.* 2008;33:330-338.

Silva M, Ferreira A, Rodriguez M, Wolff D. The major *Thiobacillus ferrooxidans* outer membrane protein forms low conductance ion channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* 1992;296:169-173.

Singh SK, Grass G, Rensing C, Montfort WR. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2004;186:7815-7817.

Sitthisak S, Knutsson L, Webb JW, Jayaswal RK. Molecular characterization of the copper transport system in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 2007;153:4274-4283.

Soballe B, Poole RK. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2000;146:787-796.

Sochor J, Zitka O, Hynek O, Jilkova E, Krejцова L, Trnkova L, Adam V, Hubalek J, Kynicky J, Vrba R, Kizek R. Bio-sensing of Cadmium(II) ions using *Staphylococcus aureus*. *Sensors.* 2011;11:10638-10663.

- Soloz M, Vulpe C. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* 1996;21:237-241.
- Stenberg F, Chovanec P, Maslen SL, Robinson CV, Ilag LL, Von Heijne G, Daley DO. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Biol. Chem.* 2005;41: 34409-34419.
- Sugawara E, Nikaido H. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 1992;2674:2507-2511.
- Teitzel G, Geddie A, De Long S, Kirisits M, Whiteley M, Parsek M. Survival and growth in the presence of elevated copper: Transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 2006;188:7242-7256.
- Teitzel G, Parsek M. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003;69:2313-2320.
- Teixeira EC, Franco de Oliveira JC, Marques Novo MT, Bertolini MC. The copper resistance operon copAB from *Xanthomonas axonopodis* pathovar citri: gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiology.* 2008;154:402-412.
- Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signalling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2000;279:1005-1028.
- Tomich M, Planet PJ, Figurski DH. The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007;5:363-375.
- Valdés J, Pedroso I, Quatrini R, Dodson RJ, Tettelin H, Blake R, Eisen JA, Holmes DS. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics.* 2008;9:597.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 2005;12:1161-1208.
- VanOrsdel CE, Bhatt S, Allen RJ, Brenner EP, Hobson JJ, Jamil A, Haynes BM, Genson AM, Hemm MR. The *Escherichia coli* CydX protein is a member of the CydAB cytochrome bd oxidase complex and is required for cytochrome bd oxidase activity. *J. Bacteriol.* 2013;195:3640-3650.



Van Veen H, Abee T, Kortstee G, Koning W, Zehnder A. Translocation of metal phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1994;33:1766-1770.

Varela C, Mauriaca C, Paradela A, Albar JP, Jerez CA, Chavez FP. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol*. 2010;10:17.

Vera M, Krok B, Bellenberg S, Sand W, Poetsch A. Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite. *Proteomics*. 2013;13:1133-1144.

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

Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev*. 2010;32:149-167.

Watling HR. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides-a review. *Hydrometallurgy*. 2006;84:81-108.

Wolfe AJ, Millikan DS, Campbell JM, Visick KL. *Vibrio fischeri* sigma (54) controls motility, biofilm formation, luminescence, and colonization. *Appl. Environ. Microbiol*. 2004;70:2520-2524.

Wu X, Hu Q, Hou D, Miao B, Liu X. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* strains possessing dissimilar copper resistance. *J. Gen. Appl. Microbiol*. 2010;56:491-498.

Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* rus operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology*. 2004;150:2113-2123.

Zhang C, Xia J, Liu Y, He H, Qiu G. The putative thioldisulphide interchange protein DsbG from *Acidithiobacillus ferrooxidans* has disulphideisomerase activity. *ScienceAsia*. 2010;36:100-104.

Zhao K, Liu MZ, Burgess RR. Promoter and regulon analysis of nitrogen assimilation factor, Sigma (54), reveal alternative strategy for *E. coli* MG1655 flagellar biosynthesis. *Nucleic Acids Res*. 2010;38:1273-1283.

Zhuoer L, Fernández-Robledo JA, Cellier M, Gerardo R. Metals and membrane metal transporters in biological system: The role(s) of Nramp in host-parasite interactions. *J. Arg. Chem. Soc.* 2009;97:210-225.

**9. ANEXO** (página siguiente)



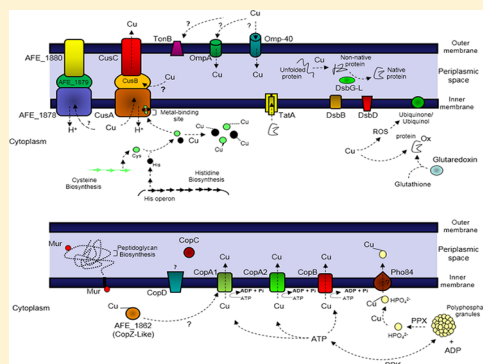
# New Copper Resistance Determinants in the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: A Quantitative Proteomic Analysis

Rodrigo J. Almárcegui,<sup>†</sup> Claudio A. Navarro,<sup>†</sup> Alberto Paradela,<sup>‡</sup> Juan Pablo Albar,<sup>‡</sup> Diego von Bernath,<sup>†</sup> and Carlos A. Jerez<sup>\*,†</sup><sup>†</sup>Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Chile, Santiago Casilla 653 Chile<sup>‡</sup>Proteomics Laboratory, National Biotechnology Center, Madrid 28049, Spain

## Supporting Information

**ABSTRACT:** *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an extremophilic bacterium used in biomining processes to recover metals. The presence in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 of canonical copper resistance determinants does not entirely explain the extremely high copper concentrations this microorganism is able to stand, suggesting the existence of other efficient copper resistance mechanisms. New possible copper resistance determinants were searched by using 2D-PAGE, real time PCR (qRT-PCR) and quantitative proteomics with isotope-coded protein labeling (ICPL). A total of 594 proteins were identified of which 120 had altered levels in cells grown in the presence of copper. Of this group of proteins, 76 were up-regulated and 44 down-regulated. The up-regulation of RND-type Cus systems and different RND-type efflux pumps was observed in response to copper, suggesting that these proteins may be involved in copper resistance. An overexpression of most of the genes involved in histidine synthesis and several of those annotated as encoding for cysteine production was observed in the presence of copper, suggesting a possible direct role for these metal-binding amino acids in detoxification. Furthermore, the up-regulation of putative periplasmic disulfide isomerases was also seen in the presence of copper, suggesting that they restore copper-damaged disulfide bonds to allow cell survival. Finally, the down-regulation of the major outer membrane porin and some ionic transporters was seen in *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper, indicating a general decrease in the influx of the metal and other cations into the cell. Thus, *A. ferrooxidans* most likely uses additional copper resistance strategies in which cell envelope proteins are key components. This knowledge will not only help to understand the mechanism of copper resistance in this extreme acidophile but may help also to select the best fit members of the biomining community to attain more efficient industrial metal leaching processes.

**KEYWORDS:** copper resistance, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, isotope-coded protein labelling (ICPL), cell envelope proteins



## 1. INTRODUCTION

Industrial biomining processes to extract copper, gold and other metals involve the use of a mixed microbial community that often comprises both autotrophic and heterotrophic acidophilic species capable of oxidizing iron and sulfur. Widely used biomining microorganisms such as *Acidithiobacillus ferrooxidans* can be adapted to grow in the presence of >100 mM copper sulfate.<sup>1</sup> This property is important for the use of this microorganism in biomining processes, where copper levels usually range between 15 and 100 mM CuSO<sub>4</sub>.<sup>2–4</sup>

The genetic and biochemical mechanisms responsible for metal resistance in acidophilic Bacteria and Archaea are still largely uncharacterized.<sup>5–8</sup> Current knowledge indicates that key elements involved in *A. ferrooxidans* copper-resistance appear to be the following: a wide repertoire of known copper-resistance determinants and their duplication, the presence of novel copper-chaperones, an abundant reserve of inorganic polyphosphate (polyP) used in a polyP-based copper-resistance

system and a defensive response to oxidative stress.<sup>9–11</sup> *A. ferrooxidans* ATCC 23270 can survive high copper concentrations by having in its genome at least 10 genes that are possibly related to copper homeostasis. These include three genes coding for putative ATPases related to the transport of copper (*copA*<sub>Af</sub>, *copA2*<sub>Af</sub> and *copB*<sub>Af</sub>), three genes related to a system of the RND family, involved in the extraction of copper from the cell (*cusA*<sub>Af</sub>, *cusB*<sub>Af</sub>, *cusC*<sub>Af</sub>), and two genes coding for periplasmic chaperones for this metal (*cusF*<sub>Af</sub> and *copC*<sub>Af</sub>). These *A. ferrooxidans* copper-resistance determinants were found to be overexpressed when this bacterium was adapted to CuSO<sub>4</sub> in the range of 5–25 mM and conferred a greater resistance to copper in *Escherichia coli* cells expressing the *A. ferrooxidans* genes compared to wild-type cells, supporting their functionality.<sup>12</sup>

Received: September 26, 2013

The *A. ferrooxidans* ATCC 53993 genome contains the same copper resistance determinants as those in strain ATCC 23270 plus a 160 kb genomic island (GI), which is absent in the ATCC 23270 type strain. Among other genes, this GI contains several genes coding for an additional putative copper-ATPase and a Cus system. Copper resistance in strain ATCC 53993 is most likely explained by the presence of the additional copper-resistance genes in its GI. As determined by qRT-PCR, it was demonstrated that these genes are overexpressed when *A. ferrooxidans* ATCC 53993 is grown in the presence of copper and the proteins were shown to be functional when synthesized in copper-sensitive *E. coli* mutants.<sup>13</sup> In conclusion, the grounds for resistance to copper of two strains of the same acidophilic microorganism could be determined by slight differences in their genomes, which may not only lead to changes in their capacities to adapt to their environment, but may also indicate which microorganisms are the best for industrial biomining operations.<sup>4</sup>

A recent study utilizing whole-genome DNA microarrays reported genes related to the copper stress response were overexpressed in an *A. ferrooxidans* strain isolated from a copper bioleaching operation in Atacama Desert, Chile. However, as mentioned by the authors this strain apparently corresponds to *A. ferridurans*.<sup>14</sup>

The aim of this work was to search for new possible copper resistance determinants in *A. ferrooxidans* strain ATCC 23270 by using a quantitative proteomic approach. Several proteins were highly up-regulated when the microorganisms were grown in the presence of copper. Some of these macromolecules may have an important role in the adaptability of the microorganisms to their environment.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial Strains and Growth Conditions

*A. ferrooxidans* strain ATCC 23270 was grown at 30 °C in 9K medium containing ferrous sulfate (33.33 g/L) with an initial pH of 1.45–1.5 in the absence or presence of CuSO<sub>4</sub> as previously described.<sup>15</sup>

### 2.2. Preparation of Total Membrane Fraction

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 was adapted to different copper sulfate concentrations (0, 5, 20, or 50 mM) and was grown until the culture reached between  $1 \times 10^8$  and  $5 \times 10^8$  cells/mL. Cells were harvested by centrifugation (10 000g for 2 min at 25 °C) and were resuspended in sonication buffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). Disruption by sonication was done on ice by using a Misonix XL2020 sonicator (Farmingdale, NY, USA) with 20% intensity and cycles of 15 s on, 30 s off, for a total time of 15 min. Cell debris was removed by centrifugation at 10 000g for 10 min at 4 °C. Protein quantitation was performed by using Bio-Rad protein assay system.

The supernatant was centrifuged at 100 000g for 1 h at 4 °C to separate the total membrane fraction. This fraction was resuspended in ACA750 buffer (750 mM *n*-aminocaproic acid, 50 mM Bis-Tris/HCl pH 7) and samples were stored at –80 °C.<sup>16</sup> Protein content was determined by using the BCA assay (PIERCE) as the components of the ACA750 buffer interferes with protein determination when using the Bio-Rad system.

### 2.3. Preparation of Membrane Protein Samples and 2D-PAGE

Approximately 400 µg of proteins from the total membrane fraction was solubilized in ACA750 buffer containing 5% (v/v) *n*-

dodecyl β-D-maltoside. Samples were then incubated on ice for 2 h with vortexing every 20 min. Following solubilization, samples were centrifuged at 16 000g for 20 min at 4 °C. Proteins in the supernatant were precipitated with the Ready-Prep 2D cleanup Bio-Rad Kit. Precipitated proteins were resuspended in 300 µL of isoelectric focusing (IEF) buffer (8 M urea, 2 M thiourea, 0.001% bromophenol blue, 2% *n*-dodecyl β-D-maltoside) followed by the addition of 100 mM dithiothreitol (DTT) and 2% Bio-Rad ampholytes and the sample mix was incubated for 1 h at 25 °C. The entire volume was loaded into the protean IEF focusing Tray (17 cm) using strip pH range 3-10NL (Ready Strip IPG). Focused proteins in the strip were then incubated at 25 °C with gentle agitation for 15 min in equilibrium buffer (6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 24 mM Tris/HCl pH 6.8) containing 2% DTT followed by a 15 min incubation in equilibrium buffer containing 2.5% iodoacetamide. Finally, the strip was placed onto a 12.5% polyacrylamide gel for the second dimension SDS-PAGE.<sup>17</sup> The gels were stained with silver nitrate as described previously.<sup>18</sup>

### 2.4. MS Analysis of Proteins Extracted from 2D Gels and Protein Identification

Appropriate copper concentrations to be used in the quantitative proteomic determinations were studied by means of a preliminary 2D-PAGE analysis. Thus, the copper concentrations employed were those in which clearly visible differential changes were observed in triplicate gel runs of samples grown at 0, 5, 20, and 50 mM copper. Under these conditions, a few proteins were not present in the control but were greatly up-regulated (e.g., DsbG) or greatly reduced in the presence of the metal (e.g., Omp40). An image analysis by using the free ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) was done and a quantitative statistical evaluation of the selected spots of interest was obtained (Table S1a). These proteins were recovered from silver nitrate-stained 2D gels (obtained from three biological replicates in each case) by excising the protein spots. Each spot was identified by MALDI TOF/TOF analysis as described previously.<sup>17</sup> (See Tables S1b, S3).

### 2.5. Quantitative Proteomics

**2.5.1. Total Protein Extracts Preparation for ICPL Analysis.** *A. ferrooxidans* was grown with ferrous iron as substrate until late exponential phase in the absence or presence of 40 mM CuSO<sub>4</sub>. Cells were harvested by centrifugation (10 000g for 2 min) and were first washed three times with dilute sulfuric acid (pH 1.5) by centrifugation at 0 °C as previously described.<sup>15</sup> This was followed by three washes with 50 mM sodium citrate at pH 7.0 by centrifugation at 0 °C to remove any minor ferrous iron remaining and at the same time to neutralize the pH before cell rupture by sonic oscillation. Cells were then resuspended in sonication buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) containing PMSF as protease inhibitor (100 µg/mL) and were disrupted by sonic oscillation during 30 min on ice by using successive 15 s pulses. Finally, the lysate was centrifuged at 10 000g for 10 min to remove unbroken cells and cell debris and the total proteins in the cell-free extract were determined.

**2.5.2. Sample Preparation for ICPL Determinations.** Samples of total protein extracts from three different independent cultures (fifty micrograms of each one) were mixed to obtain a triplicate representative sample of each experimental condition with a total of 150 µg of protein. These mixtures were lyophilized for 48 h at –40 °C. Finally, the dried samples were stored at –20 °C until their isotope-coded protein label (ICPL) labeling.

**2.5.3. Protein Digestion and ICPL-Labeling.** The ICPL-reagent protocol was optimized for labeling of 100  $\mu\text{g}$  of each individual sample per experiment. Thus, 100  $\mu\text{g}$  of total protein extracts was individually dissolved in 8 M urea 25 mM ammonium bicarbonate, reduced and alkylated with iodoacetamide. The urea concentration was reduced to 2 M with 25 mM ammonium bicarbonate and the sample was digested with trypsin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) with a ratio of 25:1 overnight at 37 °C. Before ICPL-labeling, salts and urea were removed using high-capacity OMIX C18 tips (Varian, Palo Alto, CA). Sample labeling with the light and heavy versions of the ICPL reagent (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germany) was performed at the peptide level according to the manufacturer's instructions.

**2.5.4. 2D-Nano LC ESI-MS/MS Analysis.** ICPL-labeled combined samples (200  $\mu\text{g}$  per experiment) were dissolved in 100  $\mu\text{L}$  of 10 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$  in water, pH 9.5, and fractionated in a wide-pH range, 5  $\mu\text{m}$  particle size,  $100 \times 2.1$  mm reversed phase XBridge column (Waters) using a Knauer Smartline HPLC system. Gradient elution was performed according to the following scheme: isocratic conditions of 10 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$  in water, pH 9.5, for 5 min, a linear increase to 25% B (10 mM  $\text{NH}_4\text{OH}$  in 80% methanol, 20% water, pH 9.5) in 10 min followed by a linear increase to 75% B in 40 min, a linear increase to 100% B in 5 min, isocratic conditions of 100% B for 5 min, and return to initial conditions in 2 min. Flow-rate was 150  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Injection volume was 100  $\mu\text{L}$  and the wavelength was monitored at 214 nm. Approximately 25–30 individual HPLC fractions (2 min each), were collected in each experiment, dried in a speed-vac and stored at  $-20$  °C until needed. Second dimension of the 2D-nano LC ESI-MS/MS analysis was performed using an Ultimate 3000 nanoHPLC (Dionex, Sunnyvale, CA) coupled with an HCT Ultra ion-trap mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The analytical column was a silica-based reversed phase column C18 PepMap 75  $\mu\text{m} \times 15$  cm, 3  $\mu\text{m}$  particle size, and 100 Å pore size (Dionex, Sunnyvale, CA). The trap column was a C18 PepMap (Dionex, Sunnyvale, CA), 5  $\mu\text{m}$  particle diameter, 100 Å pore size, switched online with the analytical column. The loading pump delivered a solution of 0.1% trifluoroacetic acid in 98% water/2% acetonitrile (LabScan, Gliwice, Poland) at 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The nanopump provided a flow-rate of 300 nL/min and was operated under gradient elution conditions, using 0.1% formic acid (Fluka, Buchs, Switzerland) in water as mobile phase A, and 0.1% formic acid in 80% acetonitrile/20% water as mobile phase B. Gradient elution was performed according to the following scheme: isocratic conditions of 96% A: 4% B for 5 min, a linear increase to 40% B in 60 min, a linear increase to 95% B in 1 min, isocratic conditions of 95% B for 7 min and return to initial conditions in 10 min. Injection volume was 5  $\mu\text{L}$  and the wavelength was monitored at 214 and 280 nm. The LC system was coupled via a nanospray source (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) to a 3D ion trap mass spectrometer operating in positive ion mode with the capillary voltage set at 1400 V. Automatic data-dependent acquisition allowed sequential full scan ( $m/z$  350–1500) MS spectra followed by tandem MS CID spectra of the four most abundant precursor ions. Dynamic exclusion was applied to prevent the same  $m/z$  from being isolated for 1 min after its fragmentation.

**2.5.5. Protein Identification and Quantitative Analyses.** MS and MS/MS data obtained for individual HPLC fractions were merged using the Analysis Combiner tool and subsequently processed as a single experiment using DataAnalysis 3.4 (Bruker

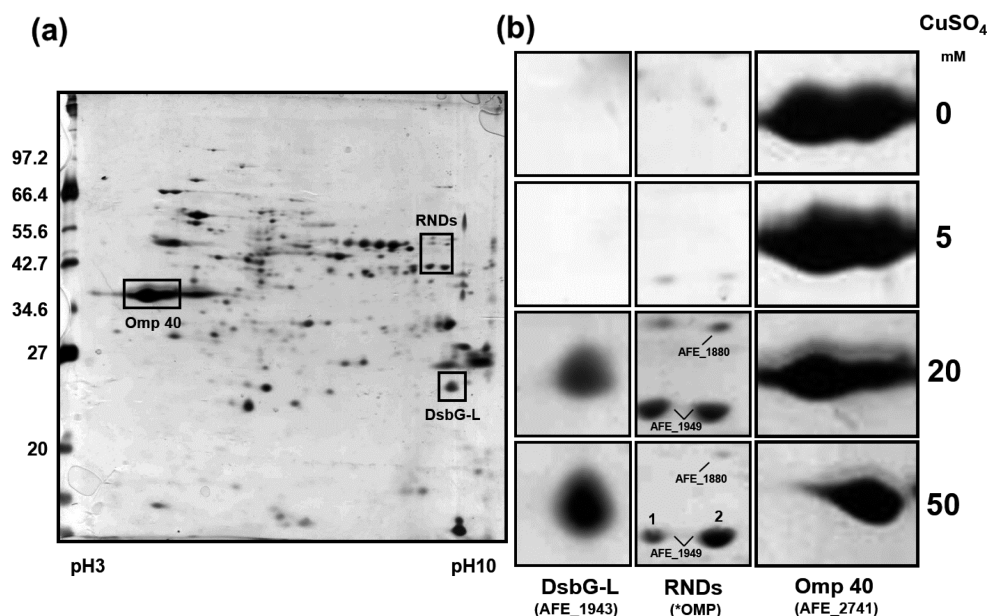
Daltonics, Bremen, Germany). For protein identification, MS/MS spectra (in the form of Mascot generic files) were searched against the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 UniprotKB forward-reversed database (<http://www.uniprot.org>) containing 2747 entries and their corresponding reversed sequences. Sequence reversal was done using the program DBToolkit v4.1.5. Database searches were done using a licensed version of Mascot v.2.2.04 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com); Matrix Science, London, U.K.). Search parameters were set as follows: tryptic digestion, carbamidomethyl cysteine as fixed modification, oxidized methionine and ICPL-labeling of lysine residues and/or peptide amino termini as variable ones. Peptide mass tolerance was set at 0.6 Da both in MS and MS/MS mode, and 1 missed cleavage was allowed. In most cases, an accuracy of  $\pm 0.1$ –0.2 Da was found both for MS and MS/MS spectra. The False Discovery Rate (FDR) of  $\leq 5\%$  for peptide identification was manually assessed as follows: after database searching, peptide matches were ranked according to their Mascot scores. This list contains peptide sequences matching either forward or reversed database sequences. Then, a subset containing 5% of peptides matching the reversed sequences was extracted, and all the proteins resulted for that FDR were used for further quantitative analysis. Qualitative and quantitative analyses were performed by WARP-LC 1.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using the parameters described above. First, all the peptides were identified, and then, based on a single ICPL-labeled identified peptide, the software calculated the extracted ion chromatogram for the putative ICPL-labeled pair according to: (a) the mass shift defined by the labeling reagent, (b) a mass tolerance of 0.5 Da, and c) a retention time tolerance of 40 s. Relative ratios between light and heavy ICPL-labeled peptides were calculated based on the intensity signals of their corresponding monoisotopic peaks, and according to these individual peptide ratios the software calculates the protein ratio. Finally, ratios were  $\log_2$ -transformed and normalized by subtracting the median value. Table S4 contains all quantitation data obtained.

## 2.6. Whole-Genome Alignments

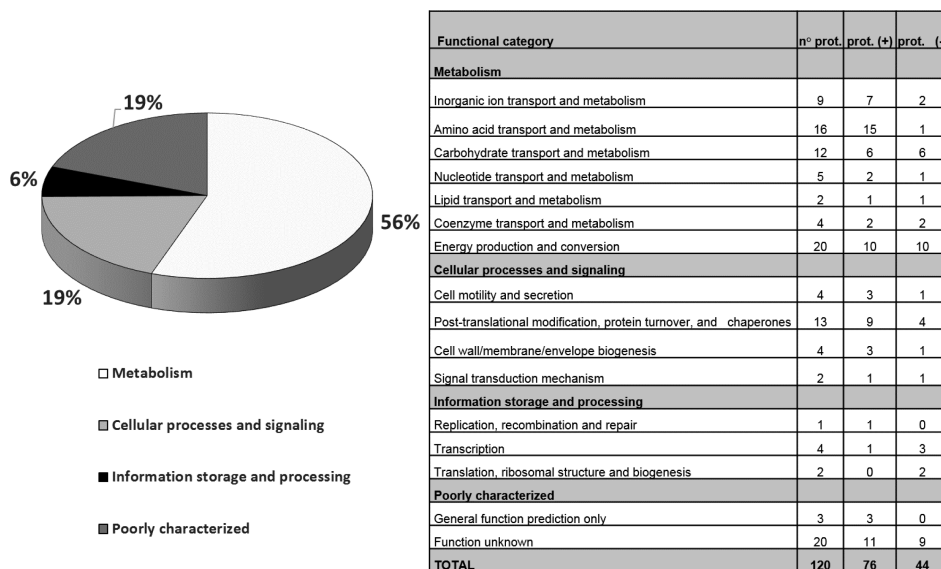
The annotated genome of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://cmr.jcvi.org/>) was used to perform whole-genome alignment using Mauve software.<sup>19</sup> Whole-genome representations and gene context graphics were carried out using the Geneious PRO 4.7 software.

## 2.7. Extraction of Total RNA from *A. ferrooxidans* and cDNA Synthesis

To determine the effect of copper on the expression of genes of interest, cells were adapted in batch cultures to grow in the presence of different  $\text{CuSO}_4$  concentrations (0, 20, 30, and 50 mM) until the late exponential growth phase was reached. At this time, total RNA was extracted standardly from each culture condition by lysing the cells as previously reported,<sup>12,13,20</sup> except that TRIzol (Invitrogen) was used for the extraction. Between three to five biological replicas were used for each experimental condition. Any remaining DNA was eliminated from the RNA preparations by the addition of 4 U of TURBO DNA-free DNase (Ambion) following the manufacturer's instructions. For cDNA synthesis, 0.8  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed for 1 h at 42 °C using ImProm-II (Promega), 0.5  $\mu\text{g}$  of random hexamers (Promega) and 3 mM  $\text{MgCl}_2$ .<sup>13</sup>



**Figure 1.** Separation of *A. ferrooxidans* total membrane fraction proteins by 2D-PAGE. Microorganisms were grown in ferrous iron-containing 9K medium at the copper sulfate concentrations indicated. (a) Complete gel with proteins from cells grown in the presence of 20 mM  $\text{CuSO}_4$ . Areas labeled with squares or rectangles indicate some of the protein spots that were differentially synthesized compared with the control in the absence of the metal. Except for Omp-40, these proteins were isolated from the gels for their identification by MS/MS spectrometry (Table S1b). The position of Omp-40 in these type of gels and its N-terminal end amino acid sequence has been previously reported.<sup>22</sup> (b) Amplification of the areas shown in (a) from the corresponding gels in which the membrane proteins analyzed were from cells grown at the indicated increasing  $\text{CuSO}_4$  concentrations. \*OMP (Outer membrane protein).



**Figure 2.** Functional categories and numbers of *A. ferrooxidans* proteins changing their synthesis levels in cells grown in the presence of copper. The pie chart refers only to the proteins listed in the table.

### 2.8. Primer Design, Real-Time RT-PCR, and Cloning of *A. ferrooxidans* Genes

Primers for qRT-PCR were designed using the Primer3 software<sup>21</sup> as reported before<sup>12</sup> (Table S2). After separating PCR products by electrophoresis in a 1% agarose gel (0.5× Tris-acetate-EDTA pH 8.0 buffer), no cross-amplification or nonspecific bands were detected.

Copper-resistance related gene expression was analyzed by qRT-PCR with the Corbett Rotor Gene 6000 system as described previously,<sup>12,13</sup> except that the Rotor-gene SYBR green PCR Kit (Qiagen) was used. A housekeeping analysis using

three genes was carried out using the Normfinder algorithm.<sup>22</sup> 16S rRNA<sub>Af</sub> was selected as a reference gene since its expression was found to be the most stable under our experimental conditions.

### 2.9. Functional Assays of *A. ferrooxidans* Gene AFE-1943 (*DsbG-L*) Expressed in *E. coli*

Since there is currently no efficient and reproducible methodology for the generation of knockouts in *A. ferrooxidans*, the functionality of *DsbG-L* from *A. ferrooxidans* was tested by using heterologous expression in *E. coli*. For this, after PCR amplifying AFE-1943, the resulting DNA fragment was purified and cloned

**Table 1. Up-Regulation of Proteins in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 Grown in Ferrous Iron and in the Presence of 40 mM CuSO<sub>4</sub>**

accession number	AFE	function/similarity	score	coverage (%)	peptide number	fold change (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Metabolism</b>						
<b>Inorganic ion transport and metabolism</b>						
B7JBW5	1862	Heavy metal-binding protein, putative	353.87	78.38	11	14.78
B7JC44	1948	Heavy metal efflux transporter, MFP subunit, putative ( <i>CusB<sub>Af</sub></i> )	239.96	23.23	16	14.68
B7JC45	1949	Outer membrane heavy metal efflux protein, putative ( <i>CusC<sub>Af</sub></i> )	188.64	16.16	13	11.41
B7JC43	1947	Heavy metal efflux pump, CzcA family ( <i>CusA<sub>Af</sub></i> )	114.37	10.23	12	6.86
B7J3E4	43	Periplasmic solute-binding protein, putative	363.63	31.25	24	5.54
B7J5B8	602	Cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	43.78	9.18	2	4.97
B7JAJ7	3093	Cation channel protein, putative	95.58	8.81	4	4.39
<b>Amino acid transport and metabolism</b>						
B7J7F7	981	Glycine dehydrogenase, decarboxylating ( <i>GcvP</i> )	45.53	2.68	1	8.86
B7JAM5	3121	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component ( <i>CysJ</i> )	815.50	37.07	36	6.99
B7JA16	3043	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase ( <i>HisB</i> )	70.64	10.55	3	6.15
B7JAH3	3064	Glutamate-cysteine ligase	115.32	10.32	8	5.83
B7JA14	3041	Histidinol dehydrogenase ( <i>HisD</i> )	170.77	16.86	9	5.56
B7JA17	3044	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit ( <i>HisH</i> )	59.14	27.35	5	4.84
B7JAM9	3125	Sulfate adenyltransferase, large subunit ( <i>CysN</i> )	560.76	30.88	26	4.80
B7JAM8	3124	Sulfate adenyltransferase, small subunit ( <i>CysD-2</i> )	189.69	21.79	13	4.68
B7J9U4	2971	Sulfate adenylate transferase, large subunit/adenylylsulfate kinase ( <i>CysNC</i> )	72.40	3.47	2	4.60
B7JAM6	3122	Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein beta-component ( <i>CysI</i> )	453.95	22.02	23	4.56
B7JAM7	3123	Adenylylsulfate reductase, thioredoxin dependent	72.73	18.78	6	4.18
B7JA15	3042	Histidinol-phosphate aminotransferase ( <i>HisC-1</i> )	122.85	7.52	3	4.04
B7JA13	3040	ATP phosphoribosyltransferase ( <i>HisG</i> )	65.42	17.67	7	4.04
B7JA19	3046	Imidazole glycerol phosphate synthase subunit ( <i>HisF</i> ) 1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)methylideneamino] imidazole-4-carboxamide isomerase ( <i>HisA</i> )	423.10	35.97	13	3.96
B7JA18	3045		200.29	22.31	7	3.96
<b>Carbohydrate transport and metabolism</b>						
B7J693	2324	Phosphoglucomutase, putative	162.61	12.71	10	7.91
B7JA25	3052	Ribulose biphosphate carboxylase, small subunit ( <i>CbbS-1</i> )	255.94	44.07	10	7.24
B7JA24	3051	Ribulose biphosphate carboxylase large chain ( <i>CbbL-1</i> )	523.76	39.11	37	6.94
B7J9Z1	3018	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase ( <i>PtsI</i> )	105.99	9.30	7	5.77
B7J9Z6	3023	Phosphoenolpyruvate-dependent sugar PTS system, EIIA component	192.66	37.84	13	4.58
B7JBW0	1857	Glucose 1-dehydrogenase, putative	188.51	15.33	6	4.49
<b>Nucleotide transport and metabolism</b>						
B7JAG8	3059	Aspartate carbamoyltransferase ( <i>PyrB</i> )	104.61	11.62	4	6.39
B7JAG9	3060	<i>PyrR</i> bifunctional protein	49.15	28.57	4	4.40
<b>Energy production and conversion</b>						
B7J6F2	2388	2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase ( <i>UbiH-2</i> )	53.51	6.36	2	15.92
B7J7D1	955	Cytochrome <i>d</i> ubiquinol oxidase, subunit I ( <i>CydA</i> )	136.53	6.83	9	11.01
B7J7D0	954	Cytochrome <i>d</i> ubiquinol oxidase, subunit II ( <i>CydB</i> )	74.49	7.16	8	6.44
B7JAH4	3065	Citrate synthase II ( <i>CitZ</i> )	80.53	15.80	11	5.77
B7JA18	3079	Nitroreductase family protein	101.32	31.66	8	5.62
B7JBR9	1813	Dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit, putative	134.03	14.97	8	4.62
B7J8A9	2677	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase domain protein	80.05	10.58	2	4.48
B7JAH7	3068	Pyruvate dehydrogenase complex, E2 and E3 components	836.43	21.46	32	4.17
B7JBR4	1808	Phosphate acetyl/butyryl transferase	57.83	9.12	4	4.10
B7JBR7	1811	2-oxo acid dehydrogenase, acyltransferase, putative	103.86	13.27	8	3.86
<b>Lipid transport and metabolism</b>						
B7J498	2017	<i>PspA/IM30</i> family	361.96	49.59	32	6.51
<b>Coenzyme transport and metabolism</b>						
B7J5J4	2206	Nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase	43.74	9.09	3	4.14
B7JAC2	1545	Molybdenum-pterin binding protein	335.48	42.65	32	4.07
<b>Cellular Processes and Signaling</b>						
<b>Post-translational modification, protein turnover, and chaperones</b>						
B7JC40	1943	DsbG domain protein ( <i>DsbG-L</i> )	45.66	10.67	7	15.54
B7JAL7	3113	Cytochrome <i>c</i> -type biogenesis protein ( <i>ResC</i> )	87.82	2.55	2	10.11
B7JA11	3038	Glutaredoxin	224.32	40	7	5.84
B7JAL6	3112	Cytochrome <i>c</i> -type biogenesis protein ( <i>ResB</i> )	428.45	21.50	19	4.86
B7J3S3	177	Glutathione <i>S</i> -transferase family protein	73.28	11	2	4.71



Table 1. continued

accession number	AFE	function/similarity	score	coverage (%)	peptide number	fold change (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Post-translational modification, protein turnover, and chaperones</b>						
B7J4U6	2086	Heat shock protein, Hsp20 family	345.71	59.31	23	3.90
B7JAH2	3063	Glutathione synthetase	60.93	8.65	3	3.88
B7J927	2834	SPFH/Band 7 domain protein	49.64	13.14	5	3.84
<b>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>						
B7J3 V6	210	UDP-N-acetylmuramoyl-trip eptide-D-alanyl-D-alanine ligase (MurF)	53.47	6.22	2	27.81
B7JA12	3039	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxy vinyltransferase (MurA)	111.45	10.40	5	5.13
B7J7B8	941	Murein transglycosylase, putative	49.34	3.13	2	3.91
<b>Cell motility and secretion</b>						
B7JA21	3048	Sec-independent protein translocase protein (TatA-1)	218.14	41.66	6	15.00
B7J3D3	32	Inner membrane protein (OxaA)	50.78	6.62	4	12.05
B7J8E2	2710	Pilin, putative	63.91	10.13	1	6.52
<b>Signal transduction mechanisms</b>						
B7J9Z5	3022	Hpr(Ser) kinase/phosphatase (HprK)	68.64	16.45	6	5.05
<b>Information Storage and Processing</b>						
<b>Replication, recombination and repair</b>						
B7JAJ8	3094	DNA polymerase I	152.31	7.89	8	4.91
<b>Translation, ribosomal structure and biogenesis</b>						
B7J9Z7	3024	Ribosomal subunit interface protein (YfiA)	77.87	28.32	4	4.64
<b>Poorly Characterized</b>						
<b>General function prediction only</b>						
B7J4E4	401	Roadblock/LC7 domain protein	40.85	10.29	1	12.04
B7J7R8	3118	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	1369.68	65.69	111	7.81
B7J6R1	846	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	74.22	12.89	10	5.36
B7JAK7	3103	Phosphoribosyl transferase domain protein	53.69	10.81	2	4.83
<b>Function unknown</b>						
B7J3N6	139	Putative uncharacterized protein	57.69	4.33	1	16.13
B7J3E3	42	Putative uncharacterized protein	83.41	8.89	5	11.24
B7JAM4	3120	Putative uncharacterized protein	40.54	12.50	2	8.55
B7J4M9	2018	Putative uncharacterized protein	188.46	12.41	9	6.98
B7J8K8	2783	Putative uncharacterized protein	164.68	31.37	8	6.83
B7J4N0	2019	Putative uncharacterized protein	68.65	10.76	6	6.42
B7J446	302	Putative uncharacterized protein	88.28	37.63	5	5.32
B7JAN1	3127	Putative uncharacterized protein	124.47	26.49	1	4.86
B7J4 × 2	2114	Putative uncharacterized protein	76.71	10.05	5	4.21
B7JAL8	3114	Putative uncharacterized protein	52.30	7.44	1	4.21
B7JBF1	3273	Putative uncharacterized protein	103.02	31.78	7	3.86

in the expression vector pBAD-TOPO to generate pBAD-TOPO-*DsbG-L*. *E. coli* top10 and the copper sensitive K-12 mutant  $\Delta copA/\Delta cusCFBA/\Delta cueO$  were transformed with vector pBAD-TOPO-*DsbG-L*. The heterologous expression of *DsbG-L* was induced or repressed by growing the cells in the presence of L-arabinose or glucose, respectively. The capacity of *DsbG-L* to confer copper resistance to the already mentioned transformants was determined by measuring the inhibition halos in solid medium in the presence of copper-containing discs and by their growth inhibition in medium Luria–Bertani in the presence of 0.6 mM CuSO<sub>4</sub>.<sup>12</sup>

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

To find the most appropriate conditions to detect proteins responding to copper by means of quantitative proteomics, a preliminary analysis of some envelope proteins from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 was done by using 2D-PAGE as shown in Figure 1. Cells were grown in a range of copper between 0 and 50 mM and higher levels of protein *DsbG-L* (AFE\_1943) and RND proteins (AFE\_1880 and AFE\_1949)<sup>12</sup> was clearly seen at 20 and 50 mM Cu. These proteins may form

part of putative RND transport systems and are potentially important *A. ferrooxidans* copper resistance determinants.

On the other hand, at these same Cu concentrations, the major outer membrane protein from *A. ferrooxidans* (Omp40) (AFE\_2741)<sup>23,24</sup> began to decrease its levels. Therefore, a Cu concentration of 40 mM was chosen to grow the cells for the ICPL proteomic analysis. Under these conditions, 594 proteins were identified of which 120 changed their levels compared to the control cells grown in the absence of copper. In the group of proteins changing, 76 were up-regulated and 44 down-regulated.

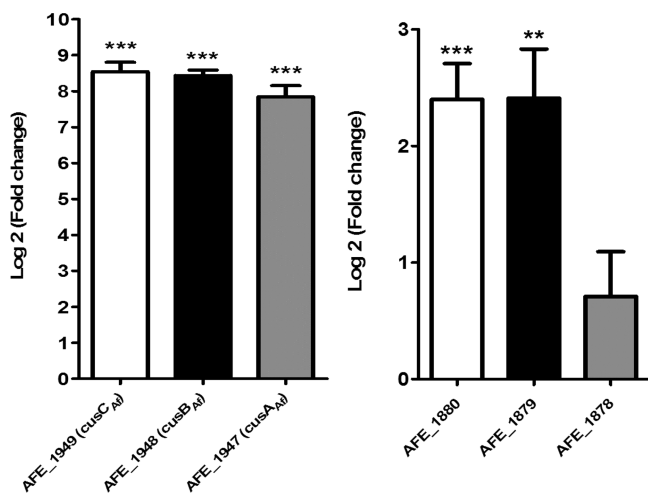
Proteins with different levels were grouped according to functional categories as shown in Figure 2. Metabolism was the functional category with the greatest number of changes (56%). Within the Metabolism category, almost 23% of the proteins belonged to amino acid transport and metabolism and 13% were related to inorganic ion transport and metabolism. Cellular Processes and Signaling was the second functional category most affected by the presence of copper (19%). In this category, 57% of the changes corresponded to post-translational modification, protein turnover, and chaperones. Finally, about 19% of the proteins comprised poorly characterized or with no homologues in databases, being proteins with unknown

functions that most likely are unique to *A. ferrooxidans*. Next, we will describe some of the possible identities and putative functions of several differentially synthesized proteins from *A. ferrooxidans* grouped by their functional categories.

### 3.1. Metabolism

**3.1.1. Inorganic Ion Transport and Metabolism.** A highly increased level of Cus<sub>Af</sub>, an RND type efflux system from *A. ferrooxidans*<sup>12</sup> was detected in cells grown in ferrous iron in the presence of copper (Table 1). These tripartite efflux systems are formed by a central RND protein (CusA<sub>Af</sub>) (AFE\_1947) working as a proton-substrate antiporter located in the inner membrane, a periplasmic-membrane fusion protein (CusB<sub>Af</sub>) (AFE\_1948) and an external membrane factor (CusC<sub>Af</sub>).<sup>25,26</sup> This Cus system would detoxify cells by transporting copper from the periplasm and/or cytoplasm through the outer membrane to the extracellular space. The results presented here together with our previous reports<sup>10,12</sup> strongly suggest that the function of these RND transporters would be especially important for copper resistance in *A. ferrooxidans*.

Previous bioinformatic analysis identified the protein coded by AFE\_1949 as a possible component of an RND efflux system involved in metal resistance and similar to the Cus system of *E. coli*. This ORF would form part of a possible transcriptional unit together with ORFs AFE\_1948 and AFE\_1947.<sup>12</sup> These three ORFs were highly expressed at the transcriptional level in cells subjected to copper as seen in Figure 3, left panel.

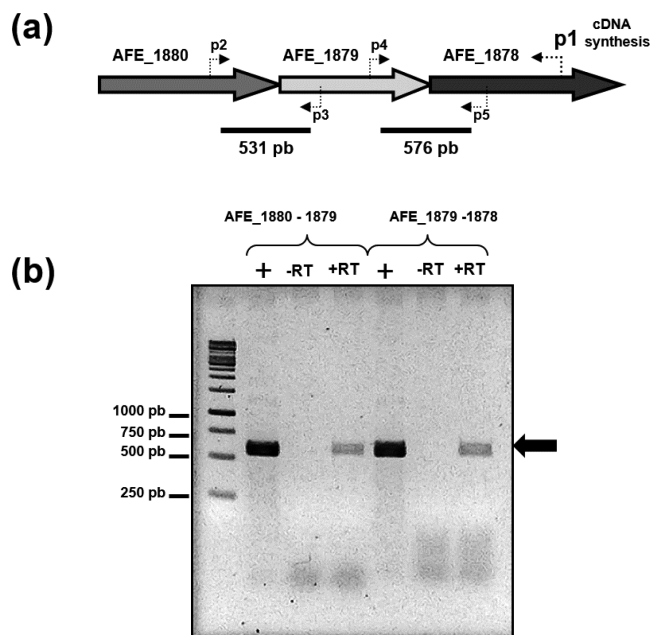


**Figure 3.** Relative expression of genes putatively encoding to RND type systems. Cells were grown in ferrous iron and in the presence of 50 mM CuSO<sub>4</sub>. Transcriptional level changes refer to the control condition in the absence of the metal. Data were normalized by using the expression values for the 16S rRNA<sub>Af</sub> gene. Asterisks indicate \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  and \*\*\* $p < 0.0001$  when compared to the control value in the absence of copper. The error bars indicate the standard deviations based on three to five different experimental values.

In addition, a further membrane protein (AFE\_1880) was up-regulated as detected by 2D-PAGE (Figure 1) as well as transcriptionally overexpressed in the presence of copper (Figure 3). The genomic context of this ORF showed as neighbors an ORF (AFE\_1879) coding for a membrane fusion protein (MFP) and AFE\_1878 coding for a putative membrane transport protein that could form an RND transporter system with an unknown substrate. The genetic context of these genes is similar to that of the Cus system from *E. coli*. The three genes forming this putative RND system were overexpressed at the transcrip-

tional level (Figure 3, right panel) but were not seen up-regulated by the quantitative proteomic analysis.

The RND transport systems are traditionally formed by three different structural proteins coded in an operon.<sup>27</sup> By using RT-PCR it was demonstrated that the putative RND system genes were cotranscribed, strongly suggesting they form a transcriptional unit or possibly an operon (Figure 4). This unit may therefore code for a novel efflux RND system with a possible function in copper detoxification in *A. ferrooxidans*.



**Figure 4.** Putative new *A. ferrooxidans* RND type genes are cotranscribed. (a) The relative positions of genes AFE\_1880, AFE\_1879 and AFE\_1878 (arrows in gray), locations for the primers used (dotted arrows) and the intergenic products and sizes expected (black horizontal bars) are indicated. *A. ferrooxidans* total RNA was extracted at the late exponential phase from a culture adapted to grow in 50 mM Cu. cDNA was synthesized with a reverse primer (p1) hybridizing toward the 3' end of AFE\_1878. PCR amplifications of the intergenic regions between AFE\_1880–1879 and AFE\_1879–1878 were carried out with the cDNA and p2–p3 and p4–p5 pairs of primers, respectively. (b) The results shown were obtained after 35 PCR cycles. PCR reactions were done using cDNA templates synthesized in the presence (+RT) or absence (-RT) of reverse transcriptase to detect the possible presence of genomic DNA contamination. The amplified DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis and are indicated by the black arrow.

In the *E. coli* RND Cus system, the inner membrane protein CusA would be the responsible of substrate specificity by binding copper in a metal-binding site formed by three or four essential methionine residues.<sup>28</sup> However, an alignment of the amino acid sequences between CusA from *E. coli* and the putative RND proteins from *A. ferrooxidans* (AFE\_1947 and AFE\_1878) (Table 1) indicated that only AFE\_1947 (with 48% sequence identity to CusA), contains the metal-binding residues (not shown). On the other hand, AFE\_1878 (with 21.8% sequence identity to CusA) had only one of the possible metal-binding methionines. Therefore, at present we can only speculate that the putative RND system from *A. ferrooxidans* is able to bind and transport copper either directly or indirectly. Obviously, further experiments are required to determine the function for this possible transporter.

**Table 2. Down-Regulation of Proteins in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 Grown in Ferrous Iron and in the Presence of 40 mM CuSO<sub>4</sub>**

accession number	AFE	function/similarity	score	coverage (%)	peptide number	fold change (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Metabolism</b>						
<b>Inorganic ion transport and metabolism</b>						
B7J8H1	2741	Major outer membrane protein 40 (Omp40)	71.95	4.46	4	0.14
B7J4Q1	2040	TonB -dependent receptor	72.83	2.41	2	0.43
<b>Amino acid transport and metabolism</b>						
B7J4S9	2069	Tryptophan synthase beta chain	42.89	3.01	2	0.94
<b>Carbohydrate transport and metabolism</b>						
B7JSW5	669	Inositol monophosphate family protein	39.64	16.10	3	0.44
B7JB29	1690	Ribulose biphosphate carboxylase, small subunit (CbbS-2)	212.65	59.10	9	0.50
B7JB06	1667	Transketolase pyridine binding domain protein	339.27	25.62	33	0.50
B7JB15	1676	Fructose-biphosphate aldolase class II family protein	211.49	21.12	10	0.55
B7JB30	1691	Ribulose biphosphate carboxylase large chain (CbbL-2)	730.51	31.50	45	0.58
B7J9Z3	3020	PTS system IIA component, putative	48.53	5.80	2	0.88
<b>Nucleotide transport and metabolism</b>						
B7J5P8	2261	Phosphoribosylamine-glycine hgase (PurD)	38.44	2.14	1	0.57
<b>Energy production and conversion</b>						
B7JB01	1662	NADH dehydrogenase, putative	96.42	4.57	2	0.32
B7JB85	3204	ATP synthase gamma chain (AtpG)	44.96	3.47	1	0.33
B7J6S4	861	Flavoprotein with domin globain	75.14	21.57	6	0.40
B7J AQ6	3152	Cytochrome c552 (Cycl)	108.21	22.17	7	0.56
B7J7L8	2551	Iron-sulfur cluster-binding protein	125.10	12.97	9	0.65
B7JAL5	3111	Ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome c1 subunit (PetC-1)	123.97	14.46	4	0.81
B7J AQ7	3153	Cytochrome c (Cyc2)	146.01	7.42	11	0.85
B7J7L7	2550	Succinate dehydrogenase/fumarate reductase, C subunit (SdhC)	89.56	6.27	4	0.91
B7J7M0	2553	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	391.76	24.50	16	0.92
B7J4H0	427	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha (SucD)	59.35	12.41	3	0.93
<b>Lipid transport and metabolism</b>						
B7J4G3	420	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (FabL)	340.52	32.29	10	0.93
<b>Coenzyme transport and metabolism</b>						
B7JB14	1675	Dethiobiotin synthetase (BioD-1)	72.52	3.98	1	0.20
B7J7N6	2569	Octanoyltransferase	57.81	11.79	2	0.94
<b>Cellular Processes and Signaling</b>						
<b>Post-translational modification, protein turnover, and chaperones</b>						
B7J7 × 8	2664	Chaperone protein DnaJ	50.23	4.80	2	0.23
B7JSZ2	696	S-(Hydroxymethyl)glutathione synthase (GfA)	124.38	16.49	4	0.63
B7JSN4	2246	DsbG domain protein	38.44	9.95	2	0.85
B7J789	909	Trigger factor (TiG)	220.62	14.98	6	0.87
<b>Cell motility and secretion</b>						
B7J4F9	416	Pilin, putative	50.43	10.67	3	0.34
<b>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</b>						
B7J8B7	2685	OmpA family protein	43.09	7.65	2	0.20
<b>Signal transduction mechanisms</b>						
B7J4Z0	2133	Universal stress family protein	77.39	9.38	1	0.76
<b>Information Storage and Processing</b>						
<b>Translation, ribosomal structure and biogenesis</b>						
B7J7G7	991	tRNA (Guanosine-2'-O-)-methyltransferase, putative	40.69	3.53	1	0.52
B7J3F7	56	Aspartyl-tRNA synthetase (AspS)	61.18	5.03	4	0.95
<b>Transcription</b>						
B7JB07	1668	Transcriptional regulator, IclR family	46.96	4.63	1	0.67
B7JB92	3211	ParB family protein	61.65	7.48	2	0.79
B7JSQ8	2271	Transcriptional regulator, putative	60.26	8.82	2	0.92
<b>Poorly Characterized</b>						
<b>Function unknown</b>						
B7JC77	1982	Putative uncharacterized protein	115.60	18.24	3	0.31
B7JB19	1680	Putative uncharacterized protein	49.15	5.21	1	0.35
B7JB00	1661	Putative uncharacterized protein	302.50	14.06	24	0.37
B7JB09	1660	Putative uncharacterized protein	200.12	18.42	9	0.48

Table 2. continued

accession number	AFE	function/similarity	score	coverage (%)	peptide number	fold change (Cu 40 mM/0 mM)
<b>Function unknown</b>						
B7JAZ9	1670	Putative uncharacterized protein	52.24	8.56	3	0.48
B7JB05	1666	Putative uncharacterized protein	119.48	15.28	8	0.65
B7JAG1	1585	Putative uncharacterized protein	176.36	41.88	14	0.80
B7JAN9	3135	Putative uncharacterized protein	48.14	17.91	4	0.84
B7J8C6	2694	Putative uncharacterized protein	49.75	3.77	1	0.87

The presence of copper in the growth medium of *A. ferrooxidans* greatly stimulated the up-regulation of a putative cation channel protein (AFE\_3093) and a putative soluble heavy metal-binding protein (AFE\_1862) with a possible heavy metal domain containing a putative CGHC metal-binding site (Table 1). This metal-binding site is similar to that found in CopZ, a copper metallochaperone that transfers the metal to ATPase transmembrane transporters.<sup>29</sup> The function, cellular location and metal specificity of these proteins are currently unknown. Most likely they are involved in binding and transporting cations.

On the other hand, Omp40 (AFE\_2741), which is the most abundant porin-like outer membrane protein from *A. ferrooxidans*,<sup>30</sup> was greatly down-regulated when cells were grown in ferrous iron in the presence of copper (Figure 1, Table 2). The positively charged nature of the internal loops of Omp-40 porin has been proposed to be part of a passive mechanism to regulate proton entrance through the outer membrane to avoid excess acid in the *A. ferrooxidans* cytoplasm.<sup>23</sup> The same phenomenon could prevent excess entrance of other cations such as copper. A similar result has been observed in *Pseudomonas aeruginosa*, in which a reduced expression of eight different porins was seen when cells were exposed to copper.<sup>31</sup> Being a porin, Omp40 would play an important role in controlling ion diffusion through the outer membrane.<sup>23,30</sup> Therefore, the lower levels of synthesis of Omp-40 strongly suggests a change in the permeability of the outer membrane to decrease copper ions entrance to the cell and thus to prevent toxicity of the heavy metal.

A similar situation is the down-regulation of a putative OmpA family protein (AFE\_2685) in the presence of copper (Table 2). OmpA not only provides structural stability to the cell, but it also generates a diffusion channel that allows a slow penetration of small solutes.<sup>32</sup> Lower levels of OmpA might also reduce copper ions entrance to the cell. This passive mechanism together with the efflux of copper carried out by the RND systems may be key responses to resist the toxic metal. It will be of great interest to establish if this reduced level of porins to avoid metal toxicity is a general phenomenon in bacteria.

Table 2 also shows down-regulation of a TonB-dependent receptor (TBDR; AFE\_2040) in the presence of copper. These receptors are outer membrane proteins that form channels permeable to large solutes such as vitamin B<sub>12</sub> and siderophores.<sup>33,34</sup> In *A. ferrooxidans*, several putative TBDR-like genes and some of the coding proteins have been described,<sup>35,36</sup> although their substrate specificities are unknown. Bioinformatic analysis suggested that this locus codes for the outer membrane receptor CirA involved in iron transport mediated by linear type catechol siderophores.<sup>37</sup> It is known that catechols can reduce Cu(II) to Cu(I) generating a stronger stress to cells exposed to the metal since the reduced form of copper is more toxic than the oxidized one.<sup>38,39</sup> Perhaps, AFE\_2040 corresponds to a TBDR that is regulated by the presence of copper in *A. ferrooxidans*. In this regard, outer membrane proteins with structural similarities

to TBDRs that are strongly repressed in the presence of exogenous copper and derepressed in copper-limiting conditions have been described in *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas putida* and *P. aeruginosa* (Schauer et al.<sup>34</sup> and references therein). It is possible that the lower synthesis level of the protein coded by AFE\_2040 could also be a defense mechanism against copper toxicity since it might also reduce the income of the metal to the cell via catechols.

Taken together, these results suggest the existence of an interesting and efficient metal resistance mechanism in *A. ferrooxidans*: to avoid the entrance of excess copper to the cell by decreasing transport and diffusion of the toxic metal. At the same time, the excess copper would be eliminated via RND type efflux pumps.

**3.1.2. Energy Production and Conversion.** *A. ferrooxidans* *petI* and *rus* operons contain genes encoding for iron oxidation proteins.<sup>35</sup> The *petI* transcriptional unit encodes the three subunits of the *bc*<sub>1</sub> complex (PetCAB), a predicted short chain dehydrogenase (Sdr) of unknown function and a cytochrome *c*<sub>4</sub> that has been suggested to receive electrons from rusticyanin and then pass them to the *bc*<sub>1</sub> complex (Valdés et al.<sup>35</sup> and references therein). The *rus* operon encodes two *c*-type cytochromes (Cyc1 and Cyc2), components of the *aa*<sub>3</sub>-type cytochrome oxidase (CoxBACD) and rusticyanin.<sup>40</sup> Cyc2 has been shown to accept electrons directly from Fe(II) and this may be the first step in Fe(II) oxidation (Valdés et al.<sup>35</sup> and references therein).

Proteins ResC and ResB are involved in the maturation of *bc*<sub>1</sub> complex I (*petI* operon) and showed increased levels in the presence of copper (Table 1). However, reduced amounts of PetC-1 were detected (Table 2). Surprisingly, reduced expression of Cyc2 and Cyc1 was found in cells grown in the presence of copper. An increased time of growth has been observed for *A. ferrooxidans* cells in the presence of copper (data not shown), suggesting that respiration is affected and the oxidation of ferrous iron occurs more slowly in the presence of copper. This may be crucial and could have an impact on bioleaching processes.

Increased amounts of proteins such as CydA and CydB were found in the presence of copper (Table 1). This finding is interesting, since these proteins are components of the cytochrome *bd* terminal oxidase complex (with no heme-copper centers). This is the component of the aerobic respiratory chain in *E. coli* that predominates in cells grown at low aeration. In addition, these cytochrome *bd* oxidases have a higher affinity for oxygen than other cytochrome oxidases. Therefore, it is thought that they are used by microorganisms to continue aerobic respiration under conditions of low oxygen,<sup>41</sup> helping bacteria to survive periods of oxygen limitation. It is becoming increasingly apparent that expression of multiple cytochrome oxidases confers advantages to bacteria in surviving specific growth and stress conditions.<sup>42,43</sup> Thus, *A. ferrooxidans* with a reduced

respiration rate due to copper stress might also use an alternative terminal oxidase besides the standard  $aa_3$ -type oxidase.

From the results shown in Table 1, it is clear that *A. ferrooxidans* subjected to copper up-regulates several energy-generating metabolic pathways to handle the cellular stress caused by the toxic metal. *A. ferrooxidans* contains an incomplete tricarboxylic acid (TCA) cycle lacking  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex but in which pyruvate can be used as a source to reoxidize NADH and for the formation of citrate and  $\alpha$ -ketoglutarate.<sup>44</sup> In this regard, several proteins in the “Energy production and conversion” functional category such as citrate synthase II (CitZ) (AFE\_3065), dehydrogenase complex E1 component (AFE\_1813) and pyruvate dehydrogenase complex (AFE\_3068), which are part of or feed the TCA cycle showed increased levels in *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper. Similar findings have been reported in *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 subjected to As (III)<sup>5</sup> and in *Exiguobacterium* sp. S17 under arsenic stress.<sup>45</sup>

A putative 2-octaprenyl-6-methoxyphenol hydroxylase (UbiH-2) (AFE\_2388) showed a very high up-regulation in *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper (Table 1). This enzyme is involved in the biosynthesis of ubiquinone, which is an important component of the respiratory chains in *E. coli* and other bacteria. In addition, the lipid-soluble ubiquinone is known to limit oxidative stress caused by superoxide and peroxide in the *E. coli* cytoplasmic membrane.<sup>46</sup> Since copper generates membrane damaging reactive oxygen species, an increase in the levels of a protein involved in ubiquinone formation in the presence of copper is not unexpected and may contribute to the defense against the toxic metal in *A. ferrooxidans*. The regulation of UbiH-2 has also been reported in *A. ferrooxidans* subjected to a cellular stress such as oxygen limitation.<sup>47</sup>

**3.1.3. Carbohydrate and Amino Acid Transport and Metabolism.** Related to carbohydrate transport and metabolism category, a putative phosphoglucomutase protein (AFE\_2324; Table 1) showed elevated levels in cells grown in the presence of copper. This enzyme generates glucose-6P from glucose-1P, thus producing energy from the former phosphorylated sugar or it could go to the pentose phosphate pathway to generate ribose and reducing power in the form of NADPH.

*A. ferrooxidans* 23270 fixes CO<sub>2</sub> by means of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO)<sup>48</sup> in the Calvin–Benson–Bassham (cbb) reductive pentose phosphate cycle and associated carboxysome formation components. RuBisCO is a key enzyme for a chemolithoautotroph such as *A. ferrooxidans*. The microorganism has two *cbb* operons containing genes coding for RuBisCO.<sup>49</sup> This enzyme is formed by small (CbbS) and large (CbbL) subunits in all species that require to fix CO<sub>2</sub> for their metabolism. The results showed that one of the operons (Cbb1) (AFE\_3052)/(AFE\_3051) was up-regulated in the presence of copper (Table 1) whereas the other (Cbb2) (AFE\_1691)/(AFE\_1690) was down-regulated when *A. ferrooxidans* was grown in the presence of the metal (Table 2). The identity between the two kinds of RuBisCO small subunits was 60% and that concerning both large subunits was 84%, suggesting that they do not correspond to duplicate genes.

In this respect, comparing the differential synthesis levels of proteins from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 grown in ferrous iron versus elemental sulfur, it was found that CbbS-1/CbbL-1 was strongly down-regulated in cells grown in elemental sulfur. On the other hand, CbbS-2/CbbL-2 was not detected among the proteins changing their levels.<sup>50</sup>

There is no current information regarding the effect of copper on the expression of RuBisCO in autotrophic bacteria. However, a down-regulation of RuBisCO was reported in leaves from *Oryza sativa* subjected to copper.<sup>51</sup> On the other hand, when analyzing copper-binding proteins in the roots from *Arabidopsis thaliana* one of the proteins found was the small subunit from RuBisCO.<sup>52</sup> This protein shows 39% and 31% identity to CbbS-1 and CbbS-2 from *A. ferrooxidans*, respectively.

Bearing in mind these previous findings, it is plausible that under the excessive ROS production due to the presence of copper, the toxic metal could repress Cbb2 operon. On the other hand, the other *A. ferrooxidans* Cbb1 operon codifies for a protein with high identity to the small RuBisCO subunit from *A. thaliana*, which as mentioned, is a copper-binding protein.<sup>52</sup> The up-regulation of Cbb1 when *A. ferrooxidans* was exposed to copper suggests that this operon not only could participate in carbon fixation but could contribute also to the metal resistance. However, the differential expression could be due to oxidative stress caused by copper or by ferrous iron<sup>49</sup> or by growth under anaerobic conditions.<sup>53</sup>

Surprisingly, seven of the eight putative proteins coded by the histidine operon (HisF, HisA, HisH, HisB, HisC-1, HisD, and HisG) (AFE\_3046 to AFE\_3040) were highly up-regulated in *A. ferrooxidans* cells grown in the presence of copper (Table 1). The eight proteins of the His operon participate in 10 reactions for the biosynthesis of His,<sup>54</sup> suggesting that the cells require higher amounts of His to respond to the presence of copper. In this connection, it is known that His (–) strains of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in the synthesis of His are sensitive to copper, cobalt and nickel. This sensitivity was reverted when the amino acid was added to the culture medium, suggesting that His biosynthesis would confer resistance to Cu, Co and Ni. These studies suggested that intracellular histidine would directly alleviate the toxicity of these heavy metals.<sup>55</sup> Similar results have been described in plants where an up-regulation of the histidine biosynthesis pathway would contribute to nickel resistance possibly by a direct interaction between the metal and the amino acid.<sup>56</sup>

Considering these results, it is tempting to speculate that an increased synthesis of His in *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper could contribute to copper resistance of the microorganism perhaps by a direct interaction between the free amino acid and the metal, which obviously remains to be demonstrated.

When *A. ferrooxidans* was grown in the presence of copper, an up-regulation of several proteins involved in cysteine biosynthesis, CysD-2 (AFE\_3124), CysJ (AFE\_3121), CysI (AFE\_3122), CysN (AFE\_3125), and Cys NC (AFE\_2971), was also seen (Table 1). In this connection, *Staphylococcus aureus* has been reported to increase the synthesis of cysteine and glutathione S-transferase in the presence of cadmium.<sup>57</sup> In the case of *E. coli*, recent experimental evidence indicated that most of the elements of the cysteine biosynthetic pathway are required to manage tellurite-induced stress in this bacterium and all the Cys regulon genes studied were up-regulated in the presence of this toxic compound.<sup>58</sup> These authors also suggested that this response could be due in part to the depletion of cellular thiols or sulfur-containing molecules such as glutathione.

As in the case of His, Cys also shows a strong affinity for divalent metals. Therefore, both amino acids could eventually protect the cell from the heavy metals in a similar fashion. Obviously, these speculations would have to be proven by

determining the levels of free His and Cys in the intracellular space of *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper.

Instead, increased biosynthesis of His and Cys in the presence of copper could be due to a higher demand for these amino acids. This situation may arise from the need to express higher levels of proteins involved in copper detoxification, many of them containing these amino acids in their metal binding sites.

### 3.2. Cellular Process and Signaling

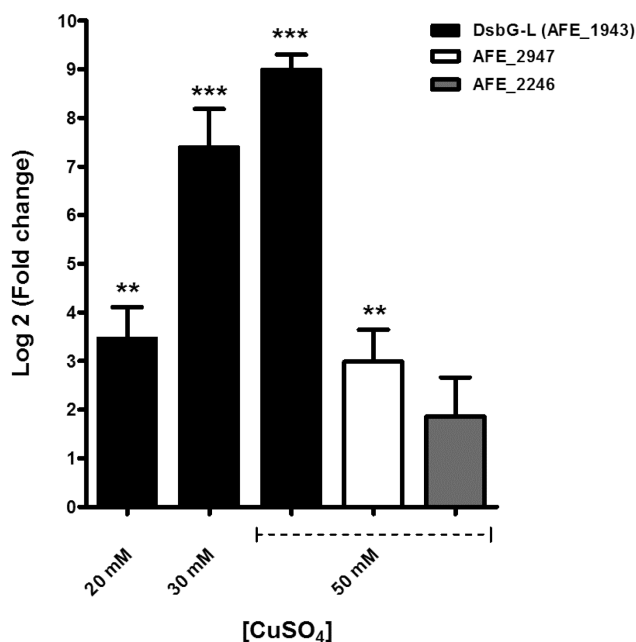
**3.2.1. Post-Translational Modification, Protein Turnover, and Chaperones.** Within this functional category, a glutaredoxin (AFE\_3038) increased its levels of synthesis when *A. ferrooxidans* was grown in the presence of copper (Table 1). Glutaredoxins are enzymes involved in redox reactions and whose main role is to protect cells against oxidative stress. For this reason, they maintain the adequate redox state of sulfhydryl groups of cellular proteins.<sup>59</sup> Being an oxidative agent, copper would generate disulfide bridges in proteins possessing functional sulfhydryl groups. The increased level of glutaredoxins would contribute to keep the thiol groups reduced in the proteins. The name glutaredoxin arises from the fact that these enzymes use glutathione as a cofactor. Glutathione is synthesized by two independent steps, the second one being catalyzed by the enzyme glutathion synthetase. This enzyme catalyzes the condensation of glycine to the C-terminal of gamma-glutamyl-cysteine.

Table 1 shows that glutathione synthetase (AFE\_3063) was up-regulated in *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper. This may be the result of a higher need of glutathione which will be used by glutaredoxins and glutathion S-transferase (AFE\_0177) (also up-regulated in the presence of copper in Table 1) in detoxification processes. In connection with this point, a putative glutamate-cysteine ligase (AFE\_3064) involved in glutathione formation was also up-regulated in the presence of the metal. These results are in agreement with previously determined mRNA levels for some of these enzymes in *A. ferrooxidans* subjected to copper<sup>10</sup> and with some of the predicted set of genes in the genome of this microorganism which are needed for nonenzymatic neutralization of reactive oxygen species.<sup>35,44</sup>

In addition, the up-regulation of AFE\_1943 annotated as a DsbG domain protein that could correspond to a disulfide bridge isomerase was also seen in *A. ferrooxidans* and it was named DsbG-L. AFE\_1943 showed up-regulation in the ICPL analysis (Table 1). Also, as seen in Figure 1, this protein was greatly synthesized when the microorganism was grown in the presence of copper. Furthermore, as determined by qRT-PCR, the transcriptional levels for the gene coding for DsbG-L was highly increased (Figure 5).

DsbG-L could be part of a family of thiol-disulfide oxidoreductases involved in the formation and rearrangement of disulfide bridges and in the correct folding of periplasmic proteins. Specifically, DsbG-L could be a disulfide bridge isomerase protein capable of reordering non-native disulfide bonds to generate the correct ones.<sup>60,61</sup>

As in the case of *E. coli* and other Gram-negative bacteria, *A. ferrooxidans* possesses genes coding for putative thiol-disulfide oxidoreductases which are homologues of DsbA, DsbB and DsbD. However, unlike *E. coli*, the acidophilic bacterium does not have in its genome a DNA sequence coding for the isomerase protein DsbC. On the contrary, *A. ferrooxidans* contains three genes coding for putative disulfide isomerases: AFE\_2947 for a DsbG, and genes AFE\_1943 and AFE\_2246 that would code for



**Figure 5.** Relative expression of AFE\_1943 (dsbG-L), AFE\_2947 and AFE\_2246 genes of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 grown in the presence of copper. Cells were grown in ferrous iron and in the presence of 20, 30, and 50 mM CuSO<sub>4</sub>. Transcriptional level changes refer to the control condition in the absence of the metal. Data were normalized by using the expression values for the 16 *s rRNA* gene. Asterisks indicate \*\* $p < 0.005$  and \*\*\* $p < 0.0001$  when compared to the control value in the absence of copper. The error bars indicate the standard deviations based on three to five different experimental values.

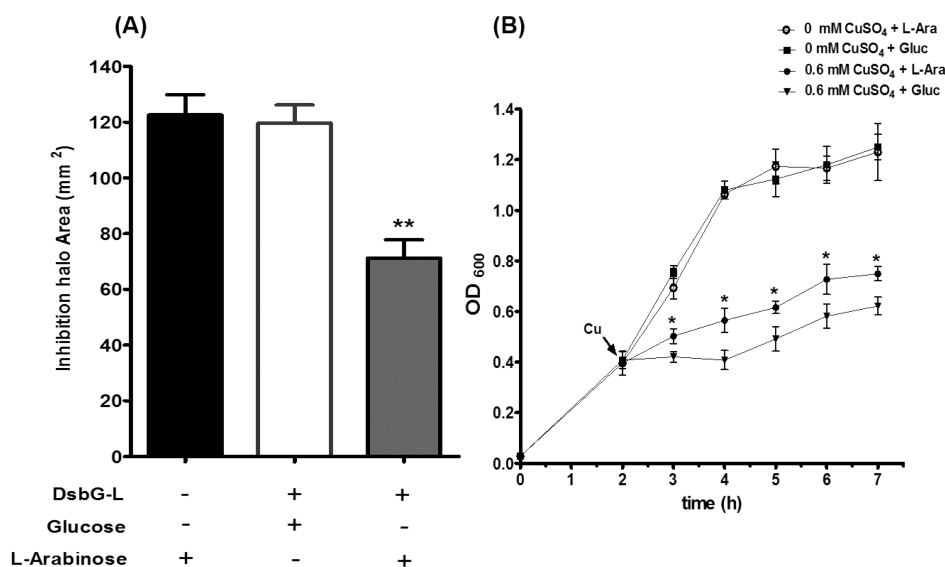
disulfide isomerase proteins containing a DsbG domain. This suggests that *A. ferrooxidans* could use extra copies of DsbG type proteins to compensate for the lack of DsbC.

Although *A. ferrooxidans* may therefore contain a complete functional Dsb system, a recent study of this putative system has been reported. It was demonstrated that the putative protein DsbG coded in AFE\_2947 showed disulfide bridge isomerase activity although its physiological role still remains unclear.<sup>61</sup> However, overexpression of the gene encoding a protein with a DsbG domain (AFE\_2947) seen in Figure 5 also suggests the possible involvement of this protein in repair purposes after metal stress.

Previous studies identified the putative proteins coded in AFE\_2947 and AFE\_2246 in the periplasm of *A. ferrooxidans* grown in thiosulfate.<sup>36</sup> These results suggested a possible physiological function for these periplasmic proteins. However, in this earlier high-throughput proteomic study, the protein coded by AFE\_1943 was not detected since cells were not subjected to copper during growth.

The up-regulation of redox proteins involved in periplasmic folding functions has been previously detected in *P. aeruginosa* adapted to grow at high copper concentrations (DsbD, DsbE and DsbG).<sup>31</sup> In addition, it was demonstrated that in *E. coli* a disulfide bridge isomerase member of the *dsb* system (DsbC) is an important copper resistance determinant for this microorganism.<sup>62</sup>

It has been reported that copper ions catalyze the formation of incorrect disulfide bridges in proteins. This generates inactive proteins that may eventually cause cell death.<sup>62</sup> In this regard, a disulfide isomerase such as DsbG-L may also be an important copper resistance determinant for *A. ferrooxidans* since its up-



**Figure 6.** DsbG-L from *A. ferrooxidans* confers higher copper resistance to *E. coli*. (A) *E. coli* top-10 transformed with plasmid pBAD-TOPO containing the heterologous *A. ferrooxidans* DsbG-L gene was grown in the presence of glucose (uninduced, white bar) or in the presence of arabinose (induced expression, gray bar). The control was the same bacterial strain transformed with the plasmid without the inserted DsbG-L gene (black bar). The areas of the inhibition halos were determined in each case. (B) Growth curves of *E. coli* strain K-12  $\Delta copA/\Delta cusCFBA/\Delta cueO$  transformed with pBAD-TOPO-*dsbG-L* grown in the presence or absence of 0.6 mM CuSO<sub>4</sub> and in the presence of glucose or L-arabinose as indicated. The arrow indicates the time where copper was added to the cultures. Asterisks indicate \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  compared to the control in the absence of copper. The error bars indicate the standard deviations based on three to five different experimental values.

regulation could help to restore native disulfide bridges allowing the survival of the acidophile under copper stress. The heterologous expression of DsbG-L in *E. coli* conferred increased copper resistance to this bacterium, as determined by the lower size copper inhibition halos and a partial growth recovery of the transformed strain after the addition of copper after 2 h of growth (Figure 6). A possible explanation for the rather limited effect of DsbG-L is that this periplasmic protein would normally function at pH around 2 in the *A. ferrooxidans* periplasm. When synthesized in *E. coli*, it would be confronted to pH 6–7, and therefore, it may not work more efficiently under those conditions.

**3.2.2. Cell Wall/Membrane/Envelope Biogenesis.** Bacteria possess a cell envelope to maintain cell shape and avoid cell lysis. This structure is rigid due to the presence of a peptidoglycan polymer formed by the two sugar derivatives *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid joined together by  $\beta$ 1–4 bonds to form a linear chain. In Gram-negative bacteria, this is a thin layer which is localized in the periplasm between the external- and inner-membranes.<sup>63</sup> Peptidoglycan biosynthesis involves several steps where Mur proteins participate.<sup>64</sup>

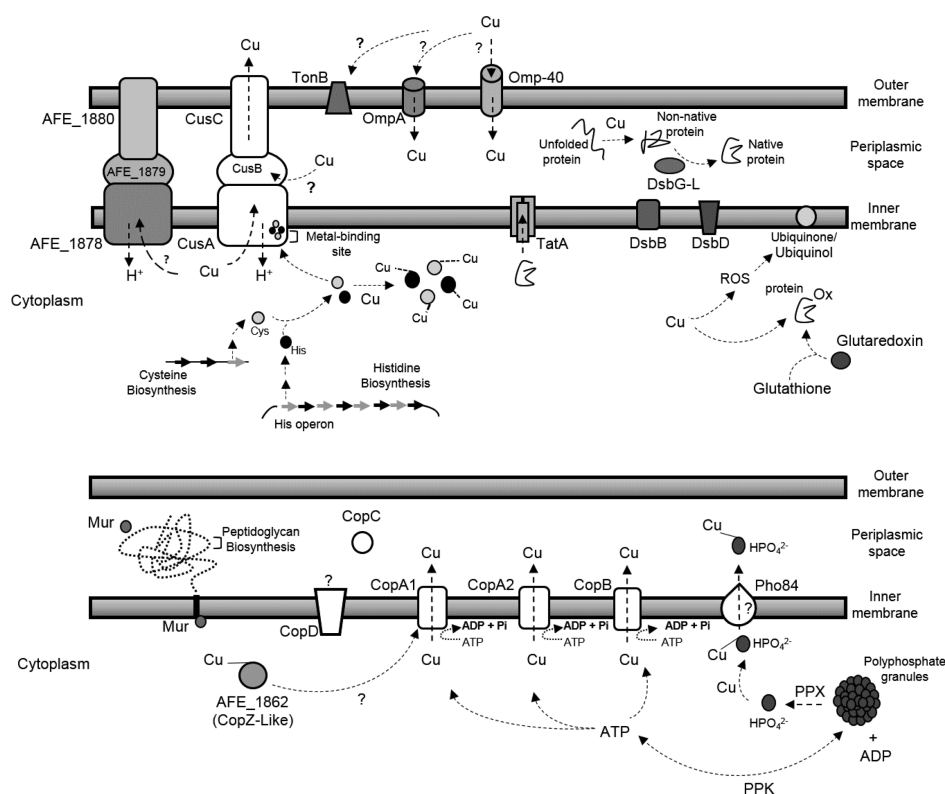
Table 1 shows that in the presence of copper *A. ferrooxidans* have increased levels of MurA (AFE\_3039) and MurF (AFE\_0210), which may be involved in peptidoglycan biosynthesis. It has been reported that antibiotics activate the “cell envelope stress stimulon” to overexpress genes associated with peptidoglycan biosynthesis in order to confront cell damage.<sup>65</sup> It can be speculated then, that an increased synthesis of peptidoglycan by MurA and MurF would prevent the possible cell wall damage caused in *A. ferrooxidans* by the presence of copper. Alternatively, peptidoglycan polymers and other surface proteins may sequester metals in part to prevent their toxic effects over sensitive metabolic processes. This happens especially when cells are forming a biofilm.<sup>66</sup>

**3.2.3. Cell Motility and Secretion.** Table 1 shows that a Sec-independent protein translocase protein (TatA-1)

(AFE\_3048) is highly up-regulated when *A. ferrooxidans* grows in the presence of copper. This putative protein would be part of twin-arginine translocation pathway in bacteria and other organisms.<sup>67</sup> Although little is known about this pathway in *A. ferrooxidans*, of 131 periplasmic proteins identified previously by using high resolution linear ion trap-FT MS, 5 were predicted to have Tat export signals.<sup>36</sup> The up-regulation of TatA-1 may indicate that an increased export of this kind of proteins takes place to the membrane or periplasm of the bacterium, as illustrated by the high synthesis of the putative uncharacterized protein AFE\_0042 in Table 1. Some of these proteins may have a possible role to confront the periplasmic stress caused by copper.

**3.2.4. Signal Transduction Mechanisms.** Table 1 shows the up-regulation of AFE\_3022, a putative Hpr(Ser) kinase/phosphatase (HprK) forming part of a possible phosphotransferase (PTS) system. This putative system has been recently described to be overexpressed in *A. ferrooxidans* grown in a biofilm attached to the mineral pyrite.<sup>68</sup> This PTS system is fundamental for carbohydrate uptake and therefore to form capsular polysaccharides and other molecules.<sup>69</sup> It is a well-known phenomenon that cell membranes and cell walls of microorganisms present in biofilms sequester toxic metals.<sup>66</sup> In the present case, copper might induce the formation of these polymers to prevent part of the toxic metal entrance to the *A. ferrooxidans* cell. Nevertheless, it is not clear yet whether the putative PTS system of this acidophile functions in the same way described for other bacteria.<sup>35</sup>

Several other proteins showed variable levels of synthesis in *A. ferrooxidans* grown in the presence of copper (Tables 1 and 2). However, no plausible explanation for their changing behavior is currently available. Evidently, further studies will be required to shed light on their possible roles if any, during metal toxicity adaptation.



**Figure 7.** A working scheme showing some selected proteins that change their levels in *A. ferrooxidans* adapted to grow in the presence of copper and their suggested putative functions. Putative proteins shaded in gray were identified in this work. Those in white and the possible role of inorganic polyphosphate (polyP) were identified previously in *A. ferrooxidans* and other microorganisms.<sup>9–12,23,36,70,71</sup> The locations and order in which proteins are illustrated is arbitrary.

### 3.3. Poorly Characterized

In this category, 20 proteins (11 up-regulated and 9 down-regulated in the presence of copper) were found to be currently annotated as putative uncharacterized proteins (Tables 1 and 2). However, it may be that these proteins are most likely characteristic of *A. ferrooxidans* and may have important functions in metal resistance yet to be defined. The proteomic approach offers an important contribution to the functional annotation for the available genomes of acidophilic biomining microorganisms such as *A. ferrooxidans* for which no genetic systems are easily available to perform functional analysis by homologous recombination and genetic disruption of the genes of interest.

The quantitative proteomics results showed an important number of changes in the levels of proteins from *A. ferrooxidans* due to the presence of copper. A scheme summarizing several of the differentially synthesized proteins some of which may be new copper resistance determinants in *A. ferrooxidans* is shown in Figure 7.

In conclusion, *A. ferrooxidans* would have a wide repertoire of strategies to confront extremely high copper and other metals concentrations in its environment. In addition to previously reported canonical efflux ATPases and RND efflux pumps and their duplications, these are a decrease of copper influx by down-regulation of proteins such as Omp40; increased synthesis of amino acids with high affinity for copper, such as Cysteine and Histidine; an efficient antioxidant defense system; a putative disulfide isomerase DsbG-L system to repair folding damage of periplasmic proteins and an increased synthesis of peptidoglycan to repair the damage caused by copper on the cell envelope.

Obviously, these predictions should be experimentally supported in future research.

#### ■ ASSOCIATED CONTENT

##### 📄 Supporting Information

Differences in protein levels and identification of protein spots isolated from 2D-PAGE; primers for qRT-PCR, all quantitation data obtained, Mascot search results. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

#### ■ AUTHOR INFORMATION

##### Corresponding Author

\*Carlos A. Jerez, Phone: (56 2) 2 9787376. E-mail: [cjerez@uchile.cl](mailto:cjerez@uchile.cl)

##### Notes

The authors declare no competing financial interest.

#### ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant FONDECYT 1110214 and in part by ICM P-05-001-F project. We also thank CONICYT for a doctoral fellowship to R. Almarcegui and to TIGR for the use of their complete *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome sequence ([www.tigr.org/db.shtml](http://www.tigr.org/db.shtml)). CNB-CSIC Proteomic Facility belongs to ProeoRed-ISCIH.

#### ■ REFERENCES

- (1) Das, A.; Modak, J. M.; Natarajan, K. A. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998, 73, 215–222.



- (2) Watling, H. R. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides—a review. *Hydrometallurgy* **2006**, *84*, 81–108.
- (3) Jerez, C. A. Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed; Moo-Young, M., Ed.; Elsevier: Boston, MA, 2011, Vol 3, pp 717–729.
- (4) Jerez, C. A. The use of extremophilic microorganisms in industrial recovery of metals. In *Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications*; Songh, O., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2013; pp 319–334.
- (5) Baker-Austin, G.; Dopson, M.; Wexler, M.; Sawers, R. G.; Stemmler, A.; Rosen, B. P.; Bond, P. L. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus* Fer1. *Extremophiles* **2007**, *11*, 425–434.
- (6) Franke, S.; Rensing, C. Acidophiles. Mechanisms to tolerate metal and acid toxicity. In: Gerday, C, Glansdorff, N, Eds.; *Physiology and Biochemistry of Extremophiles*; ASM Press: Washington DC, 2007; pp 271–278.
- (7) Jerez, C. A. The use of genomics, proteomics and other OMIC technologies for the global understanding of biomining microorganisms. *Hydrometallurgy* **2008**, *94*, 162–169.
- (8) Baker-Austin, C.; Dopson, M.; Wexler, M.; Sawers, R. G.; Bond, P. L. Molecular insight into extreme copper resistance in the extremophilic archaeon '*Ferroplasma acidarmanus*' Fer1. *Microbiology* **2005**, *151*, 2637–2646.
- (9) Alvarez, S.; Jerez, C. A. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5177–5182.
- (10) Orell, A.; Navarro, C. A.; Arancibia, R.; Mobarec, J. C.; Jerez, C. A. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 839–848.
- (11) Orell, A.; Navarro, C. A.; Rivero, M.; Aguilar, J. S.; Jerez, C. A. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. *Extremophiles* **2012**, *16*, 573–583.
- (12) Navarro, C. A.; Orellana, L. H.; Mauriaca, C.; Jerez, C. A. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6102–6109.
- (13) Orellana, L. H.; Jerez, C. A. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 761–767.
- (14) Salazar, C.; Acosta, M.; Galleguillos, P.; Shmaryahu, A.; Quatrini, R.; Holmes, D. S.; Demergasso, C. Analysis of gene expression in response to copper stress in *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strain D2, isolated from a copper bioleaching operation. *Adv. Mater. Res.* **2013**, *825*, 157–161.
- (15) Amaro, A. M.; Chamorro, D.; Seeger, R.; Arredondo, R.; Peirano, I.; Jerez, C. A. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **1991**, *173*, 910–915.
- (16) Stenberg, F.; Chovanec, P.; Maslen, S. L.; Robinson, C. V.; Ilag, L. L.; Von Heijne, G.; Daley, D. O. Protein complexes of the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Biol. Chem.* **2005**, *41*, 34409–34419.
- (17) Varela, C.; Mauriaca, C.; Paradela, A.; Albar, J. P.; Jerez, C. A.; Chavez, F. P. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 17.
- (18) Chevallet, M.; Luche, S.; Rabilloud, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1852–1858.
- (19) Darling, A. E.; Mau, B.; Perna, N. T. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS One* **2010**, *5*, e11147.
- (20) Vera, M.; Pagliai, F.; Guiliani, N.; Jerez, C. A. The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* can survive under phosphate-limiting conditions by the expression of a C-P lyase operon that allows it to grow on phosphonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 1829–1835.
- (21) Rozen, S.; Skaletsky, H. J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* **2000**, *132*, 365–386.
- (22) Andersen, C. L.; Jensen, J. J.; Orntoft, T. F. Normalization of real-time quantitative RT-PCR data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization applied to bladder and colon-cancer data-sets. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5245–5250.
- (23) Guiliani, N.; Jerez, C. A. Molecular cloning, sequencing, and expression of omp-40, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2318–2324.
- (24) Jerez, C. A.; Seeger, M.; Amaro, A. M. Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *98*, 29–34.
- (25) Magnani, D.; Solioz, M. How bacteria handle copper. *Microbiol. Monogr.* **2007**, *6*, 259–285.
- (26) Rensing, C.; Grass, G. *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 197–213.
- (27) Nikaido, H. Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **2011**, *77*, 1–60.
- (28) Kim, E.-H.; Nies, D. H.; Rensing, C. Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 2381–2387.
- (29) Padilla-Benavides, T.; McCann, C. J.; Argüello, J. M. The mechanism of Cu<sup>+</sup> transport ATPases: interaction with Cu<sup>+</sup> chaperones and the role of transient metal-binding sites. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 69–78.
- (30) Silva, M.; Ferreira, A.; Rodriguez, M.; Wolff, D. The major *Thiobacillus ferrooxidans* outer membrane protein forms low conductance ion channels in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **1992**, *296*, 169–173.
- (31) Teitzel, G.; Geddie, A.; De Long, S.; Kirisits, M.; Whiteley, M.; Parsek, M. Survival and growth in the presence of elevated copper: Transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 7242–7256.
- (32) Sugawara, E.; Nikaido, H. Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2507–2511.
- (33) Noinaj, N.; Guillier, M.; Barnard, T. J.; Buchanan, S. K. TonB dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2010**, *64*, 43–60.
- (34) Schauer, K.; Rodionov, D. A.; DeReuse, H. New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the 'tip of the iceberg'? *Trends Biochem. Sci.* **2008**, *33*, 330–338.
- (35) Valdés, J.; Pedroso, I.; Quatrini, R.; Dodson, R. J.; Tettelin, H.; Blake, R.; Eisen, J. A.; Holmes, D. S. *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* **2008**, *9*, 597.
- (36) Chi, A.; Valenzuela, L.; Beard, S.; Mackey, A. J.; Shabanowitz, J.; Hunt, D. F.; Jerez, C. A. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *12*, 2239–2251.
- (37) Osorio, H.; Martínez, V.; Nieto, P. A.; Holmes, D. S.; Quatrini, R. Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 203.
- (38) Grass, G.; Thakali, K.; Klebba, P. E.; Thieme, D.; Müller, A.; Wildner, G. F.; Rensing, C. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5826–5833.
- (39) Chaturvedi, K. S.; Hung, C. S.; Crowley, J. R.; Stapleton, A. E.; Henderson, J. P. The siderophore yersinia bactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 731–736.
- (40) Appia-Ayme, N.; Guiliani, N.; Ratouchniak, J.; Bonnefoy, V. Characterization of an operon encoding two c-type cytochromes, an aa(3)-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4781–4787.
- (41) Cook, G. M.; Poole, R. K. Oxidase and periplasmic cytochrome assembly in *Escherichia coli* K-12: CydDC and CcmAB are not required for haem-membrane association. *Microbiology* **2000**, *146*, 527–536.

- (42) Jünemann, S. Cytochrome *bd* terminal oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1321*, 107–127.
- (43) VanOrsdel, C. E.; Bhatt, S.; Allen, R. J.; Brenner, E. P.; Hobson, J. J.; Jamil, A.; Haynes, B. M.; Genson, A. M.; Hemm, M. R. The *Escherichia coli* CydX protein is a member of the CydAB cytochrome *bd* oxidase complex and is required for cytochrome *bd* oxidase activity. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 3640–3650.
- (44) Cárdenas, J. P.; Valdés, J.; Quatrini, R.; Duarte, F.; Holmes, D. S. Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *88*, 605–620.
- (45) Belfiore, C.; Ordoñez, O. F.; Fariás, M. E. Proteomic approach of adaptive response to arsenic stress in *Exiguobacterium* sp. S17, an extremophile strain isolated from a high-altitude Andean Lake stromatolite. *Extremophiles* **2013**, *17*, 421–431.
- (46) Soballe, B.; Poole, R. K. Ubiquinone limits oxidative stress in *Escherichia coli*. *Microbiology* **2000**, *146*, 787–796.
- (47) Kucera, J.; Bouchal, P.; Cerna, H.; Potesil, D.; Janiczek, O.; Zdrahal, Z.; Mandl, M. Kinetics of anaerobic elemental sulfur oxidation by ferric iron in *Acidithiobacillus ferrooxidans* and protein identification by comparative 2-DE-MS/MS. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2012**, *101*, 561–573.
- (48) Gale, N. L.; Beck, J. V. Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **1967**, *94*, 1052–1059.
- (49) Esparza, M.; Cárdenas, J. P.; Bowien, B.; Jedlicki, E.; Holmes, D. S. Genes and pathways for CO<sub>2</sub> fixation in the obligate, chemolithoautotrophic acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, carbon fixation, Carbon fixation in *A. ferrooxidans*. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 229.
- (50) Ramírez, P.; Guiliani, N.; Valenzuela, L.; Beard, S.; Jerez, C. A. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4491–4498.
- (51) Hajduch, M.; Rakwal, R.; Kumar-Awaral, G.; Yonekura, M.; Petrova, A. High resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress related proteins. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2824–2831.
- (52) Kung, C. S.; Huang, W. N.; Huang, Y. C.; Yeh, K. C. Proteome survey of copper binding proteins in *Arabidopsis thaliana* by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* **2006**, *6*, 2746–2758.
- (53) Osorio, H.; Mangold, S.; Denis, Y.; Nancucheo, I.; Esparza, M. Anaerobic Sulfur Metabolism Coupled to Dissimilatory Iron Reduction in the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 2172–2181.
- (54) Alifano, P.; Fani, R.; Lio, P.; Lazcano, A.; Bazzicalupo, M.; Carlomagno, M. S.; Bruni, C. B. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 44–69.
- (55) Pearce, D. A.; Sherman, F. Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 4774–4779.
- (56) Ingle, R.; Mugford, S.; Rees, J.; Campbell, M.; Smith, A. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *Plant Cell* **2005**, *17*, 2089–2106.
- (57) Sochor, J.; Zitka, O.; Hynek, O.; Jilkova, E.; Krejcová, L.; Trnkova, L.; Adam, V.; Hubalek, J.; Kynicky, J.; Vrba, R.; Kizek, R. Bio-sensing of Cadmium(II) ions using *Staphylococcus aureus*. *Sensors* **2011**, *11*, 10638–10663.
- (58) Fuentes, D. E.; Fuentes, E. L.; Castro, M. E.; Pérez, J. M.; Araya, M. A.; Chasteen, T. G.; Pichuantes, S. E.; Vasquez, C. C. Cysteine metabolism-related genes and bacterial resistance to potassium tellurite. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8953–8960.
- (59) Lillig, C. H.; Berndt, C.; Holmgren, A. Glutaredoxin systems. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 1304–1317.
- (60) Ito, K.; Inaba, K. The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2008**, *18*, 450–458.
- (61) Zhang, C.; Xia, J.; Liu, Y.; He, H.; Qiu, G. The putative thiol-disulphide interchange protein DsbG from *Acidithiobacillus ferrooxidans* has disulphideisomerase activity. *ScienceAsia* **2010**, *36*, 100–104.
- (62) Hiniker, A.; Collet, J. F.; Bardwell, J. Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **2005**, *40*, 33785–33791.
- (63) Vollmer, W.; Blanot, D.; De Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *32*, 149–167.
- (64) Barreteau, H.; Kovac, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 168–207.
- (65) Bertsche, U. The polysaccharide peptidoglycan and how it is influenced by (antibiotic) stress. In *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends*; Ullrich, M., Ed.; Caister Academic Press: Norfolk, U.K., 2009; pp 3–26.
- (66) Harrison, J. J.; Ceri, H.; Turner, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 928–938.
- (67) Fröbel, J.; Rose, P.; Müller, M. Twin-arginine-dependent translocation of folded proteins. *Philos. Trans. R. Soc., B* **2012**, *367*, 1029–1046.
- (68) Vera, M.; Krok, B.; Bellenberg, S.; Sand, W.; Poetsch, A. Shotgun proteomics study of early biofilm formation process of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 on pyrite. *Proteomics* **2013**, *13*, 1133–1144.
- (69) Deutscher, J.; Francke, C.; Postma, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2006**, *70*, 939–1031.
- (70) Rao, N. N.; Gómez-García, M. R.; Kornberg, A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* **2009**, *78*, 605–647.
- (71) Keasling, J. D. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1997**, *829*, 242–249.

## Novel Cell Envelope Proteins Related to Copper Resistance in *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Rodrigo Almarcegui<sup>1, a</sup>, Claudio Navarro<sup>1, b</sup>, Alberto Paradela<sup>2, c</sup>,  
Diego von Bernath<sup>1, d</sup>, Carlos A. Jerez.<sup>\*1, f</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences and ICDB, University of Chile, Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Proteomics Laboratory, National Biotechnology Center, Madrid, Spain

<sup>a</sup>almarcegui@live.cl, <sup>b</sup>clnavarro@yahoo.com, <sup>f</sup>cjerez@uchile.cl

**Keywords:** *At. ferrooxidans*; Copper resistance; Proteomics; Bioleaching; Disulfide isomerase

**Abstract.** The presence in *At. ferrooxidans* of canonical copper resistance determinants does not explain the extremely high copper concentrations this microorganism is able to tolerate. This suggests that *At. ferrooxidans* may have additional copper resistance mechanisms. New possible copper resistance determinants were searched by using 2D-PAGE and real time PCR (qRT-PCR). Results showed the up-regulation of RND-type Cus systems and different RND-type efflux pumps in *At. ferrooxidans* grown in the presence of copper, suggesting that these proteins may be implied in resistance to this metal. Furthermore, the up-regulation of putative periplasmic disulfide isomerases was also seen in the presence of copper. These proteins are most likely involved in the formation and rearrangement of disulfide bonds in proteins in the periplasm. Copper ions catalyze the formation of incorrect disulfide bonds in proteins. However, the up-regulated disulfide isomerases found could restore native disulfide bonds allowing cell survival. In conclusion, *At. ferrooxidans* may resist high copper concentrations by using additional copper resistance strategies in which cell envelope proteins are very important. This knowledge could be used to select the best fit members of the bioleaching community to attain more efficient industrial biomining processes.

### Introduction

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is capable to resist extremely high concentrations of copper and other metals. This is an essential property to survive in the usual environment found in biomining operations, where copper concentrations in leachates are in the range 30 to 90 mM [1]. In addition, the bioleaching microorganisms are confronted with toxic reactive oxygen species [2, 3]. Established copper resistance determinants similar to those present in bacteria such as *Escherichia coli* have been described in *At. ferrooxidans* [1, 2, 4]. This implies that the biomining bacterium may have additional and efficient copper resistance mechanisms. In bacteria and archaea copper resistance has been associated in part to their envelope. Specifically, multiprotein membrane complexes would eliminate intracellular or periplasmic copper to keep the concentration of the metal at levels compatible with life [5]. New possible copper resistance determinants present in the cell envelope of *At. ferrooxidans* were searched by using 2D-PAGE and real time PCR (qRT-PCR). The results obtained may help to elucidate the molecular basis for the mechanisms *At. ferrooxidans* uses to adapt to metals.

### Materials and Methods

**Bacterial strain and growth conditions.** *At. ferrooxidans* ATCC 23270 was grown at 30°C in 9K medium containing ferrous sulfate at pH 1.5 in the absence or presence of CuSO<sub>4</sub> as previously described [6].

**Total membrane fraction preparation.** After growing *At. ferrooxidans* ATCC to the late exponential phase cells were harvested by centrifugation followed by their resuspension in sonication buffer to disrupt them by sonic oscillation on ice. The extract obtained was centrifuged at 100,000 x g for 1 h at 4°C to obtain the total membrane fraction pellet. Finally, the membrane enriched fraction was resuspended in ACA750 buffer (750 mM  $\epsilon$ -aminocaproic acid, 0.5 mM EDTA, 50 mM Bis-Tris-HCl, pH 7) and were stored at -80°C until the proteomic analysis.

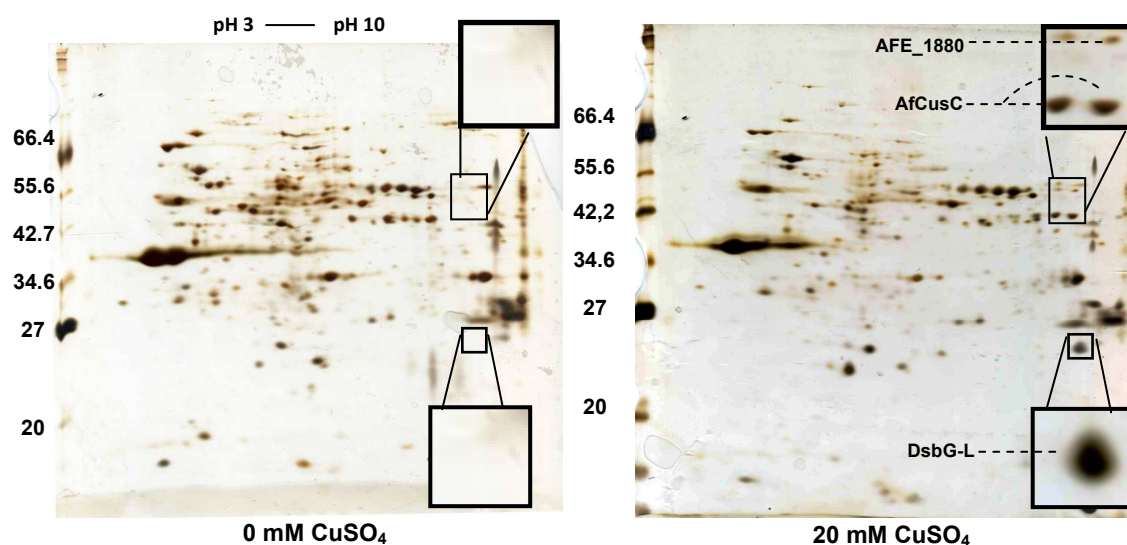
**Proteomic analysis of membrane fractions by means of 2D-PAGE.** Four hundred micrograms of total membrane fraction protein was solubilized in buffer ACA750 containing 5 %  $\eta$ -dodecyl- $\beta$ -D-maltoside. Proteins were then separated by two-dimensional non-equilibrium pH polyacrylamide gel electrophoresis (2-D NEPHGE) performed as described before for *At. ferrooxidans* [7]. Protein spots were excised manually from the gels and were identified by MALDI peptide mass fingerprinting and MALDI-TOF/TOF MS analysis as described before [8].

**Primer design and real-time RT-PCR of *At. ferrooxidans* genes.** Primers for qRT-PCR were designed from the DNA genome sequence of *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Gene expression was analyzed by qRT-PCR by using the Corbett Rotor Gene 6000 system as described previously [9]. *alaS<sub>Af</sub>* was selected as a reference gene since its expression was found to be the most stable under our experimental conditions.

## Results

Figure 1 shows the changes in the expression of proteins present in the membrane fraction from *At. ferrooxidans* ATCC 23270 as determined by 2D-PAGE analysis. Several proteins were differentially expressed when cells were grown and adapted to the presence of 20 mM copper. A dramatic example of overexpression for a protein in *At. ferrooxidans* grown in the presence of copper is the one coded by gene AFE\_1943 and whose silver stained spot is enclosed by a square in the gels in Fig. 1. The protein was not detected in control cells grown in the absence of the metal. This protein has been annotated as a putative disulfide isomerase containing a DsbG domain and therefore we named it as DsbG-L (DsbG like). When real time PCR was used to determine the transcriptional level of gene AFE\_1943 a strong overexpression was detected with different increasing copper sulfate concentrations (results not shown here due to lack of space). Our observations suggest a possible role for this periplasmic protein during *At. ferrooxidans* stress response to copper. Dsb proteins catalyze the formation and isomerization of disulfide bridges in the proteins present in the bacterial periplasm from Gram-negative bacteria [10]. Specifically, disulfide isomerases are proteins capable of changing non-native disulfide bridges into native ones.

Previously reported data indicate that during copper stress in bacteria abnormal disulfide bridges are formed that can cause cell's death [11]. Therefore, under these stressing conditions disulfide bridge isomerization would be essential. Overexpression of a disulfide isomerase such as DsbG-L could be an important mechanism to protect cells from the damage caused by the presence of excess copper as illustrated in the cartoon in figure 2. The heterologous expression of DsbG-L from *At. ferrooxidans* in *E. coli* conferred the last cells a higher copper resistance (not shown), supporting the functionality of this protein and the proposed model. By using further proteomic and real time RT-PCR analysis we detected the overexpression of two putative RND systems that may transport copper from the periplasm and or cytoplasm to the exterior of the cell to detoxify the microorganism (Fig. 1, Table 1).

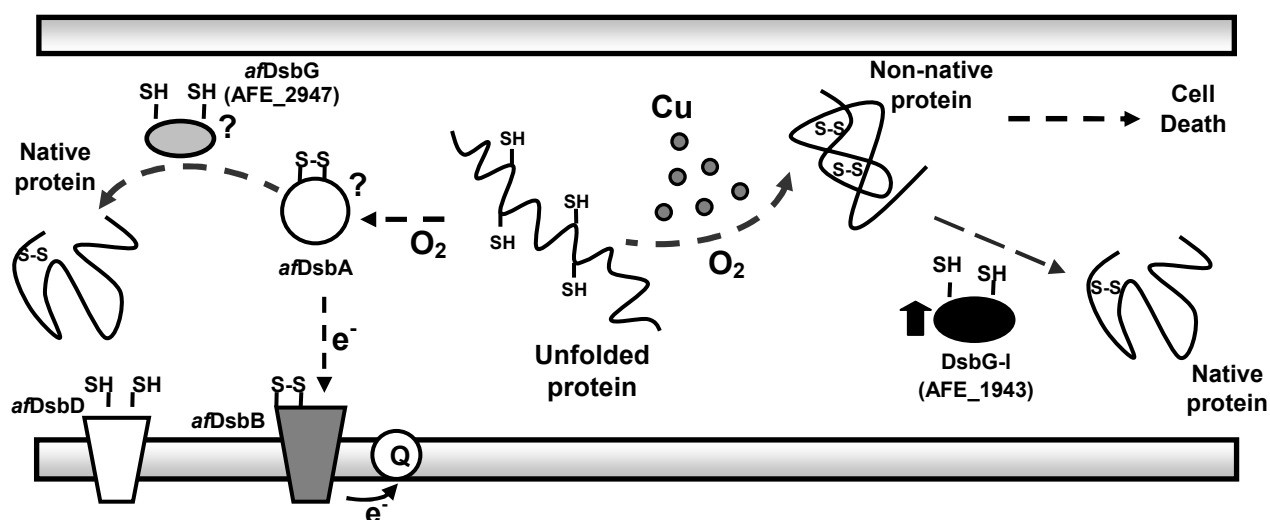


**Figure 1.** 2D PAGE of the total membrane fraction from *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Cells were grown in the absence or presence of 20 mM  $\text{CuSO}_4$ . The inserted squares indicate the spot containing RND proteins and DsbG-L.

**Table 1.** Induction of transcript levels of RND genes determined by real-time RT-PCR.

Gene	Fold Change (Log2)	Gene	Fold Change (Log2)
<i>AfcusA</i>	$2.6 \pm 0.03$	AFE_1878	$3.7 \pm 0.88$
<i>AfcusB</i>	$3.3 \pm 0.37$	AFE_1879	$4.0 \pm 0.34$
<i>AfcusC</i>	$3.5 \pm 0.12$	AFE_1880	$4.6 \pm 0.26$

Cells were grown in sulfur and in the presence of 50 mM  $\text{CuSO}_4$ . Changes are referred to the control condition in the absence of the metal



**Figure 2.** Working model for the possible role of the putative disulfide isomerase DsbG-I during copper resistance in *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Under normal conditions the oxidative folding of periplasmic proteins would be catalyzed by several thiol:disulfide oxidoreductases (*afDsb*). In the presence of copper, non-native disulfide bridges and defective protein folding would take place

that can cause cell death. Overexpression of active DsbG-L would restore the native disulfide bridges and the corresponding activities of the proteins that contain them.

## Conclusion

Our previous results and those shown here suggest that several strategies such as removing copper from the cell by efflux through RND systems and repairing protein damage generated by the metal are most likely essential for *At. ferrooxidans* to resist high concentrations of toxic copper.

## References

- [1] C.A. Jerez, The use of extremophilic microorganisms in the industrial recovery of metals. In *extremophiles: Sustainable resources and Biotechnological Implications*, in: Om. V. Singh (ed.), John Wiley and sons, Inc., (2013), pp. 319-334.
- [2] A. Orell, C.A. Navarro, R. Arancibia, J.C. Mobarec, C.A. Jerez, Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 839-848.
- [3] M. Dopson, C. Baker-Austin, P.R. Koppineedi, L.B. Philip, Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms, *Microbiol.* 149 (2003) 1959-1970.
- [4] C.A. Jerez, Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. In: Murray Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, vol. 3, (2011), pp. 717-729. Elsevier.
- [5] D. Magnani, M. Solioz, How bacteria handle copper, *Microbiol. Monogr.* 6 (2007) 259-285.
- [6] C.A. Navarro, L.H. Orellana, C. Mauriaca, C.A. Jerez, Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper, *Appl. Environ. Microbiol.* 75 (2011) 6102-6109.
- [7] A. Chi, L. Valenzuela, S. Beard, A.J. Mackey, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, C.A. Jerez, Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomic analysis, *Mol. Cell. Proteomics.* 6 (2007) 2239-2251.
- [8] S. Beard, A. Paradela, J.P. Albar, C.A. Jerez, Growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in thiosulfate under oxygen-limiting conditions generate extracellular sulfur globules by means of a secreted tetrathionate hydrolase, *Front. Microbio.* 2:79. doi: 10.3389/fmicb.2011.00079.
- [9] L.H. Orellana, C.A. Jerez, A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2011) 761-767.
- [10] K. Ito, K. Inaba, The disulfide bond formation (Dsb) system, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 450-458.
- [11] A. Hiniker, J.F. Collet, J. Bardwell, Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC, *J. Biol. Chem.* 40 (2005) 33785-33791.

**Integration of Scientific and Industrial Knowledge on Biohydrometallurgy**

10.4028/www.scientific.net/AMR.825

**Novel Cell Envelope Proteins Related to Copper Resistance in *Acidithiobacillus ferrooxidans***

10.4028/www.scientific.net/AMR.825.206