



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

“Estudio de la unión de cobre a la chaperona
periplasmática CusF de *Acidithiobacillus
ferrooxidans*: efecto del pH y del cambio de la
Metionina 66 por Histidina mediante mutación sitio-
dirigida.”

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

DIEGO NAHUEL CORTEZ MILÁN

Director del seminario de título:
Dr. Carlos A. Jerez Guevara

Noviembre 2016
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr. Diego Nahuel Cortez Milán**.

“Estudio de la unión de cobre por la chaperona periplasmática CusF de *Acidithiobacillus ferrooxidans*: efecto del pH y del cambio de la Metionina 66 por Histidina mediante mutación sitio-dirigida.”

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

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

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión

Evaluador

Biografía



Nací un 20 de noviembre de 1991 en el hospital J. J. Aguirre al igual que mis 2 hermanos mayores, mientras vivíamos en la querida comuna de Conchalí junto con mi hermano Amaru, mi hermana Gabriela y mis padres Roberto y Anita.

Desde muy pequeño mostré mucho interés por el mundo, por el funcionamiento de las cosas, por los números y la historia. Tuve una larga etapa de preguntar “¿Por qué?” ante cualquier cosa, para luego rápidamente pasar a la etapa de los “Porque”, dando explicaciones inventadas de cómo funciona cualquier cosa con total convicción, como el funcionamiento de las naves “Interplanetarias” o los trenes “Peletáticos” (eléctricos), etapa en la que sigo estando.

A los 5 años nos trasladamos a Independencia, comuna en la que crecí y viví durante la mayor parte de mi vida. Durante mi infancia estudié en el pequeño Colegio Iberoamericano de esa misma comuna, y en mi adolescencia en el Instituto Presidente Errázuriz de Las Condes, colegio en el que mi padre ejercía como profesor de historia. Fue durante mi enseñanza básica que descubrí mi amor por los números y la naturaleza, y durante la enseñanza media que decidí estudiar alguna carrera relacionada con Ciencias o la Ingeniería.

Decidí estudiar Ingeniería en Biotecnología debido a que parecía ser una carrera prometedora en la que se mezclaba la ingeniería aplicada y la ciencia de la biología molecular dando paso a una ingeniería en ciencias. Luego, a mis 25 años, estoy aquí en esta carrera casi exclusivamente científica igual que hace 20 años, dando explicaciones casi inventadas o sacadas de la intuición sobre cómo funcionan las cosas (como la CusF) con total convicción.

Agradecimientos

Índice de contenidos

Biografía	iii
Agradecimientos	iv
Índice de contenidos	v
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
1. Introducción	1
1.1 Biolixiviación y Acidithiobacillus ferrooxidans	1
1.2 Mecanismos de resistencia a cobre	2
1.3 El sistema Cus.....	4
1.4 CusF en A. ferrooxidans	9
1.5 Objetivo general.....	14
1.6 Objetivos específicos	14
2. Materiales y métodos	15
2.1 Cepas y condiciones de cultivo	15
2.2 Plasmidios.....	15
2.3 Técnicas de biología molecular.....	17
2.3.1 PCR convencional.....	17
2.3.2 Electroforesis en geles de agarosa.....	17
2.3.3 Extracción de DNA desde geles de agarosa.....	18
2.3.4 Extracción total de nucleótidos: método “One step”	18
2.3.5 Extracción de DNA plasmidial desde bacterias	19
2.3.6 Transformación de plasmidios en células quimiocompetentes	19
2.3.7 Digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción.....	19
2.3.8 Cuantificación de ácidos nucleicos	20
2.3.9 Ligación de fragmentos de DNA	20
2.3.10 Mutagénesis sitio-dirigida.....	21
2.4 Métodos Bioinformáticos.....	22
2.4.1 Análisis del sitio de unión a cobre de CusF	23

2.5 Clonamiento	25
2.5.1 Diseño de oligonucleótidos	25
2.5.2 Generación y selección de clones	26
2.5.3 Estrategia de clonamiento	27
2.6 Técnicas de proteínas	28
2.6.1 Extracción total de proteínas para su análisis por SDS-PAGE	28
2.6.2 Cuantificación de proteínas	28
2.6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida	29
2.6.4 Purificación de proteínas	30
2.6.5 Incubación con cobre y diálisis	31
2.6.6 Medición de cobre unido a proteínas	33
3. Resultados	35
3.1 Análisis del sitio de unión a cobre de CusF	35
3.2 Selección de la CusF a analizar	36
3.3 Clonamiento	38
3.3.1 Subclonamiento en pGEM-T	38
3.3.2 Clonamiento en pMAL-c5X	39
3.4 Mutagénesis sitio-dirigida	43
3.5 Purificación de proteínas	45
3.6 Unión de cobre a las proteínas de fusión de CusF _{3Af}	46
4. Discusión y Proyecciones	48
4.1 Análisis bioinformático	48
4.2 Medición de unión a cobre	50
4.3 Proyecciones	54
5. Conclusiones	56
6. Bibliografía	57
Material Suplementario	60

Índice de Tablas

Tabla 1. Características de los diferentes genes y proteínas <i>cusF</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 53993.	11
Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo.....	16
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.....	26
Tabla 4. Condiciones de los experimentos de incubación de las proteínas con cobre y su posterior diálisis.	33
Tabla 5. Porcentaje de identidad de los aminoácidos entre cada una <i>de las</i> CusF de <i>A. ferrooxidans</i>	38
Tabla 6. Unión de cobre a distintas proteínas CusF3Af.	46

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema general de sistemas de resistencia a cobre en bacterias.	4
Figura 2. Modelo de la CusF de <i>E. coli</i>	7
Figura 3. Alineamiento múltiple del sitio de unión a cobre de una selección de proteínas CusF.	8
Figura 4. Contexto genómico de los genes implicados en la resistencia a cobre en las cepas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 y ATCC 53993.....	10
Figura 5. Comparación del sitio de unión a cobre de la CusF de <i>E. coli</i> y <i>A. ferrooxidans</i>	12
Figura 6. Análisis bioinformático del sitio de unión a cobre de CusF.	23
Figura 7. Nivel de conservación de aminoácidos del sitio de unión a cobre de las proteínas CusF.	35
Figura 8. Alineamiento múltiple de las CusF de <i>A. ferrooxidans</i> y la CusF de <i>E. coli</i>	37
Figura 9. Subclonamiento del gen Lferr_0174 en pGEM-T.....	39
Figura 10. Clonamiento del gen Lferr_0174 en pMAL-c5X.....	41
Figura 11. Expresión de proteínas de fusión con CusF3Af en clones de <i>E. coli</i>	42
Figura 12. Comprobación de la obtención de la mutante M66H en cusF3Af.	44
Figura 13. Purificación de CusF3Af fusionada a MBP.....	45
Figura 14. Relación cobre/proteína de las distintas proteínas analizadas.	47
Figura 15. Modelos de todas las formas del sitio de unión a cobre de CusF encontradas mediante el análisis bioinformático.	49

Lista de Abreviaturas

aa	Aminoácido
ATCC	Colección Americana de Cultivos por Tipo, del inglés “American Type Culture Collection”
BCA	Ácido bicinconínico, por sus siglas en inglés “Bicinchoninic Acid”
BLAST	Búsqueda bioinformática de proteínas homólogas anotadas en la base de datos, del inglés “Basic Logical Assignment Search Tool”
CDD	Base de datos de dominios conservados de proteínas, del inglés “Conserved Domain Database”
dNTPs	Desoxinucleótidos, del inglés “Deoxynucleotide Tri-Phosphate”
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético, del inglés “Ethylenediaminetetraacetic Acid”
IPTG	Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido
K_d	Constante de disociación.
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MBP	Proteína de unión a maltosa, del inglés “Maltose Binding Protein”
OD	Densidad óptica de un cultivo medida con un espectrofotómetro en unidades arbitrarias. Del inglés “Optical density”

PCR	Técnica de reacción en cadena de DNA polimerasa utilizada en biología molecular, del inglés “Polymerase Chain Reaction”
PDB	Base de datos de la estructura tridimensional de proteínas, del inglés “Protein Data Bank”
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonio, del inglés “Phenylmethylsulfonyl fluoride”
PSA	Persulfato de amonio.
qPCR	Técnica de PCR en tiempo real utilizada para cuantificar niveles de transcrito en diferentes condiciones, del inglés “Quantitative PCR”
SDS	Dodecilsulfato sódico, del inglés “Sodium dodecyl sulfate”
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS, del inglés “SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
SLIM	Mutagénesis sitio-dirigida independiente de ligasa, del inglés “Site-Directed Ligase Independent Mutagenesis”
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i> , especie a la cual pertenece una de las DNA polimerasas más utilizadas en biología molecular
TBE	Solución amortiguadora utilizada en electroforesis en geles de agarosa compuesto de Tris, ácido bórico y EDTA

Resumen

La chaperona bacteriana periplasmática CusF es parte del sistema de resistencia a cobre CusCFBA. CusF une cobre (I) en el periplasma bacteriano mediante una histidina y dos metioninas muy conservadas en las bacterias. En *Acidithiobacillus ferrooxidans*, la histidina del sitio de unión a cobre de CusF_{Af} se encuentra sustituida por metionina. Se ha determinado que a pesar que la afinidad de la histidina por cobre es mayor que la de la metionina a pH neutro, esta última presenta una mayor afinidad por cobre a pH ácido. Siendo *A. ferrooxidans* una bacteria que vive en ambientes ácidos, esta sustitución podría estar relacionada con la adaptación al periplasma ácido de la bacteria. Se analizó bioinformáticamente el sitio de unión a cobre de CusF para determinar las especies en las que se encuentra esta sustitución. Se encontró que sólo el género *Acidithiobacillus* presenta esta sustitución. Adicionalmente se midió la unión de cobre a la CusF de *A. ferrooxidans* y el efecto que tiene esta sustitución. Para ello se clonó el gen *cusF3_{Af}* en *E. coli* y se realizó una mutación sitio dirigida de su metionina 66 cambiándola por histidina. Luego de expresar y purificar ambas proteínas (silvestre y mutada) se midió *in vitro* su capacidad de unir cobre tanto a pH ácido como neutro. A pH 7, la CusF3 de *A. ferrooxidans* presentó unión a cobre con un valor experimental de 0.7 átomos de cobre por proteína mientras que la mutante M66H unió 0.3 átomos de cobre por proteína (la misma cantidad de cobre que el control). A pH ácido no fue posible medir la unión de cobre con el método utilizado. Se concluye que la sustitución de histidina por metionina en la CusF3_{Af} es exclusiva del género *Acidithiobacillus* y que esta chaperona tiene capacidad de unir cobre a pH neutro.

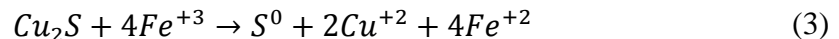
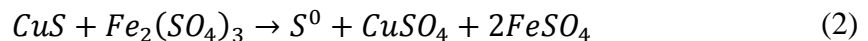
Abstract

The periplasmatic metallochaperone CusF is part of the CusCFBA copper resistance system. CusF binds Cu(I) through a conserved site consisting of 1 histidine and 2 methionines. In *Acidithiobacillus ferrooxidans*, this histidine present in the position 66 of CusF_{Af} is found substituted by a methionine. It has been determined that while the affinity of copper for histidine is higher than that for methionine at neutral pH, the latter has higher affinity for the metal at low pH. Since *A. ferrooxidans* lives in acidic environments, it is proposed that this substitution could be an adaptation to the acid periplasm of this bacterium. The copper binding site of CusF was analyzed bioinformatically to determine the species in which this substitution is found. This substitution was only present in the CusF of species from the genus *Acidithiobacillus*. Additionally, copper binding capacity of the *A. ferrooxidans* CusF was measured, and the effect of this substitution was investigated. To fulfill that purpose, the *cusF3_{Af}* gene was cloned into *E. coli* and a site directed mutation was performed to replace methionine 66 with histidine. Both wild type and mutated proteins were expressed and purified to measure *in vitro* their copper binding capacity at both neutral and acid pH. A copper binding capacity of 0,7 copper atoms per protein was found for the wild type CusF3_{Af}, while the M66H mutant was able to bind 0,3 copper atoms per protein (the same amount of copper present in the negative control). It was not possible to perform this measurement under acidic conditions. It was concluded that the substitution of histidine for methionine in CusF3_{Af} is exclusive of the *Acidithiobacillus* genus, and that this copper chaperone has the capacity to bind copper at neutral pH.

1. Introducción

1.1 Biolixiviación y *Acidithiobacillus ferrooxidans*

La minería del cobre es una de las principales industrias de Chile, y actualmente es el productor principal de este metal en el mundo (Consejo Minero, 2016). La extracción de cobre desde el mineral se realiza en una serie de procesos a gran escala, y la utilización de microorganismos en estos procesos se denomina biolixiviación. Dentro de los procesos de extracción del cobre mediante lixiviación bacteriana está la construcción de pilas de lixiviación del metal a bajo pH y grandes volúmenes, luego del chancado del mineral (Valdés y cols., 2008; Jerez, 2011). En las pilas de lixiviación, se produce la oxidación del mineral de calcosina a ion cúprico abióticamente mediante la oxidación producida en 2 pasos por el ion férrico (ecuaciones 1 y 2) (Naderi y cols., 2015). En la ecuación 3 se presenta la suma de ambas ecuaciones quitando el ion sulfato para resumir visualmente el proceso global.



La función de los microorganismos en este proceso es oxidar el ion ferroso a ion férrico permitiendo la reutilización de este último en la reacción resumida en la ecuación 3. Un miembro importante del consorcio bacteriano utilizado para recuperar cobre mediante este proceso es la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Rawlings, 2002; Jerez, 2009; Cárdenas y cols., 2010). En la biolixiviación, este microorganismo es expuesto a altas

concentraciones de diversos metales pesados, entre ellos el cobre, siendo capaz de crecer en este ambiente. Esto sugiere la existencia de eficientes mecanismos de resistencia a metales en esta bacteria (Orell y cols., 2010; Martinez-Bussenius y cols., 2016).

Acidithiobacillus ferrooxidans es una gammaprotobacteria gram negativa del orden *Acidithiobacillales* que es abundante en ambientes naturales asociados al mineral de pirita y carbón y a sus drenajes ácidos (Schrenk y cols., 1998). *A. ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica que oxida ion ferroso y compuestos reducidos de azufre y cuya fuente de carbono es dióxido de carbono. Crece a temperatura óptima de 30°C y a un pH óptimo de 2 aunque puede sobrevivir a pH inferiores a 1, por lo que se le considera mesófila y acidófila (Valdés y cols., 2008; Baker-Austin y Dopson, 2007). Existen varias cepas de *A. ferrooxidans* descritas. Entre ellas *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y *A. ferrooxidans* ATCC 53993. La última posee una isla genómica de aproximadamente 160 kb que está ausente en la cepa ATCC 23270 y que le confiere una mayor resistencia a cobre a la cepa ATCC 53993 (MIC > 100 mM) debido principalmente a la presencia de determinantes adicionales de resistencia a cobre (Orellana y Jerez, 2011).

1.2 Mecanismos de resistencia a cobre

El cobre es un metal de número atómico 29 que presenta 2 estados de oxidación estables: cobre I (ion cuproso) y cobre II (ion cúprico) donde Cu(I) es más abundante en ambientes reductores y Cu(II) en ambientes oxidantes. Es un elemento fundamental para la vida ya que posee funciones en diversos sistemas, como en la respiración y otras reacciones redox, el transporte de hierro, la coagulación de la sangre, la pigmentación y en algunos casos es

un elemento estructural (Puig y Thiele, 2002; Argüello y cols., 2013). Sin embargo, el exceso de cobre es tóxico para las bacterias debido, entre otras cosas, al estrés oxidativo producido por la reacción de Fenton que causa daños en el DNA, generando quiebres en la doble hebra (Lloyd y Phillips, 1999). Esta toxicidad aumenta en ambientes anaeróbicos donde predomina la forma reducida del cobre (Cu I), posiblemente porque este tiene más capacidad que Cu(II) para difundir por la membrana citoplasmática. La mayor toxicidad de Cu(I) con respecto a Cu(II) ha sido determinada en experimentos de cultivo de *E. coli* en presencia de cobre en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, donde se cuantificó el nivel de acumulación de cobre en las células y se midió la inhibición del crecimiento de estas al ser expuestas a concentraciones crecientes del metal (Outten y cols., 2001; Rensing y Grass, 2003). Debido a esta característica tóxica del cobre, éste se ha estudiado y utilizado en su estado metálico como un sólido antibacteriano (Grass y cols., 2011).

Ante el estrés por la presencia de cobre, las bacterias tienen diversas estrategias para regular la concentración y/o la acción dañina del cobre (Figura 1). En *E. coli*, quizás la bacteria gram negativa más estudiada, se han descrito los siguientes mecanismos de resistencia a cobre: CopA es una ATPasa tipo P que transporta Cu(I) utilizando ATP y cuya expresión está regulada por CueR. El sistema Cus es un sistema perteneciente a la familia de transportadores CBA (exclusiva de bacterias gram negativas) que están involucradas en el transporte de iones metálicos, xenobióticos y drogas. Específicamente, el sistema Cus transporta cobre desde el periplasma hacia el espacio extracelular utilizando la fuerza protón motriz producida por el gradiente de protones entre el periplasma y el citoplasma y que está regulado por el sistema de 2 componentes CusRS.

CueO, también regulada por CueR, es una multicobre oxidasa que protege el periplasma del daño causado por Cu(I) oxidándolo enzimáticamente a Cu(II) utilizando oxígeno. Por último, el sistema Pco/Cop (no presente en la figura 1) incluye una multicobre oxidasa que, mediante otras proteínas del sistema, captura cobre en el citoplasma y lo transporta hacia el periplasma (Rensing y Grass, 2003, y sus referencias). Todos estos sistemas, salvo CueO, están también presentes en *A. ferrooxidans* (Navarro y cols., 2009, 2013).

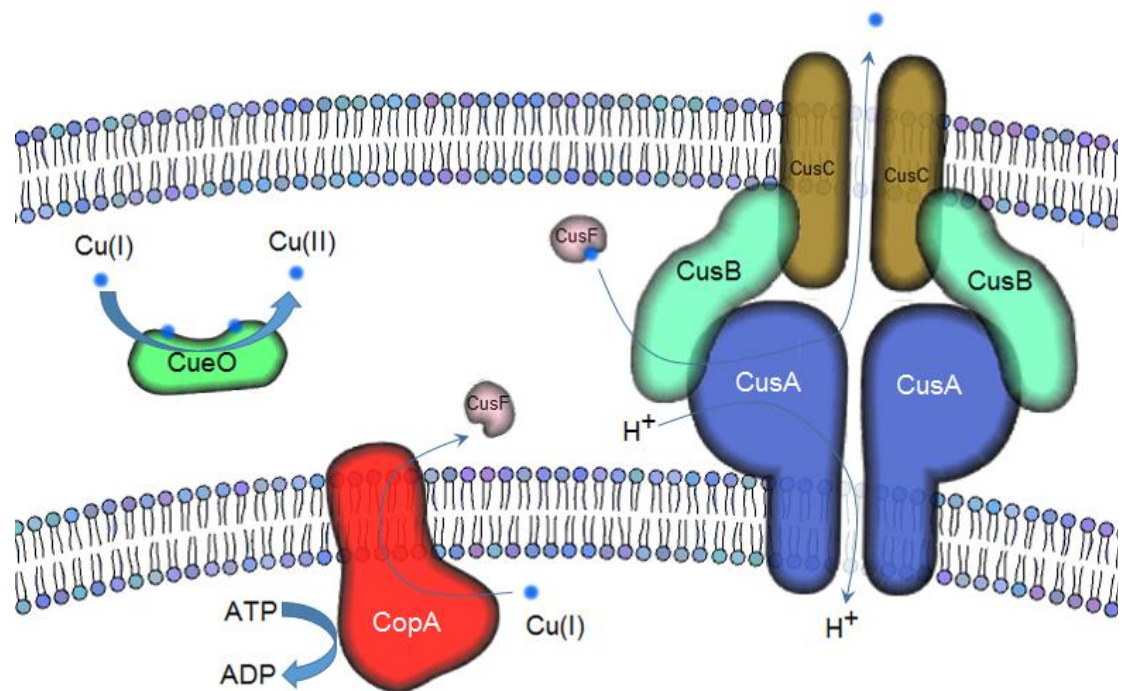


Figura 1. Esquema general de sistemas de resistencia a cobre en bacterias. Se muestra el sistema CusCBA, la chaperona periplasmática CusF, la ATPasa CopA, la multicobre oxidasa CueO y las interacciones entre los sistemas.

1.3 El sistema Cus

El sistema Cus está formado por 3 elementos, CusA, CusB y CusC. CusA corresponde al elemento RND (“resistance nodulation cell division family”) en la membrana interna por

el cual ocurre el influjo de protones. CusC es el factor de la membrana externa (OMF). Por último, CusB es la proteína de fusión de membrana (MFP) presente en el periplasma que junto con CusC forman el canal por donde los iones Cu(I) se transportan hacia el espacio extracelular (Figura 1). Las proteínas de la familia RND como CusA forman un homotrímero que se encuentra presente en la membrana interna, donde cada monómero posee 12 hélices alfa de transmembrana, y sufre cambios conformacionales que permiten el influjo de protones. CusB es un hexámero que vincula CusA con CusC. Tanto CusA como CusB presentan sitios de unión a Cu(I) formados por 3 metioninas, los cuales son funcionales y necesarios para conferir resistencia a cobre. En el sitio de unión a cobre de CusA se une Cu(I) para luego ser exportado a través de CusB/CusC. En cuanto al sitio de unión a cobre de CusB existen 2 propuestas sobre su función: que el cobre unido al sitio se transfiere desde CusB a CusA antes de ser exportado (modelo del embudo) o que CusB funciona como un interruptor que al unir cobre sufre un cambio conformacional que permite la unión de cobre directamente a CusA (modelo del interruptor). Siendo CusA un canal que conecta el periplasma con el citoplasma, el origen principal del cobre a exportar es el cobre periplasmático, aunque existe evidencia de canales tipo RND transportando sustratos a través de la membrana interna (Kim y cols., 2011 y sus referencias).

El cobre periplasmático, sin embargo, no llega libremente al sistema CusCBA, sino que es entregado por la chaperona¹ periplasmática CusF (Figura 1). Esta es una proteína pequeña de aproximadamente 10 kDa que une 1 átomo de Cu(I) por proteína y que al unir

¹ Se les denomina “chaperonas de cobre” a las proteínas que captan el cobre para entregarlo a un sistema proteico u otro lugar protegiéndolo de reacciones redox y evitando el daño producido por especies reactivas de oxígeno (Rubino y Franz, 2012).

cobre presenta un espectro de absorbancia con un peak a 510 nm, convirtiéndose en la primera proteína rosada de unión a cobre (Franke y cols., 2003). Estructuralmente, CusF es un barril β de 5 hebras que forman un pliegue tipo OB donde el cobre se encuentra unido a los residuos H₃₆, M₄₇ y M₄₉ que se encuentran en su sitio conservado de unión a cobre (Loftin y cols., 2005) (Figura 2). CusF presenta, además, un residuo de triptófano presente en el bolsillo de unión a cobre (W₄₄) que tiene coordinación de tipo π con el Cu(I) unido (Xue y cols., 2008), y que se ha demostrado mediante mutagénesis sitio dirigida que no contribuye a una mayor afinidad por el metal, sino que probablemente protege al cobre de la oxidación y permite la transferencia del metal a CusB (Loftin y cols., 2009). De todas maneras, W₄₄ no se encuentra 100% conservado, ya que en algunas CusF se encuentra sustituido por metionina (Figura 3), por lo que la interacción de W₄₄ con el cobre parece no ser una interacción esencial para la función de CusF.

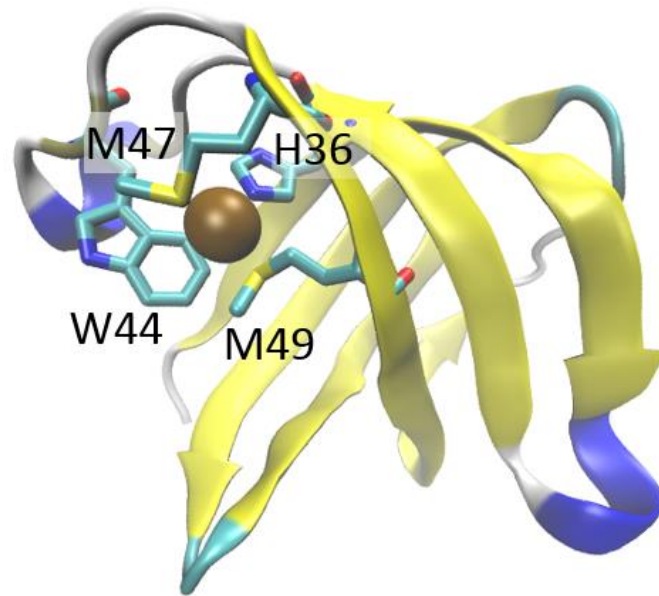


Figura 2. Modelo de la CusF de *E. coli*. La visualización corresponde a la estructura del cristal de la CusF de *E. coli* (PDB: 2VB2). Se señala su sitio de unión a cobre y se destacan los aminoácidos que interactúan directamente con el metal.

En *E. coli*, CusF entrega Cu(I) al sistema CusCBA interactuando directamente con CusB, interacción en la cual están implicados los aminoácidos M₂₁, K₃₂, M₃₆ y M₃₈ de CusB, donde los últimos 2 además participan en la unión a Cu(I) (Meir y cols., 2015). Por su parte, el cobre periplasmático tampoco se une libremente a CusF, ya que este se entrega directamente de CopA a CusF en una interacción entre las 2 proteínas dada por la superficie parcialmente electropositiva de CusF y por diversos aminoácidos cargados en loops periplasmáticos de CopA (Padilla-Benavides y cols., 2014).

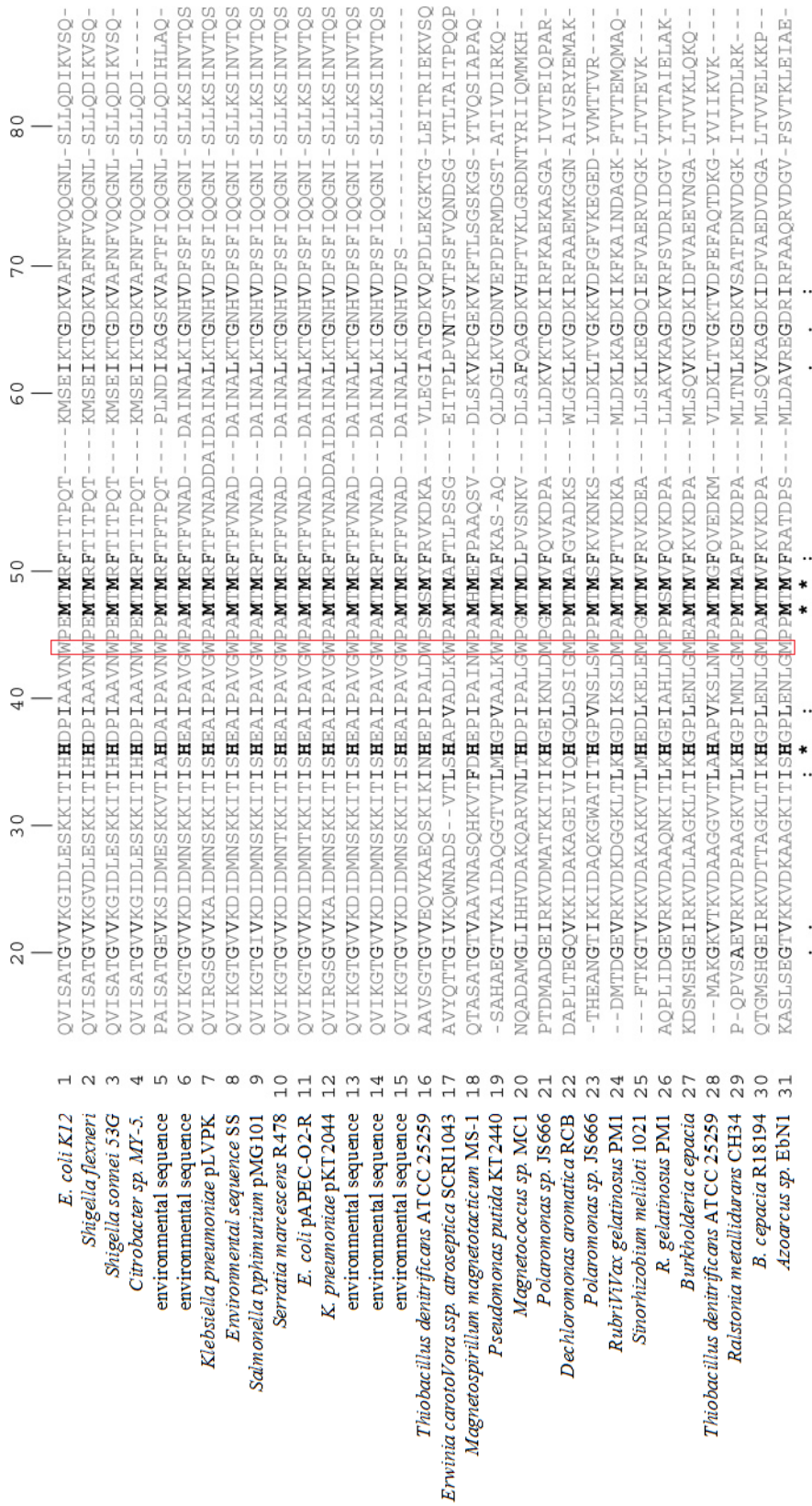


Figura 3. Alineamiento múltiple del sitio de unión a cobre de una selección de proteínas CusF. El alineamiento se realizó entre la secuencia de la CusF de *E. coli* y otras CusF homólogos encontradas mediante BLAST. Se destacan los aminoácidos más conservados en negrita y con asterisco de la posición 44 con un recuadro rojo. Figura adaptada desde Loftin y cols., 2005.

Hoy se tiene la certeza que CusF presenta una mayor afinidad por Cu(I) que por Cu(II) (Kittleson y cols., 2006), a pesar que inicialmente se pensó que CusF unía Cu(II) (Astashkin y cols., 2005). La mayor afinidad de CusF por Cu(I) coincide con el antecedente que las proteínas que unen Cu(I) presentan sitios de unión con bajo número de ligandos (2) de alta afinidad, como cisteína, o una cantidad superior de ligandos (3-4) de baja afinidad, como la metionina que presenta preferencia por Cu(I) (Rubino y Franz, 2012). Esto último ocurre en todas las proteínas del sistema Cus.

1.4 CusF en *A. ferrooxidans*

A. ferrooxidans es una bacteria acidófila que puede soportar altas concentraciones de diferentes metales pesados y en casos excepcionales puede resistir hasta 800 mM de CuSO₄. Posee diversas estrategias para resistir este metal, entre las que está la sobreexpresión y duplicación génica de los mismos determinantes de resistencia a cobre descritos para *E. coli* (Orell y cols., 2010). Específicamente, *A. ferrooxidans* ATCC 23270 posee 3 genes que codifican para ATPasas relacionadas al transporte de cobre, 3 genes que codifican para transportadores de la familia RND pertenecientes al sistema Cus (Navarro y cols., 2009; Almárcegui y cols., 2014) y 3 chaperonas periplasmáticas de cobre entre las que se encuentran 2 copias del gen *cusF*: *cusF1_{Af}* y *cusF2_{Af}* (Orellana y Jerez 2011). En cambio, la cepa ATCC 53993, que posee una mayor resistencia a cobre (> 100 mM) que la cepa ATCC 23270 (< 25 mM) posee en su genoma un operón adicional que codifica para 3 proteínas del sistema Cus. Este operón en la cepa ATCC 23270 se encuentra interrumpido por una transposasa, por lo que no se considera funcional. Además, la cepa ATCC 53993 posee en su isla genómica de 160 kb (ausente en la cepa

ATCC 23270) otra ATPasa relacionada al transporte de cobre, otro sistema Cus y 2 *cusF* adicionales, *cusF3_{Af}* y *cusF4_{Af}* (Orellana y Jerez 2011; Navarro y cols., 2013) (Figura 4).

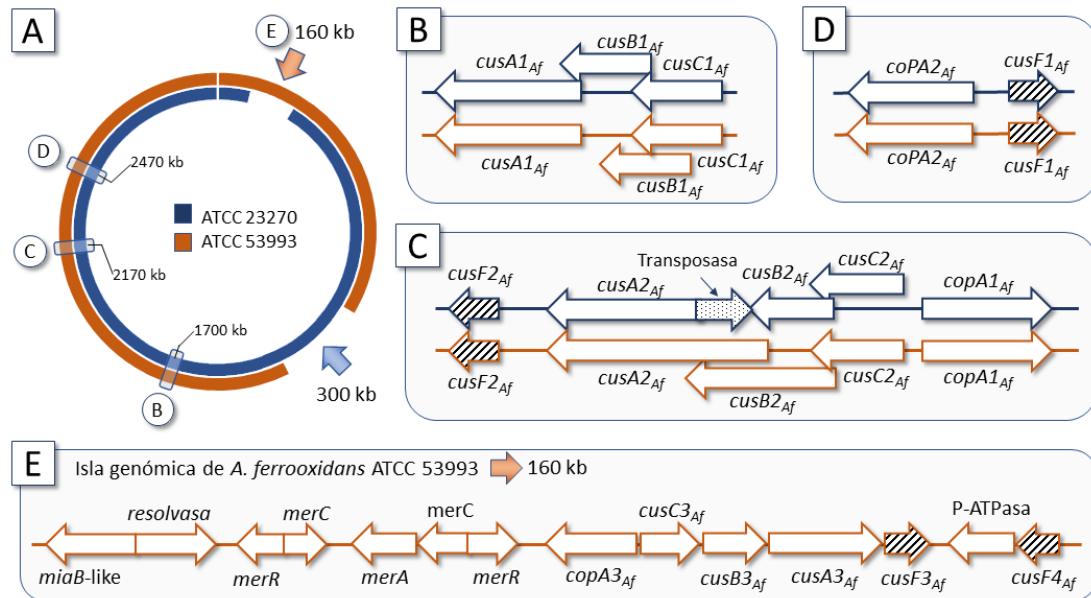


Figura 4. Contexto genómico de los genes implicados en la resistencia a cobre en las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993. A) Esquema general de los genomas alineados de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993, donde se señalan sus islas genómicas y la posición dentro de los genomas de los contextos genómicos mostrados en B-E. B-D) Contextos genómicos de los determinantes de resistencia a cobre comunes a ambas cepas. E) Contexto genómico de los genes presentes en la isla genómica exclusiva de la cepa ATCC 53993. Se destacan los genes *cusF*. Figura modificada y adaptada desde Orellana y Jerez, 2011.

Recapitulando, la cepa ATCC 23270 tiene en su genoma 2 genes que expresan la chaperona de cobre *cusF* (también presentes en ATCC 53993), *cusF1_{Af}* y *cusF2_{Af}*, mientras que la cepa ATCC 53993 posee adicionalmente 2 genes de *cusF* en su isla genómica, *cusF3_{Af}* y *cusF4_{Af}*. En la parte superior de la tabla 1 se resumen las características de las 4 *cusF* de la cepa ATCC 53993. *cusF1_{Af}* ha sido analizada funcional y transcripcionalmente en la cepa 23270 (Navarro y cols., 2009), y debido a que *cusF1_{Af}* es idéntica en ambas cepas, los análisis funcionales de *cusF1_{Af}* son aplicables también a la cepa 53993. El gen *cusF2_{Af}* sólo ha sido analizado en su expresión transcripcional

mientras que *cusF3_{Af}* y *cusF4_{Af}* se han analizado transcripcional y funcionalmente (Orellana y Jerez 2011; Martínez-Bussenius y cols., 2016). Adicionalmente, se han realizado análisis proteómicos cuantitativos para determinar los niveles de expresión proteica en células de la cepa ATCC 53993 crecidas a 40 mM CuSO₄ en comparación con el control sin cobre. Se encontró que la mayor sobreexpresión correspondió a las proteínas CusF2_{Af} y CusF3_{Af} (Martínez-Bussenius y cols., 2016). Las veces de cambio se encuentran detalladas en la parte inferior de la tabla 1.

Tabla 1. Características de los diferentes genes y proteínas *cusF* de *A. ferrooxidans* ATCC 53993.

Características generales				
Gen	Locus tag	GenBank	Tamaño	Ubicación
<i>cusF1_{Af}</i>	Lferr_2407	ACH84603.1	120 aa	Genoma
<i>cusF2_{Af}</i>	Lferr_2057	ACH84272.1	120 aa	Genoma
<i>cusF3_{Af}</i>	Lferr_0174	ACH82433.1	120 aa	Isla Genómica
<i>cusF4_{Af}</i>	Lferr_0199	ACH82458.1	124 aa	Isla Genómica
Funcionalidad y expresión génica				
Proteína	Veces de cambio MIC	Transcripción	Proteómica	
CusF1 _{Af}	~2 ^a	ND	NS ^c	
CusF2 _{Af}	ND	5-6 ^c	6,25 ^c	
CusF3 _{Af}	1,78 ^b	5-6 ^c	6,5 ^c	
CusF4 _{Af}	1,69 ^b	4-4,8 ^b	NS ^c	

En “Veces de cambio MIC” se detalla el número de veces que aumenta la MIC de cobre al clonar el gen indicado en *E. coli* ΔCusCFBA ΔCueO con respecto al control sin inducción. En “Transcripción” y “Proteómica” se indica el número de veces de cambio (del transcrito determinado por qPCR o la proteína determinada por ICPL, respectivamente) de la condición con cobre con respecto al control. ^aNavarro y cols., 2009. ^bOrellana y Jerez, 2011. ^cMartínez-Bussenius y cols., 2016. ND= No determinado. NS= No significativo.

En la proteína de *E. coli* se encuentra una histidina implicada directamente en la unión a cobre (H₃₆). En cambio, en las CusF de *A. ferrooxidans* existe una metionina en esta

posición de la proteína (M₆₆) (Figura 5). El sitio de unión a cobre de la CusF de *E. coli* es **H(X)₇W(X)₂MXMXF**, mientras que el de *A. ferrooxidans* es **M(X)₇W(X)₂MXMXF** (Navarro y cols., 2009). Esto implica que si la CusF de *A. ferrooxidans* tuviese la misma función que la CusF de *E. coli*, esta uniría cobre con 3 metioninas y no con 2 metioninas y 1 histidina. Esta variación está presente en todas las CusF de las dos cepas mencionadas de *A. ferrooxidans*.

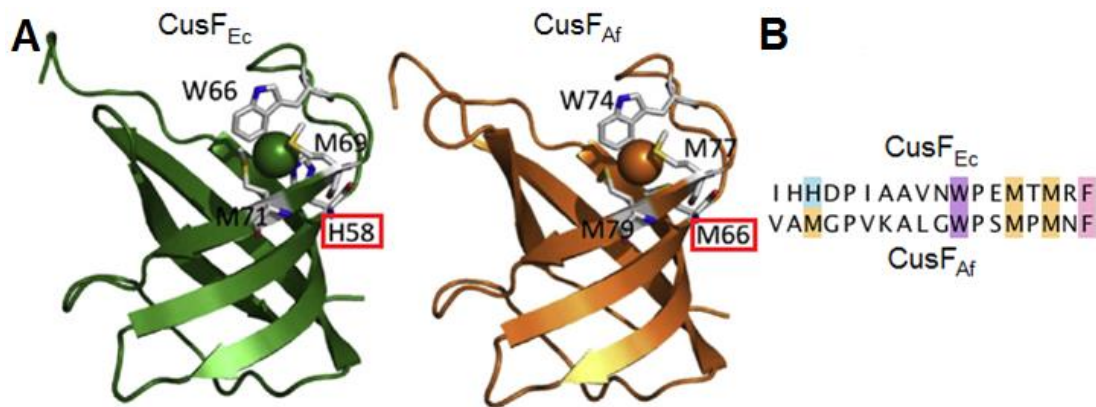


Figura 5. Comparación del sitio de unión a cobre de la CusF de *E. coli* y *A. ferrooxidans*. A) Comparación entre las estructuras tridimensionales de la CusF_{Ec}, obtenida por cristalización y la CusF_{Af}, obtenida por modelamiento por homología. Se señala el sitio de unión a cobre de ambas proteínas y se destaca el aminoácido en que difieren ambos sitios. Figura modificada desde Orell y cols., 2010. B) Comparación entre las secuencias del sitio de unión a cobre de la CusF_{Ec} y la CusF_{Af}.

Esta mutación resulta especialmente interesante, porque los sitios de unión a cobre que sólo contienen metionina presentan una mayor constante de disociación (menor afinidad) a cobre que aquellos que incluyen una histidina. Esto se determinó en un experimento en el que se le midió la constante de disociación de cobre a 3 péptidos sintéticos de la forma MG₂XG₂M, donde X corresponde a M, H o C (Rubino y cols., 2011). Sin embargo, en este experimento se determinó también que los sitios que sólo contienen metionina

presenta una mayor afinidad por cobre a pH ácido, ya que la cisteína y la histidina se encuentran protonadas a dichos valores de pH. De esta forma, en ambientes ácidos la histidina disminuye su afinidad por cobre de manera tal que a pH 4,5 la afinidad de la metionina por el cobre es mayor que la de la histidina (Rubino y cols., 2011). Se ha propuesto que en la CusF de *A. ferrooxidans*, esta sustitución de histidina por metionina podría deberse a una adaptación al ambiente ácido presente en el periplasma de *A. ferrooxidans* (Navarro y cols., 2009; Orell y cols., 2010). Por otro lado, también se ha descrito que la metionina junto con la cisteína tienen preferencia para unir Cu(I) mientras que la histidina prefiere Cu(II) (Rubino y Franz, 2012), por lo que también podría significar una mayor preferencia por el estado reducido del cobre Cu(I). Se ha encontrado que en la proteína Ctr1 que une cobre, basta con 3 residuos de metionina para observar unión a Cu(I) (Rubino y cols., 2010), por lo que, tomando en cuenta los antecedentes presentados, teóricamente este sitio hipotético de unión a cobre de la CusF de *A. ferrooxidans* debiese unir Cu(I).

En este trabajo de investigación se pretende analizar la CusF de *A. ferrooxidans*. Para ello, se seleccionará una de sus 4 CusF, se clonará y purificará esta proteína para luego medir su capacidad de unir cobre. Adicionalmente, se realizará una mutación en la metionina 66 (M₆₆) de esta proteína, la cual se alinea con la histidina H₃₆ de la CusF de *E. coli*, y en lo posible se investigará si esta mutación afecta la estabilidad de la unión al metal a pH ácido.

1.5 Objetivo general

Analizar bioinformáticamente el sitio de unión a cobre de la proteína CusF3 de *A. ferrooxidans* y determinar experimentalmente su capacidad de unir el metal.

1.6 Objetivos específicos

1. Analizar bioinformáticamente el sitio de unión a cobre de CusF en las bases de datos genómicas.
2. Amplificar el gen Lferr_0174 (*cusF3_{Af}*) desde el DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y clonarlo en el plasmidio de expresión pMAL-c5X mediante subclonamiento y posterior transformación en *E. coli*.
3. Realizar una mutación sitio dirigida en el gen *cusF3_{Af}* de metionina 66 por histidina en el plasmidio pMAL-c5X y purificar la versión silvestre y mutada de la proteína.
4. Medir la unión a cobre de ambas proteínas a pH ácido y neutro.

2. Materiales y métodos

2.1 Cepas y condiciones de cultivo

El clonamiento de los genes en plasmidios para la generación de clones se realizó utilizando la cepa DH5 α de *E. coli*, mientras que para la expresión de proteínas para su posterior purificación se utilizó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* (Invitrogen).

El medio de cultivo utilizado fue LB, que contiene, por litro, 10 g de triptona (Merck), 5 g de NaCL (Merck) y 5 g de extracto de levadura (Merck). Para cultivos líquidos, las condiciones utilizadas fueron 37°C de temperatura y agitación constante. Para cultivos en placa, el medio utilizado fue LB + 1,5% de agar bacteriológico (Amresco) con el correspondiente antibiótico. En el caso de ampicilina, se utilizó a una concentración final de 100 μ g/mL. Las placas se incubaron a 37°C sin agitación.

2.2 Plasmidios

Para la ligación de los productos de PCR y la generación inicial de clones se utilizó el plasmidio pGEM-T easy (Promega) que es un vector lineal que presenta timidinas individuales no apareadas en sus extremos 3' que impiden la recircularización y permiten la ligación con productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables como la Taq DNA polimerasa. Presenta además resistencia a ampicilina y un sitio de policlonamiento flanqueado por promotores de la RNA polimerasa T7 y SP6. Este sitio está inserto en el gen codificante para la β -Galactosidasa, lo que permite la selección de los clones recombinantes por inactivación insercional de este gen, dando a lugar a colonias blancas en vez de azules.

Para la expresión de las proteínas y su posterior purificación se utilizó el vector pMAL-c5X (NEB) que presenta río arriba del sitio de policlonamiento el gen *malE* que codifica para la MBP (maltose binding protein) que se expresa fusionada al gen insertado en el sitio de policlonamiento con el propósito de permitir la purificación de la proteína utilizando la afinidad de la MBP por maltosa. Este vector utiliza el promotor “tac” que permite una alta expresión de la proteína de fusión en el citoplasma. Contiene además resistencia a ampicilina y el gen *LacI* que codifica para el represor Lac, que mantiene baja la expresión del promotor “tac” en ausencia de IPTG, induciendo su expresión en presencia de este. En el extremo 5’ del sitio de policlonamiento se encuentra un sitio de clivaje para el factor Xa, que reconoce 4 aminoácidos (IEGR), lo que permite el corte de la proteína-fusión liberando la proteína de interés (Figura S1-A, material suplementario).

Los plasmidios utilizados en este trabajo se encuentran en la tabla 2.

Tabla 2. Plasmidios utilizados en este trabajo.

Plasmidio	Características	Referencia
pGEM-T Easy	f1 ori, <i>lacZ</i> , <i>bla</i> (Amp ^R)	Promega
pGEM-T Easy/ <i>Lferr_0174</i>	f1 ori, <i>lacZ</i> , <i>bla</i> (Amp ^R), <i>Lferr_0174</i>	Este trabajo
pMAL-c5X	pBR ori, P _{tac} , <i>lacI</i> ^q , <i>bla</i> (Amp ^R), <i>malE</i>	NEB
pMAL-c5X/ <i>Lferr_0174</i>	pBR ori, P _{tac} , <i>lacI</i> ^q , <i>bla</i> (Amp ^R), <i>malE:Lferr_0174</i>	Este trabajo
pMAL-c5X/ <i>Lferr_0174</i> _{M66H}	pBR ori, P _{tac} , <i>lacI</i> ^q , <i>bla</i> (Amp ^R), <i>malE:Lferr_0174</i> _{M66H}	Este trabajo

Se señalan: origen de replicación, promotor y/o represor, sistema de resistencia y el gen que contienen y/o que sobreexpresan.

2.3 Técnicas de biología molecular

2.3.1 PCR convencional

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Labnet Multigene en una reacción que contiene: 25 U/mL de Taq DNA polimerasa (NEB), amortiguador de reacción Taq 10x (NEB) a una concentración final 1x: 0,4 mM de dNTPs, 0,4 μ M de partidor “forward” y “reverse”, y una concentración variable de DNA templado (1-1000 pg/ μ L para DNA plasmidial y 1-8 ng/ μ L para DNA genómico, como concentración final) en un volumen final de 50 μ L.

El protocolo utilizado para la amplificación del gen Lferr_0174 fue: 5 min de desnaturalización a 94°C; 30 ciclos de: 20 s de desnaturalización a 94°C, 20 s de hibridización a 51°C y 30 s de elongación a 72°C; 10 min de elongación a 72°C. El producto de PCR se mantiene a -20°C hasta su uso.

2.3.2 Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización, separación y extracción de nucleótidos se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1%. La agarosa SeaKem® LE Agarose (Lonza) se disolvió en amortiguador TBE (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 10 mM, pH 8,0) al 1% p/v. Se utilizó GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) a una concentración de 1:20000 para visualizar los ácidos nucleicos. Las electroforesis se realizaron en una cámara Embi Tec RunOne™ Electrophoresis Cell a 100 V en TBE entre 20 y 40 minutos, dependiendo del tamaño del fragmento de DNA a visualizar.

Las muestras se prepararon agregándoles amortiguador de carga 6x (Tris HCl 10 mM pH 7,6; azul de bromofenol al 0,03%; EDTA 60 mM; glicerol al 60%). Como marcador de peso molecular se utilizó el marcador “1 Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen).

2.3.3 Extracción de DNA desde geles de agarosa

La extracción de los fragmentos de DNA desde geles de agarosa, ya sea para ligación, digestión u otro propósito se realizó con el UltraClean® 15 DNA Purification Kit (MO BIO) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante para geles con amortiguador TBE, utilizando agua nanopura para la elución final y cortando las bandas con bisturí. Para la purificación del DNA a ser utilizado en reacciones de ligación a plasmidios, se utilizó el menor volumen posible de agua nanopura para lograr una mayor concentración del producto.

2.3.4 Extracción total de nucleótidos: método “One step”

Para visualizar los ácidos nucleicos presentes en un clon de *E. coli* se procedió a romper las células por shock osmótico. Para ello, se colectaron las células presentes en un cultivo de 300 μ L crecido del día anterior mediante centrifugación y se suspendieron en 40 μ L de solución “One step” (sacarosa al 6%, Tris 50 mM, azul de bromofenol) agitando mediante vórtex. Para cultivos crecidos en placas de LB agar, se suspendió una cantidad equivalente de células picando con una punta estéril. A esto se le agregó 15 μ L de fenol:cloroformo básico (Winkler) agitando bruscamente mediante vórtex para mezclar ambas fases y luego se centrifugó por 4 min a 16000 \times g en una microcentrífuga. Los ácidos nucleicos en el sobrenadante se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Mediante este método se comprobó la presencia del plasmidio en cada clon, y en algunos casos se determinó la presencia de un inserto en el plasmidio al comparar su tamaño relativo al del plasmidio sin inserto.

2.3.5 Extracción de DNA plasmidial desde bacterias

Para extraer el DNA plasmidial desde clones bacterianos se utilizó el E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega) siguiendo el protocolo especificado por el fabricante, usando agua nanopura para la elución final en vez de amortiguador de elución.

2.3.6 Transformación de plasmidios en células quimiocompetentes

Para la transformación se utilizaron células quimiocompetentes preparadas creciendo células en un cultivo de 1 volumen de LB hasta una OD_{600} de 0,6. Las células se incubaron en 0,5 volúmenes de $CaCl_2$ 100 mM por 20 min y se almacenaron en 0,1 volúmenes de $CaCl_2$ 100 mM y glicerol estéril al 20% a $-80^{\circ}C$. Luego, 50 μL de estas células quimiocompetentes se incubaron en hielo por 20 min con 0,5 a 5 $ng/\mu L$ del plasmidio a transformar (para ligaciones de concentración desconocida, se utilizan 5 μL) y luego se sometieron a un shock térmico a $42^{\circ}C$ por 45 s. Antes de seleccionar transformantes en medio o placas con antibiótico, se incubaron durante 1 h en 1 mL de LB.

2.3.7 Digestión de fragmentos de DNA con enzimas de restricción

Se realizaron digestiones con enzimas de restricción con 2 propósitos. El primero fue comprobar la presencia de inserto en un plasmidio. Para ello, se digirieron 20-50 ng de plasmidio puro en un volumen total de 20 μL . El segundo fue digerir y purificar los

fragmentos de DNA para la posterior ligación de estos a vectores digeridos y purificados con el mismo método. Para esto, se digirieron hasta 1000 ng en un volumen total de 80 μ L para obtener la mayor cantidad posible de DNA.

En ambos casos, las digestiones se realizaron con hasta 500 U/mL de cada enzima de restricción (NEB) con el respectivo amortiguador de reacción 10x. Para encontrar el amortiguador adecuado se utilizó la herramienta web Double Digest Finder de NEB. La reacción se realizó incubando a 37°C por 1 h en baño termorregulado. Para digestiones dobles, se agregó la segunda enzima luego de transcurrido el tiempo y se incubó por 1 h adicional a la misma temperatura. Para el clonamiento del gen *Lferr_0174* en el plasmidio pMAL-c5X, las enzimas utilizadas fueron *Bam*HI y *Nde*I (NEB) y el amortiguador 3.1. Los productos de digestión se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

2.3.8 Cuantificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro Epoch (Biotek) con el protocolo “take3”, el cual utiliza gotas de 2 μ L para efectuar las mediciones, utilizando agua nanopura como blanco en cuadruplicado y midiendo cada muestra por duplicado.

2.3.9 Ligación de fragmentos de DNA

Para ligar los fragmentos de DNA a plasmidios abiertos se prepararon reacciones de volumen total de 10 μ L que contenían 20000 U/mL de DNA Ligasa T4 (NEB), 1:10 de amortiguador DNA Ligasa T4 10x (NEB), vector e inserto en una relación de entre 1:3 y

1:5 calculada con la herramienta NebBioCalculator (NEB) y completando el volumen con agua nanopura. Para la ligación de productos de PCR en pGEM-T, la cantidad de plasmidio utilizada fue siempre 25 ng.

2.3.10 Mutagénesis sitio-dirigida

Se utilizó la técnica SLIM (Site-directed, Ligase Independent Mutagenesis) para cambiar el aminoácido metionina 66 del gen *Lferr_0174* por histidina (Chiu y cols. 2004). Para ello se diseñaron 4 partidores descritos en la tabla 3 (sección 2.5.2) los cuales se usaron en una reacción de PCR que contenía: dNTPs 0,2 mM de cada dNTP; MgSO₄ 1 mM; DMSO 100 mM; 0,4 µM de cada uno de los 4 partidores; 1-1000 pg/µL de DNA plasmidial; 10 U/mL de PfuUltra II DNA Polymerase (Agilent); 20 U/mL de Taq DNA Polimerasa (NEB), amortiguador Pfx 10x (Agilent) y agua nanopura en un volumen final de 25 µL.

Luego, esta mezcla se sometió al siguiente protocolo en un termociclador: 1 ciclo de desnaturalización a 98°C por 2 min; 30 ciclos de: 15 s de desnaturalización a 95°C, 20 s de hibridización a 56°C, 3 min 30 s de elongación a 68°C; un ciclo de 7 min de elongación a 68°C. Luego, 20 µL de esta reacción se digirieron con *DpnI* para eliminar el DNA parental metilado en una reacción que contiene: 175 U/mL *DpnI* (Thermo Scientific), 1:10 de amortiguador “Tango” 10x (Thermo Scientific) y agua nanopura en un volumen total de 50 µL. Esta reacción se incubó a 37°C por 1 h y se detuvo agregando un volumen (50 µL) de amortiguador H (NaCl 300 mM, Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM, pH 8). Luego,

se realizó el siguiente programa en termociclador: desnaturalización a 95°C por 5 min seguido de hibridización en 2 ciclos de: 5 min a 65°C y 15 min a 30°C.

Los 100 µL de reacción se utilizaron en su totalidad para transformar células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes y el transformado se sembró en placas de LB agar con medio selectivo para seleccionar las colonias transformantes.

2.4 Métodos Bioinformáticos

Para realizar búsquedas por homología de secuencia del gen *Lferr_0174* se utilizó la herramienta BLAST (Altschul y cols., 1990) con el algoritmo Blastp. También se utilizó la herramienta primer BLAST para comprobar la especificidad de los partidores diseñados. Se utilizó la herramienta Uniprot (UniProt Consortium, 2014) para obtener las características (Tamaño en aa, peso molecular y presencia de péptido señal) y la secuencia completa de las proteínas encontradas.

Los alineamientos múltiples de las distintas CusF y otras proteínas analizadas se realizaron mediante la herramienta Clustal Omega (Sievers y Higgins, 2014).

Para calcular la carga teórica de las proteínas analizadas a diferentes valores de pH se utilizó la herramienta web Protein Calculator v3.4 (protecalc.sourceforge.net).

Los modelamientos por homología se realizaron utilizando el programa modeller 9.17 y las estructuras obtenidas se visualizaron con el programa Visual Molecular Dynamics 1.9.2 (VMD).

2.4.1 Análisis del sitio de unión a cobre de CusF

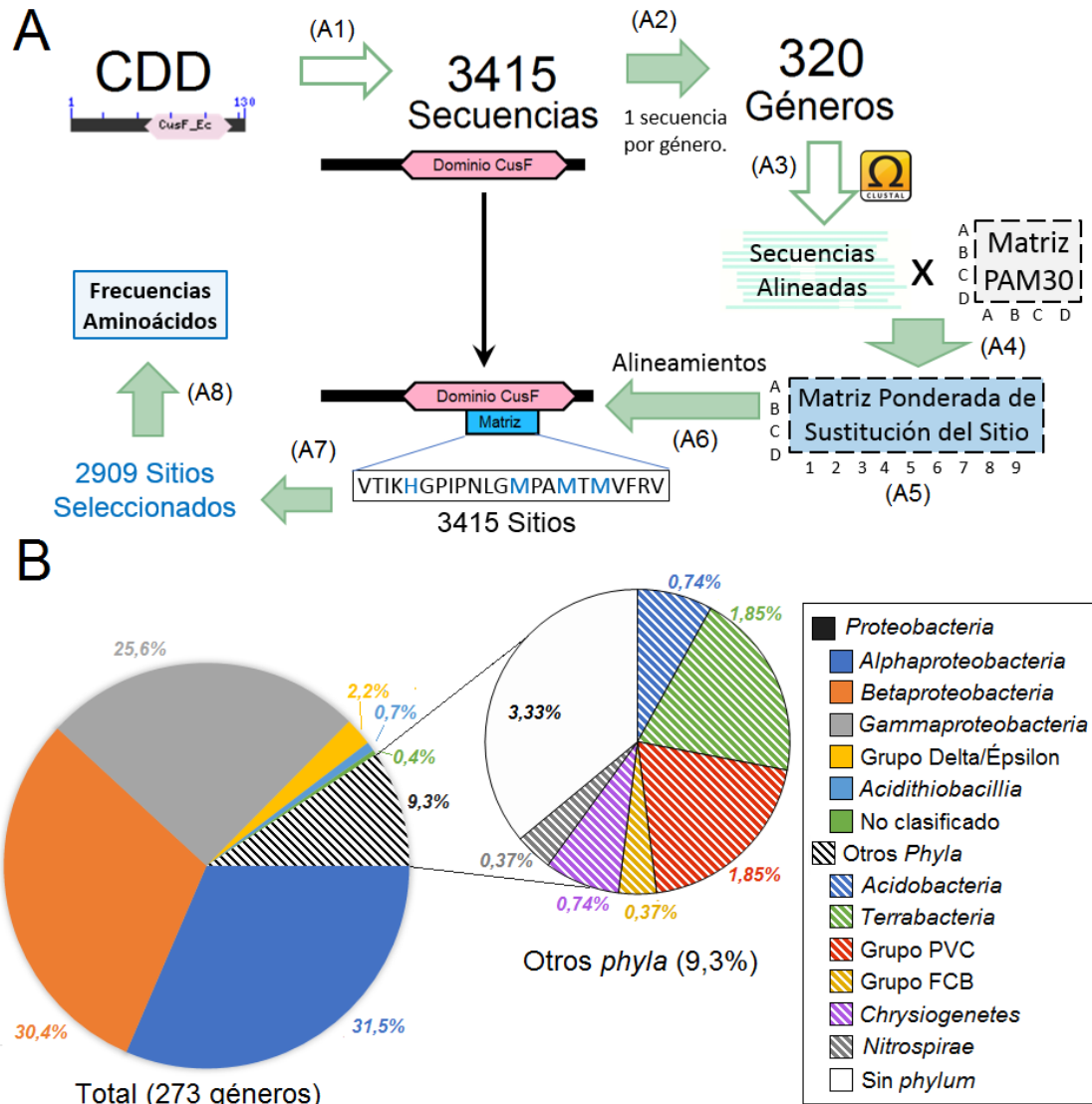


Figura 6. Análisis bioinformático del sitio de unión a cobre de CusF. A) Diagrama de flujo del procedimiento realizado para el análisis del sitio de unión a cobre. Las flechas opacas corresponden a acciones realizadas mediante el lenguaje de programación Processing. Se señalan sus partes con números entre paréntesis. B) *Phyla* y clases a las que pertenecen los distintos géneros utilizados en la creación de la matriz del sitio de unión a cobre de CusF.

Se realizó un análisis bioinformático para encontrar la frecuencia de aminoácidos del sitio de unión a cobre de CusF. El procedimiento realizado está esquematizado en la figura 6-

A. Utilizando la herramienta CDD (Conserved Domain Database) se descargaron todas

las secuencias de proteínas que tienen exclusivamente el dominio CusF (3415 secuencias) (Figura 6-A1) las que se utilizaron para realizar una matriz de sustitución del sitio de unión a cobre de CusF por posición, es decir, una matriz que por cada posición del sitio de unión a cobre contenga un puntaje de sustitución para ser utilizada en alineamientos (Figura 6-A5). Para ello, se seleccionó arbitrariamente una CusF por género (320 géneros) (Figura 6-A2) y se realizó un alineamiento múltiple entre ellas (Figura 6-A3). En base a los géneros que sí alinearon correctamente su sitio de unión a cobre (273 géneros) se obtuvo la frecuencia general de cada aminoácido por cada posición del sitio conservado de unión a cobre, para lo que consideraron los aminoácidos entre la posición 32 y 53. Luego, se generó una matriz de sustitución ponderando la matriz PAM30 por esta frecuencia (Figura 6-A4). La matriz resultante (Figura 6-A5) posee el puntaje de sustitución para cada aminoácido en cada posición del sitio de unión a cobre. Los distintos *phyla* y clases a las que pertenecen los géneros de las secuencias utilizadas se encuentran indicados en la figura 6-B.

Utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch, se realizaron alineamientos de la matriz de sustitución del sitio de unión a cobre con todas las secuencias descargadas originalmente (las 3415 secuencias) (Figura 6-A6). Esto se realizó con el objetivo de encontrar el sitio de unión a cobre en cada CusF y se llevó a cabo con un programa realizado en el lenguaje de programación Processing (processing.org). Luego de seleccionar todas las CusF con un alto puntaje de alineamiento y que teóricamente unieran cobre, es decir, que presenten 3 o más aminoácidos esenciales para la unión a cobre en el bolsillo de unión al metal (2909 secuencias) (Figura 6-A7), se determinó la frecuencia de

aminoácidos en cada posición y todas las sustituciones de los aminoácidos más conservados (Figura 6-A8).

2.5 Clonamiento

2.5.1 Diseño de oligonucleótidos

Para clonar el gen *cusF3_{Af}* se diseñaron partidores que flanquean y amplifican este gen. En el extremo 5' de los partidores se añadió un sitio de restricción que permite su clonamiento en el plasmidio pMAL. Considerando la posición de los sitios de restricción en su sitio de policlonamiento (Figura S1-B, Material Suplementario) y la disponibilidad de enzimas de restricción se seleccionaron las enzimas *NdeI* para el partidor “forward” y *BamHI* para el partidor “reverse”. Una vez diseñados, se analizaron los partidores mediante primer BLAST para comprobar su especificidad utilizando los genomas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y *A. ferrooxidans* ATCC 23270 como base de datos.

Para realizar una mutación sitio-dirigida se diseñaron 4 partidores (Chiu y cols. 2004) para crear mutaciones por alteración de la secuencia. Para esto, los partidores flanquean el sitio a mutar, pero en sentido inverso, donde el partidor “forward” está ubicado río abajo del sitio a mutar y el partidor “reverse” está río arriba. Dos de los partidores presentan un adaptador de 18 pb en su extremo 5' que contiene la mutación a realizar. Adicionalmente, se diseñó un partidor “reverse” que hibrida exclusivamente con el sitio mutado.

Todos los partidores se diseñaron con la ayuda de la herramienta Oligo Analyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies), procurando que la diferencia de T_m entre los partidores utilizados en la misma reacción no fuera mayor a 3°C y que no exista dimerización o

formación de “hairpins” entre ellos, para lo que se introdujeron mutaciones silenciosas en los partidores. La Tm de los partidores se calculó sólo con la parte que hibrida al gen. Los partidores utilizados se encuentran señalados en la tabla 3. Los oligonucleótidos se sintetizaron por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies).

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Uso
CusF3pMAL_Fw	CATATGACAGGGAATATGCCGGGCATG GAC	Clonamiento
CusF3pMAL_Rv	GGATCCTCATTGTCTGACCGGCGTGATC CTAG	Clonamiento
CusFSLIM_Fw	GTCAAGGCCCTTGGCTGGC	Mutagénesis
CusFSLIM_Rv	GACCATGTTTCGCAGCGGGATTG	Mutagénesis
CusF3SLIM_M66HFw	AATGTGGCACATGGTCCCGTCAAGGCC CTTGGC	Mutagénesis
CusF3SLIM_M66HRv	GGGACCATGTGCCACATTGACCATGTT CGCAGCGGG	Mutagénesis
CusF3SLIMChkRv	GGGACCATGTGCCACATT	Chequeo

En los partidores de clonamiento se destaca el sitio de corte por la enzima de restricción, y en los de mutagénesis se destaca la “cola” que se extiende hacia el extremo 5’ y donde se encuentra la mutación. El uso denominado “Chequeo” se refiere a la comprobación de la mutación sitio-dirigida mediante PCR.

2.5.2 Generación y selección de clones

Para seleccionar clones desde un cultivo líquido se sembró una alícuota de este en LB agar con el antibiótico correspondiente y se incubó hasta el día siguiente a 37°C. Una vez formadas las colonias, se picaron las más aptas utilizando una punta estéril y se realizó un rayado con cada una en otra placa con las mismas características, hasta un máximo de 8 rayados. En el caso de transformación en pGEM-T, se utilizaron placas que contenían

IPTG 1mM y X-gal 20 µg/mL y se seleccionaron las colonias blancas para luego realizar los respectivos rayados con cada colonia.

2.5.3 Estrategia de clonamiento

El gen Lferr_0174 de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 se amplificó a partir de su DNA genómico mediante PCR. El producto obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, y se aisló la banda correspondiente al gen (299 nucleótidos teóricamente). Este producto de PCR se ligó directamente al vector pGEM-T para amplificar clonalmente el gen y permitir su digestión por enzimas de restricción. Luego, el ligado se transformó en *E. coli* DH5α quimiocompetentes y se generó una colección de clones a partir de colonias blancas. A uno de ellos se le extrajo su DNA plasmidial y mediante digestión con *BamHI* y *NdeI* y visualización mediante electroforesis en gel de agarosa se comprobó la presencia del inserto al escindir una banda del tamaño esperado (alrededor de 300 pb).

El DNA presente en esta banda (gen Lferr_0174) se digirió con *BamHI* y *NdeI* y se purificó para luego ligarlo al vector pMAL-c5X digerido con las mismas enzimas y purificado con el mismo método. El producto de ligación se transformó en *E. coli* DH5α y se generaron clones, los cuales se analizaron para comprobar la presencia del plasmidio y del inserto. A los clones que cumplían esa característica se les extrajo su DNA plasmidial.

2.6 Técnicas de proteínas

2.6.1 Extracción total de proteínas para su análisis por SDS-PAGE

Las proteínas totales extraídas de un clon de *E. coli* se separaron por SDS-PAGE. Para ello, se realizaron cultivos de 1 a 5 mL crecidos desde el día anterior y se resuspendieron los pellets celulares en solución de sonicación (Tris-HCl 10 mM pH 7 y PMSF (Calbiochem) 1mM para inhibir la actividad proteasa) en 1:10 del volumen del cultivo. Para colectar las células desde los cultivos, estos se centrifugaron a $10000 \times g$ por 1 min para cultivos de 1 mL y a $3200 \times g$ por 10 min para cultivos de 5 mL.

El pellet resuspendido se sometió a sonicación (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole Parmer) dando pulsos de 10 a 20 s con un 60% de potencia al iniciar y un 80% al terminar la sonicación, manteniendo los tubos fríos con hielo durante todo el proceso. En caso de ser necesario, se separaron los cuerpos de inclusión centrifugando a $16000 \times g$ por 20 min a 4°C , donde sedimentan los cuerpos de inclusión y las proteínas insolubles. De ser necesario, los cuerpos de inclusión se resuspendieron en 1:100 del volumen original de agua nanopura. Los extractos proteicos se guardaron a 4°C hasta su utilización.

2.6.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford utilizando el reactivo Protein kit (Merck) y utilizando una curva de BSA como standard de proteínas. Se agregaron 5 μL de proteína en 200 μL de reactivo Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro Epoch (BioTek) utilizando una curva standard en el rango

lineal de concentraciones. Para concentraciones bajas de proteína se utilizaron 10 μ L en vez de 5.

2.6.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para visualizar las proteínas de una muestra, estas se prepararon agregando amortiguador de carga de proteínas 4x (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8, SDS al 6%, glicerol al 30%, β -mercaptoetanol al 15%, y azul de bromofenol al 0,06%), 1:4 del volumen final y calentando a 95°C por 10 min en baño seco AccuBlock™ Digital Dry Bath (LabNet) y centrifugando por 5 s para recolectar el volumen condensado en las paredes del tubo.

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% diluyendo acrilamida-bisacrilamida al 30%-0,8% respectivamente en una solución que contiene: glicerol al 1%, TEMED (Bio-Rad) al 0,05%, PSA al 0,05%, SDS al 0,1%, Tris-HCl 375 mM pH 8,8 y agua nanopura en un volumen final de 5 mL para el gel separador. La solución se dejó polimerizando a temperatura ambiente en un molde para geles de poliacrilamida de 1 mm de ancho (Bio-Rad) agregando 300 μ L de isopropanol sobre la solución para evitar contacto con el aire. El gel concentrador se preparó a una concentración final de: acrilamida al 5,1%, TEMED al 0,16%, PSA al 0,06%, SDS al 0,1%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8 y agua nanopura en un volumen final de 2,5 mL. La solución se dejó polimerizar a temperatura ambiente sobre el gel separador tapada por una peineta plástica de 1 mm (Bio-Rad).

Las muestras se aplicaron en conjunto con el marcador de peso molecular Perfect Protein (Novagen). La electroforesis se llevó a cabo a 75 V por 35 a 45 min para el gel concentrador y a 150 V por 45 a 60 min para el gel separador en solución de electroforesis

(glicina 192 mM, Tris HCl 25 mM pH 8,4 y SDS al 0,1%) en una cámara Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad). Luego de la electroforesis, el gel se fijó durante 20 min en solución de fijación (etanol al 40% y ácido acético al 10%) y se dejó teñiendo en solución de tinción de geles de poliacrilamida (sulfato de amonio al 17%, etanol al 34%, ácido acético al 0,5% y coomasie blue G-250 (Merck) al 0,1%) hasta el día siguiente. El gel ya teñido se destiñó utilizando agua destilada.

2.6.4 Purificación de proteínas

Las proteínas MBP, MBP:CusF3_{WT} y MBP:CusF3_{M66H}, se expresaron a partir de clones de pMAL-c5X: pMAL-c5X, pMAL-c5X/*Lferr_0174* y pMAL-c5X/*Lferr_0174*_{M66H} (Tabla 2, sección 2.2), respectivamente. Estos clones se crecieron en 100 mL de medio LB con selección (ampicilina a 100 µg/mL) y agitación a 37°C. Se inició la inducción con IPTG 0,5 mM (Calbiochem) cuando la OD₆₀₀ del cultivo era 0,1 y se mantuvo la inducción hasta el crecimiento total de este (5 h aproximadamente). Las células se centrifugaron a 3200 × g por 20 min y se resuspendieron en 10 mL de amortiguador de columna (NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM pH 7,4). Luego se sonicaron en un sonicador Q500 (Qsonica) con pulsos de 10 s a un 20% de potencia y entre 8 y 15 s de descanso por 20 min o hasta que se observó lisis celular completa, en un tubo de 50 mL (Falcon) fijado en un baño de hielo.

Las células lisadas por sonicación se centrifugaron a 3200 × g por 10 min para sedimentar los restos celulares y las células no rotas. Luego, el extracto celular se centrifugó a 16000

× g por 20 min para sedimentar los cuerpos de inclusión. El sobrenadante se llevó a un volumen total de 15 mL agregando amortiguador de columna.

Las proteínas fusionadas a MBP se purificaron mediante columna de afinidad de resina de amilosa (Merck) en una Columna de 0,8 x 4 cm (Bio-Rad) utilizando 1 mL de resina. Luego de empacar la columna con 5 mL de amortiguador de columna, se pasó por ella el extracto total, siempre cuidando que no se seque la columna. Luego de lavarla con 12 mL de amortiguador de columna, ésta se eluyó con amortiguador de elución (amortiguador de columna + maltosa 10 mM), colectando en fracciones de aproximadamente 200 µL (1:5 del volumen de la columna) e inmediatamente utilizando 5 µL de la fracción para un ensayo Bradford hasta que no se observó proteína en las fracciones de elución.

Las fracciones que contenían más de 0,1 mg/mL de proteína se juntaron y diluyeron en 1 volumen de glicerol a una concentración final de 50% de glicerol para ser almacenadas a -20°C. Se cuantificaron mediante el método de Bradford.

2.6.5 Incubación con cobre y diálisis

La incubación de las distintas proteínas con cobre y posterior diálisis se realizó a pH 7 y a pH 4,5. Para pH 7, el método utilizado se adaptó de Franke y cols., 2003. Se llevaron las proteínas purificadas a una concentración final de 15 µM en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7 en un volumen final de 500 µL. Cada una de las 3 proteínas purificadas se incubó en presencia de 0,5 mM de CuCl₂, y para cada una se realizó también un control sin cobre. Esta incubación se realizó por 1 h a 4°C. Luego, para cada condición, la muestra se dializó en bolsas de diálisis de 10 mm de diámetro que retienen las moléculas con peso

molecular superior a 14 kDa (SPECTRAPOR) en 500 mL de Tris-HCl pH 7 en 2 vasos precipitados, uno para las incubaciones con cobre y otro para las sin cobre (controles). El volumen de la solución externa es 1000 veces superior al volumen de cada bolsa, pero al ser 3 bolsas por vaso, el volumen externo es 300 veces el volumen total de las bolsas. Para eliminar el cobre unido, se realizaron 4 diálisis para cada condición, de al menos 2 h cada una antes del cambio de solución externa (3 cambios en total), donde una de las diálisis fue por toda la noche. Estas diálisis se realizaron a 4°C, temperatura que fue monitoreada por un sensor LM35 y agitadas mediante agitadores magnéticos.

Para el ensayo a pH 4,5, las condiciones fueron similares, excepto que se usó amortiguador citrato-ácido cítrico a una concentración de 10 mM (la suma de la concentración del ácido cítrico y el citrato es 10 mM) y que las proteínas, antes de ser incubadas con cobre, se adaptaron a pH 4,5 mediante diálisis sucesivas. Para esto, las proteínas se llevaron primero a una concentración de 15 µM en 1 mL de citrato-ácido cítrico 10 mM pH 6 e incubaron por 1 h a 4°C. Luego se dializaron en amortiguador citrato-ácido cítrico 10 mM pH 5,2 a 4°C con agitación magnética por 2 h y luego a pH 4,5 por la noche (1 cambio de solución). Las concentraciones de cada amortiguador citrato-ácido cítrico se encuentran en la tabla 4. Luego, el volumen de cada proteína adaptada a pH 4,5 se alicuotó en 2 volúmenes iguales, donde a uno de ellos se le agregó CuCl₂ y al otro no. Se procedió de forma análoga que a pH 7 usando citrato-ácido cítrico 10 mM pH 4,5 como solución de diálisis.

Las muestras dentro de las bolsas de diálisis (12 en total) se recuperaron y almacenaron a -20°C realizando 4 réplicas para cada una. Se les midió la concentración de proteína

después de la diálisis mediante el método de Bradford realizando 4 mediciones para cada una de las réplicas. Las condiciones de diálisis se encuentran especificadas en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de los experimentos de incubación de las proteínas con cobre y su posterior diálisis.

N°	Nombre	Proteína	0,5 mM CuCl ₂	Amortiguador
1	MBP	MBP	+	Tris HCl 10 mM, pH 7
2	CusF3 _{WT}	MBP:CusF3 _{WT}		
3	CusF3 _{M66H}	MBP:CusF3 _{M66H}		
4	MBP control	MBP	-	
5	CusF3 _{WT} control	MBP:CusF3 _{WT}		
6	CusF3 _{M66H} control	MBP:CusF3 _{M66H}		
7	MBP	MBP	+	Citrato-ácido cátrico 10 mM pH 4,5
8	CusF3 _{WT}	MBP:CusF3 _{WT}		
9	CusF3 _{M66H}	MBP:CusF3 _{M66H}		
10	MBP control	MBP	-	
11	CusF3 _{WT} control	MBP:CusF3 _{WT}		
12	CusF3 _{M66H} control	MBP:CusF3 _{M66H}		

Las columnas “Proteína”, “Amortiguador” y “CuCl₂” corresponden a condiciones presentes durante la incubación. Para la diálisis se utilizó la solución presente en “Amortiguador” como solución externa. Las incubaciones fueron llevadas a cabo a pH 7 (condiciones 1-6) y pH 4,5 (condiciones 7-12). En cada una de las condiciones a pH 7 y 0,5 mM de CuCl₂ se realizaron 4 réplicas, y en las sin CuCl₂ se realizaron 2 réplicas.

2.6.6 Medición de cobre unido a proteínas

El cobre que se mantuvo dentro de la bolsa de diálisis se midió mediante el método colorimétrico con ácido bicinconínico (BCA) adaptado de Brenner y Harris 1995 basado en que el BCA se une de forma divalente al cobre formando un complejo que presenta peak de absorbancia a 359 nm. 100 µL de muestra se diluyeron con 35 µL de solución A (TCA al 30%) y se centrifugaron por 2 min a máxima velocidad para precipitar las

proteínas. Luego, a 100 μL del sobrenadante se les agregó 5 μL de solución B (ácido ascórbico al 0,9%) y 150 μL de solución C (BCA (Sigma-Aldrich) 170 μM , NaOH 1M y HEPES 0,7M). Se utilizaron 200 μL de la reacción para medir su absorbancia a 359 nm en el espectrofotómetro Epoch (BioTek).

Para cada pH analizado (7 y 4,5), la solución externa de la última diálisis (Tris-HCl 10 mM pH 7 y citrato-ácido cítrico 10 mM pH 4,5 respectivamente) se recuperó y utilizó como blanco en la medición de cobre. En ambas, se creó una curva standard de cobre con 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30 y 50 μM CuCl_2 diluido en la respectiva solución de diálisis y se realizó un ajuste lineal para calcular las concentraciones de cobre dentro de cada bolsa de diálisis.

En cada muestra, para cada una de las 4 réplicas se obtuvo la relación cobre/proteína dividiendo la concentración de cobre (μM) por el promedio de las 4 mediciones de concentración de proteína (μM). Luego, se calculó el promedio de las relaciones cobre/proteína, la desviación standard y se realizó una prueba estadística t-Student para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras.

3. Resultados

3.1 Análisis del sitio de unión a cobre de CusF

Para establecer si la mutación observada en la CusF de *A. ferrooxidans* corresponde a una mutación común se determinó la frecuencia de sustitución de cada posición en el sitio conservado de unión a cobre de CusF, analizando 2909 secuencias de los genomas de bacterias pertenecientes a 282 géneros (Figura 7).

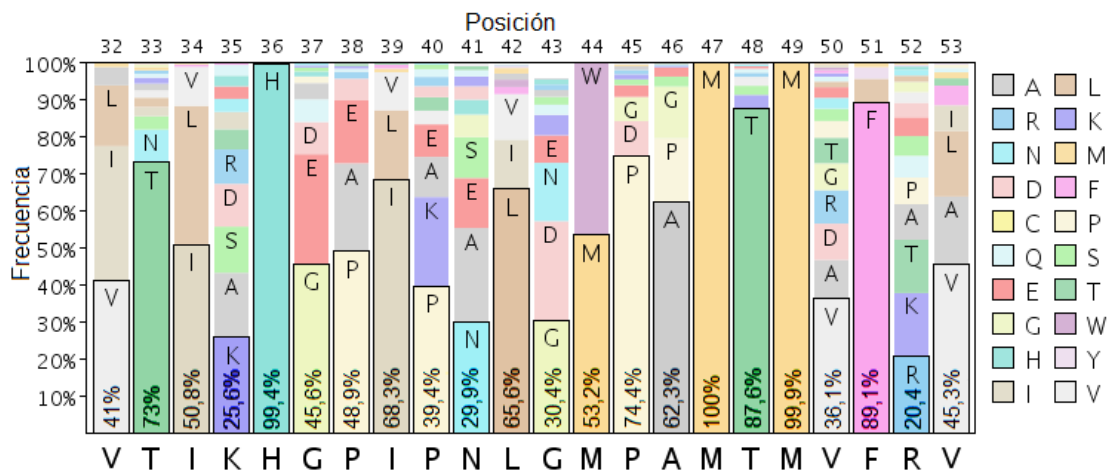


Figura 7. Nivel de conservación de aminoácidos del sitio de unión a cobre de las proteínas CusF. En cada posición, las barras se encuentran ordenadas de mayor a menor de acuerdo al porcentaje de proteínas que presentan dicho aminoácido en esa posición del sitio de unión a cobre de CusF, donde la barra inferior corresponde al aminoácido más conservado y se señala explícitamente su porcentaje de conservación.

La metionina M₄₇ de CusF se encuentra 100% conservada en aquellas CusF que teóricamente unen cobre, mientras que existen sustituciones en M₄₉ y H₃₆ (Figura 7). Algo interesante de notar, es que en la posición 44 el aminoácido más abundante no es triptófano, sino que metionina.

En cuanto a las sustituciones en los aminoácidos más conservados, en la posición de la histidina H₃₆ se encontraron 19 sustituciones, entre ellas, sustituciones por arginina, prolina y serina en 1 secuencia cada una, por tirosina en 2 secuencias y por metionina en 14. De las 14 secuencias en que se encontró un cambio por metionina, 13 son del género *Acidithiobacillus* (4 de *A. ferrooxidans*, 5 de *A. ferrivorans*, 1 de *A. caldus*, 1 de *A. thiooxidans* y 2 sin especie) y 1 descrita como de *Bacteria* (multiespecie), la cual presenta un 98% de identidad con una CusF de *A. thiooxidans*. En la posición M₄₉ se encontraron 2 secuencias con sustitución por isoleucina, ambas pertenecientes a la especie *Methylocystis sp.* Por último, se encontró que, entre todas las secuencias con sustitución en T₄₈ (162), la única que presenta sustitución por prolina es la CusF1 de *A. ferrooxidans*. Esto es interesante, debido a que este aminoácido produce un quiebre en la estructura secundaria, al mismo tiempo que su estructura es más rígida que la de otros aminoácidos en esta posición, lo cual podría influir en la estructura del sitio de unión a cobre.

3.2 Selección de la CusF a analizar

Se realizó un alineamiento múltiple de las CusF de *A. ferrooxidans* y la CusF de *E. coli* (Figura 8), donde se observa el reemplazo de la histidina H₃₆ de *E. coli* por metionina en las CusF de *A. ferrooxidans* (posición 70 del alineamiento). Todas las CusF de *A. ferrooxidans* tienen aminoácidos idénticos en el sitio de unión a cobre (Entre la posición 64 y 81 según la numeración de la CusF1_{Af}) excepto por una prolina en la CusF1_{Af} entre las 2 metioninas más cercanas (M₇₇ y M₇₉). La CusF4_{Af}, a diferencia de las otras, posee 4 aminoácidos adicionales generando un gap en el alineamiento.

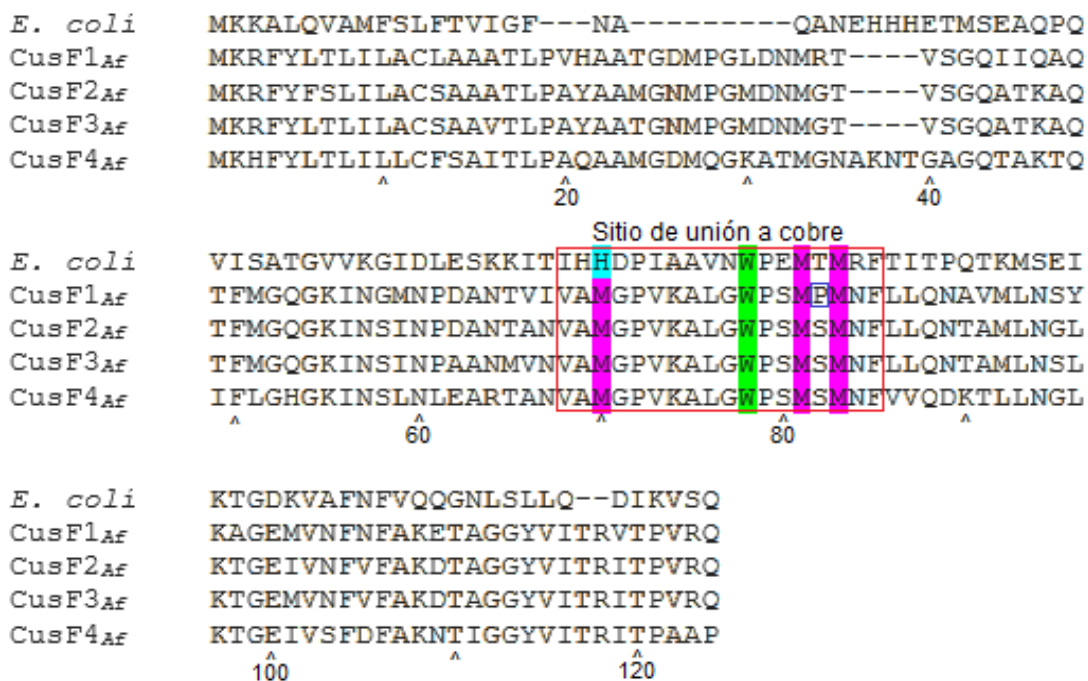


Figura 8. Alineamiento múltiple de las CusF de *A. ferrooxidans* y la CusF de *E. coli*. Se encuentra destacado el sitio de unión a cobre con un rectángulo rojo. Dentro de él se destacan los aminoácidos que forman el bolsillo de unión a cobre: en celeste las histidinas, en amarillo las metioninas y en verde los triptófanos. Se destaca con un recuadro azul la prolina presente en la secuencia de la CusF1_{Af}.

En la tabla 5 se observa que la CusF4_{Af} es la más diferente al resto de las CusF, seguida por la CusF1_{Af}. Considerando estos factores, y que las CusF2_{Af} y CusF3_{Af} se sobreexpresan en presencia de cobre (Martínez-Bussenius y cols., 2016), la CusF1_{Af} y CusF4_{Af} fueron descartadas como opción para ser analizadas. Entre la CusF2_{Af} y la CusF3_{Af} se eligió la CusF3_{Af} para ser clonada, ya que el gen que la expresa es parte de la isla genómica que le confiere a *A. ferrooxidans* ATCC 53993 resistencia adicional a cobre (Orellana y Jerez, 2011).

Tabla 5. Porcentaje de identidad de los aminoácidos entre cada una de las CusF de *A. ferrooxidans*.

Lferr..	Proteína	CusF1 _{Af}	CusF2 _{Af}	CusF3 _{Af}	CusF4 _{Af}
_2407	CusF1 _{Af}	100%	-	-	-
_2057	CusF2 _{Af}	78%	100%	-	-
_0174	CusF3 _{Af}	81%	93%	100%	-
_0199	CusF4 _{Af}	60%	68%	65%	100%

Los colores indican grado de identidad: negro es más idéntica y rojo es menos idéntica.

3.3 Clonamiento

3.3.1 Subclonamiento en pGEM-T

El gen Lferr_0174 se amplificó por PCR desde el DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 53993. El producto obtenido se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% (Figura 9-A). A partir de este gel se aisló y se purificó la banda correspondiente al DNA que contiene el gen Lferr_0174 (299 pb). Luego, se ligó el DNA obtenido al vector pGEM-T y el plasmidio resultante se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α generándose diferentes clones. A partir de estos, se eligió una de las colonias blancas, se purificó su DNA plasmidial y mediante digestión con *NdeI* y *BamHI* y posterior visualización en gel de agarosa al 1%, se comprobó la presencia de un inserto de aproximadamente 300 pb en el plasmidio (Figura 9-B).

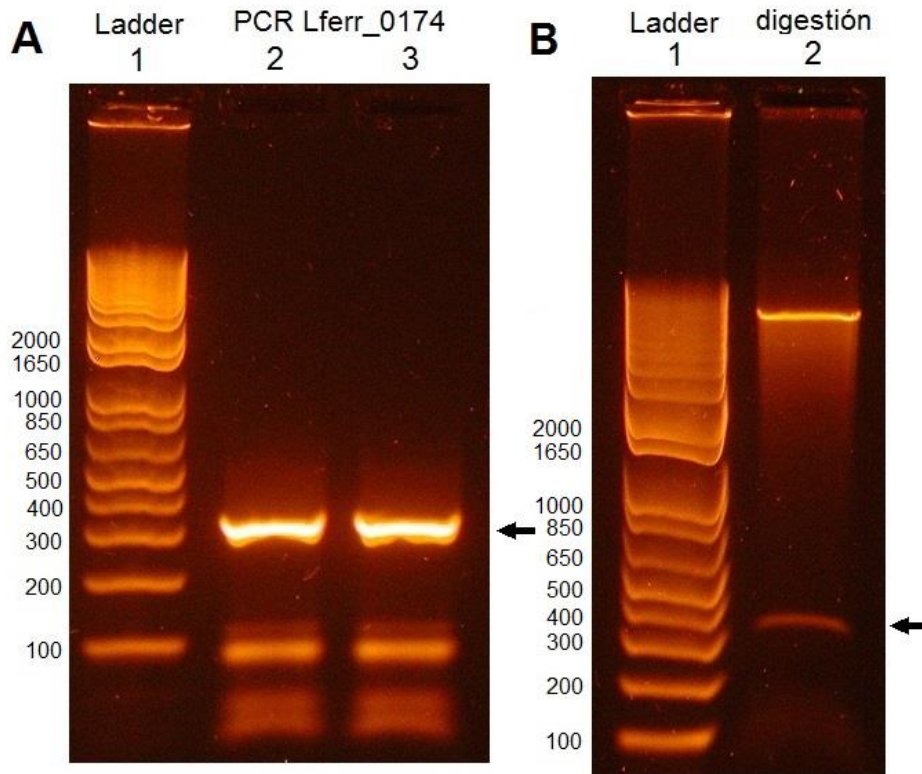


Figura 9. Subclonamiento del gen Lferr_0174 en pGEM-T. Análisis mediante electroforesis en gel de agarosa. A) Producto de amplificación por PCR del gen Lferr_0174 (carriles 2 y 3), donde se señala (flecha) la banda del tamaño esperado a ser purificada. A cada carril se aplicaron 25 μ L de muestra. B) Producto de digestión de pGEM-T/Lferr_0174 con *NdeI* y *BamHI* para comprobar la presencia del inserto. La flecha indica la banda escindida del tamaño esperado. Se aplicaron 20 μ L de muestra. Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) con los tamaños señalados (carril 1).

3.3.2 Clonamiento en pMAL-c5X

Los plasmidios puros pGEM-T/Lferr_0174 y pMAL-c5X se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* en un volumen de reacción de 80 μ L y se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 10-A). Desde este gel se aislaron las bandas correspondientes al DNA que contiene el gen Lferr_0174 (banda de alrededor de 300 pb en carriles 2-4) y al plasmidio pMAL-c5X digerido (carriles 5-7). Se ligó el

fragmento de 300 pb digerido con *NdeI* y *BamHI* al vector pMAL-c5X y el producto obtenido se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α para generar un conjunto de clones. Se realizó una extracción total de nucleótidos desde 8 clones con el método “One step” y se visualizaron los productos extraídos mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 10-B). Se compara el tamaño relativo de la banda correspondiente al plasmidio sin inserto (carril 1) con los productos presentes en los clones que teóricamente tienen un inserto de 300 pb (carriles 2-9). Se puede notar un leve aumento en el tamaño aparente de la banda plasmidial presente en todos los clones menos aparentemente la del clon 5 (carril 6).

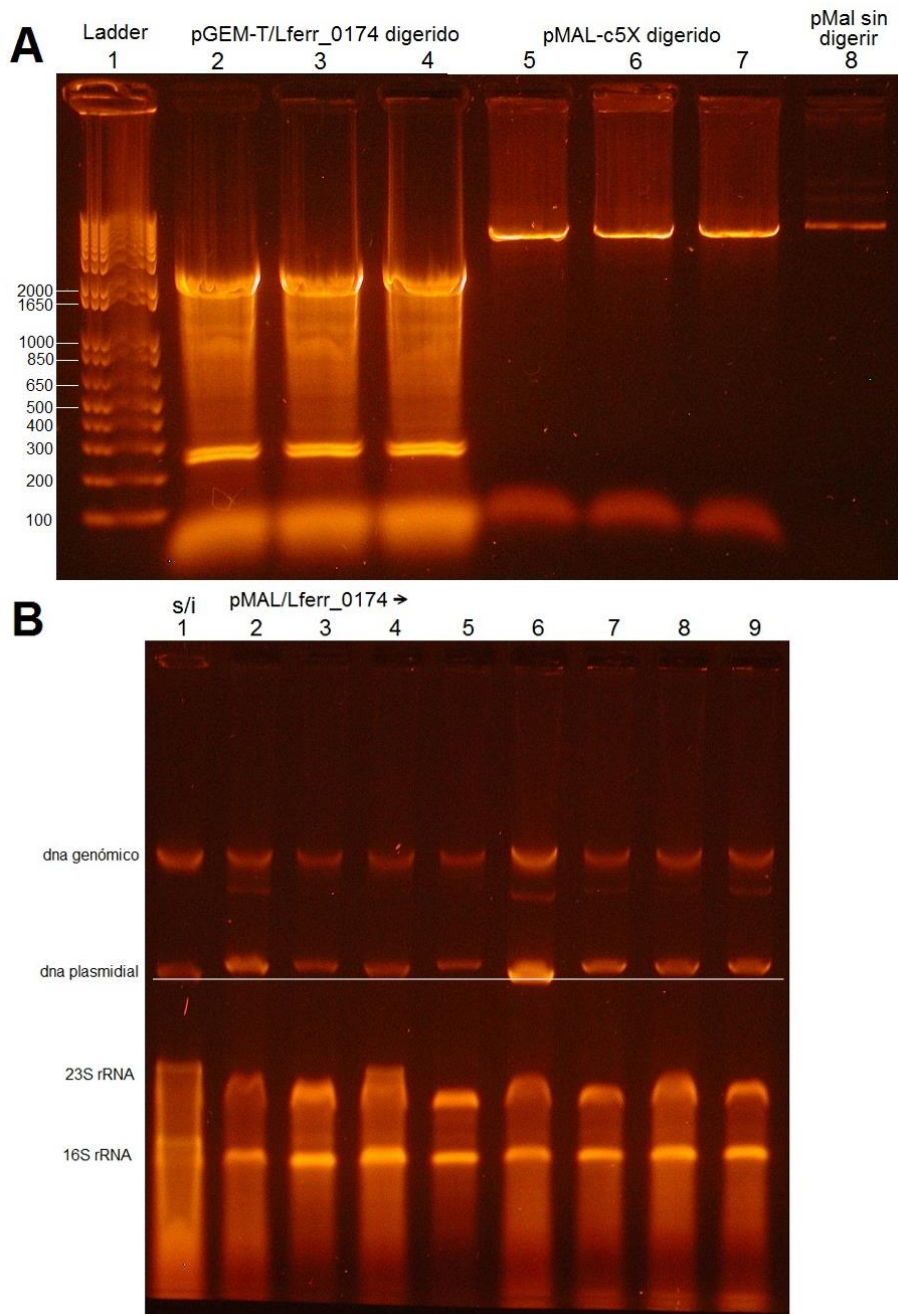


Figura 10. Clonamiento del gen Lferr_0174 en pMAL-c5X. Análisis mediante electroforesis en geles de agarosa. A) Productos de digestión de pGEM-T/Lferr_0174 (carriles 2-4) y de pMAL-c5X (carriles 5-7) con *NdeI* y *BamHI*. Carril 8: control de pMAL-c5X sin digerir. Se aplicaron 25 μ L por carril para los productos de digestión y 5 μ L para el control sin digerir. Carril 1: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). B) Extracción total de polinucleótidos de los clones de *E. coli* DH5 α que contienen el plasmidio pMAL-c5X/Lferr_0174 mediante el método “One step” (carriles 2-9). Carril 1: *E. coli* DH5 α con pMAL-c5X sin inserto (control negativo). Se aplicaron 15 μ L por muestra. Se destacan con una línea las diferencias en la migración de la banda correspondiente a DNA plasmidial.

Para determinar con mayor certeza los clones que contienen y expresan el inserto introducido se realizó una extracción de proteínas totales a cada clon crecido en presencia de IPTG (inductor) y estas se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Figura 11). Se pueden observar los distintos tamaños de la proteína expresada dependiendo de si corresponde a la MBP sola o a la proteína de fusión MBP:CusF3_{Af}. Se observa que todos los clones expresan una proteína del tamaño de la proteína de fusión MBP:CusF3_{Af} (52,8 kDa) excepto el clon 5 (carril 7), lo que indica que el gen se ha insertado correctamente y se expresa la proteína correspondiente.

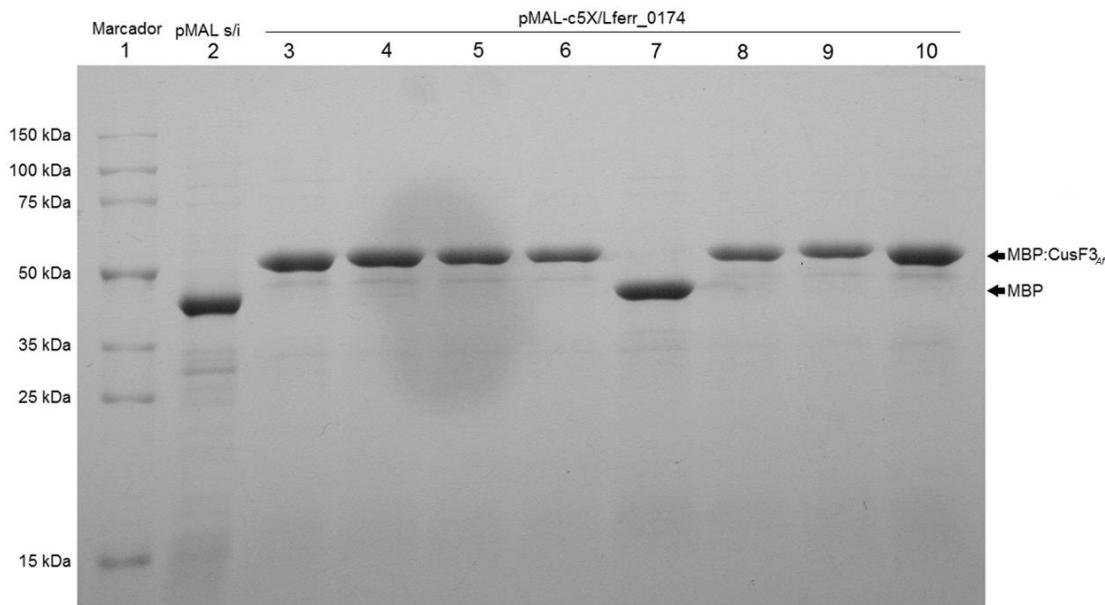


Figura 11. Expresión de proteínas de fusión con CusF3_{Af} en clones de *E. coli*. Las proteínas totales de clones de *E. coli* DH5 α pMAL-c5X/Lferr_0174 crecidos en condiciones de inducción se visualizaron mediante SDS PAGE en un gel de poliacrilamida al 10% (carriles 3-10) teñido con azul de coomasie. Se realizó el mismo proceso para un clon con pMAL-c5X sin inserto como control negativo (carril 2). Se utilizó el marcador de peso molecular Perfect Protein™ Marker, 15-150 kDa (Merck) (carril 1). Se indica el tamaño de banda que corresponde a la proteína MBP (42,5 kDa) y a la proteína fusión MBP:CusF3_{Af} (52,8 kDa). Debido a la gran concentración de la proteína expresada por el vector pMAL-c5X no se aprecia el resto de las bandas.

3.4 Mutagénesis sitio-dirigida

Utilizando uno de los clones que expresan la MBP:CusF3_{Af} se realizó la mutagénesis sitio-dirigida con el método SLIM. El producto obtenido se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α y obtener un conjunto de clones. De uno de estos clones se extrajo su DNA plasmidial y se procedió a realizar un PCR para demostrar la presencia del gen Lferr_0174 y comprobar que la mutación se obtuvo correctamente. Estas reacciones de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa. La Figura 12 muestra que el plasmidio mutado por SLIM presenta el gen Lferr_0174 y además la mutación M66H, debido a que al amplificar con partidores específicos para el sitio mutado se observa una banda en el plasmidio mutado que está ausente en el plasmidio sin mutar (Debido, posiblemente, a una variación en la T_m de hibridación del partidor al DNA templado), y que es de un tamaño similar al esperado (139 pb).

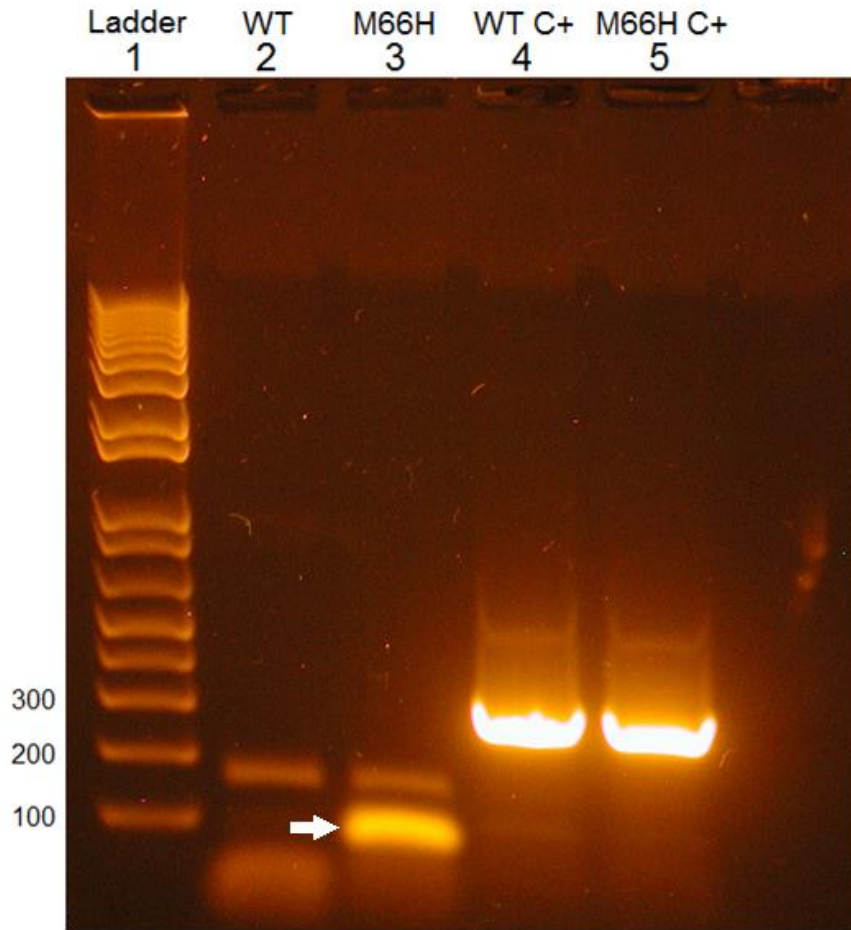


Figura 12. Comprobación de la obtención de la mutante M66H en *cusF3_{Af}*. Para comprobar la mutación por SLIM se realizaron reacciones de PCR de clones de pMAL-c5X y los productos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. En todos los PCR se utilizó como partidor “forward” el partidor CusF3pMAL_Fw (Tabla 3, sección 2.5.2) que hibrida al inicio del gen Lferr_0174. En los carriles 2 y 3 se utilizó como partidor “reverse” el partidor CusF3SLIMChkRv que hibrida en la secuencia mutada produciendo un amplicón teórico de 139 pb, mientras que en los carriles 4 y 5, como control positivo se utilizó el partidor CusF3pMAL_Rv que hibrida al final del gen produciendo un amplicón correspondiente al gen completo de un tamaño teórico de 299 pb. En los carriles 3 y 5 se utilizó como DNA templado el plasmidio resultante de la mutación M66H realizada por SLIM, mientras que en los carriles 2 y 4 se utilizó el plasmidio no mutado (WT) como control negativo. Se señala con una flecha el amplicón del tamaño esperado para el partidor CusF3SLIMChkRv. Se muestran los tamaños del marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen) presente en el carril 1.

3.5 Purificación de proteínas

Se purificaron las versiones WT y mutada de la CusF3_{Af} fusionada a la proteína MBP (MBP:CusF3_{WT} y MBP:CusF3_{M66H}, respectivamente) en conjunto con la proteína MBP como control negativo mediante una columna de amilosa. Con cada versión de la proteína se tomaron fracciones del lavado, el frente y la elución para visualizarlos por SDS-PAGE (Figura 13). Se observa el gran grado de pureza de todas las proteínas eluidas (Figura 12 carriles 4, 7 y 10) las cuales fueron cuantificadas previamente a su análisis por SDS-PAGE. El lavado también presentó un gran nivel de pureza, pero menor concentración.

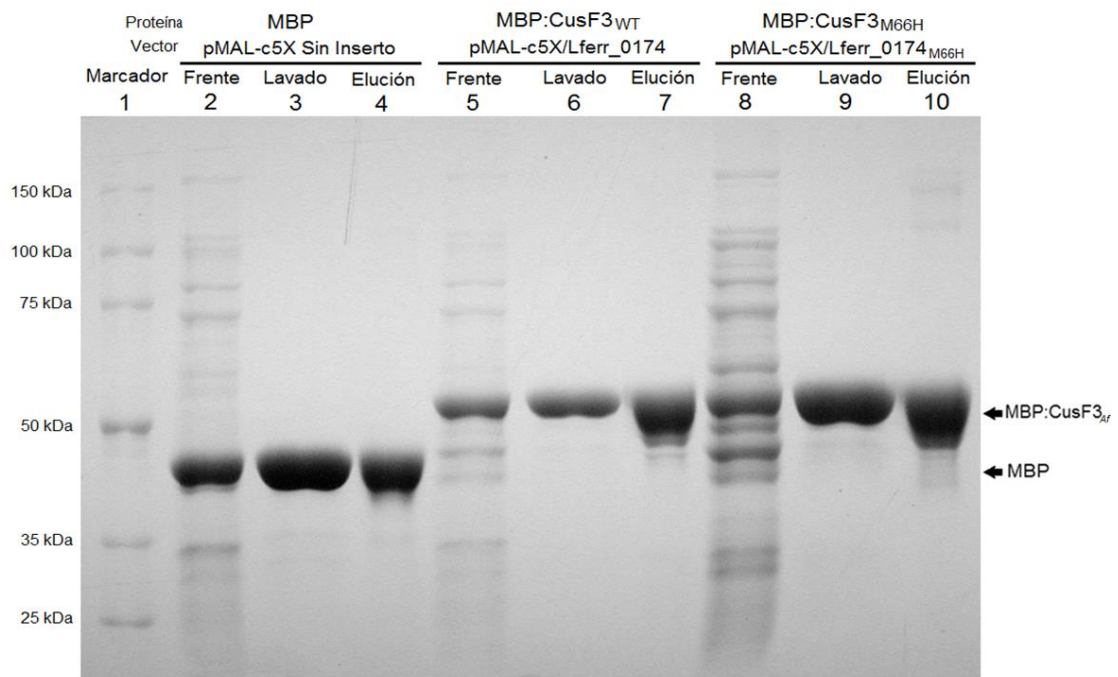


Figura 13. Purificación de CusF3_{Af} fusionada a MBP. Se purificaron todas las proteínas expresadas mediante el plasmidio pMAL-c5X y se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y teñido con azul de coomasie. Las proteínas purificadas son MBP (carriles 2-4), MBP:CusF3_{WT} (carriles 5-7) y MBP:CusF3_{M66H} (carriles 8-10). Para cada proteína se aplicaron 10 μ L de frente (carriles 2,5 y 8), 20 μ L de lavado (carriles 3,6 y 9) y 7 μ g de elución (carriles 4, 7 y 10) donde se encuentra la proteína purificada. En el carril 1 se encuentra el marcador Perfect Protein™ Marker con sus respectivos pesos moleculares.

3.6 Unión de cobre a las proteínas de fusión de CusF3_{Af}

Luego de incubar las proteínas purificadas en presencia de cobre y dializarlas para eliminar el cobre no unido, se determinó la concentración de proteínas y el cobre que permaneció unido a ellas luego de las diálisis. Se calculó la razón entre ambas determinaciones para inferir el número de átomos de cobre que se mantuvo en la bolsa de diálisis por cada molécula de proteína (relación cobre/proteína) (Tabla 6). Como control, las proteínas incubadas en ausencia de cobre no presentaron metal unido. En la incubación a pH 4,5 no se observó cobre en ninguna medición después de la diálisis (datos no mostrados). A pH 7 la cantidad de cobre unido a la CusF3_{WT} fue significativamente mayor que la del control negativo (MBP), mientras que la cantidad de cobre por proteína para CusF_{M66H} dio un valor similar al control (Tabla 6 y Figura 14).

Tabla 6. Unión de cobre a distintas proteínas CusF3_{Af}.

Proteína	Cobre añadido	Promedio cobre/ proteína	Desv. Est.
MBP	Sin cobre	0	± 0
MBP:CusF3 _{WT}	Sin cobre	0	± 0
MBP:CusF3 _{M66H}	Sin cobre	0	± 0
MBP	0,5 mM	0,32	± 0,12
MBP:CusF3 _{WT}	0,5 mM	0,71	± 0,21
MBP:CusF3 _{M66H}	0,5 mM	0,34	± 0,19

Se determinó la relación cobre/proteína de las proteínas incubadas con cobre y dializadas dividiendo la concentración de cobre por la concentración de proteína en μM . El promedio y la desviación estándar se calcularon con un N=4 para las muestras con cobre y N=2 para las muestras sin cobre.

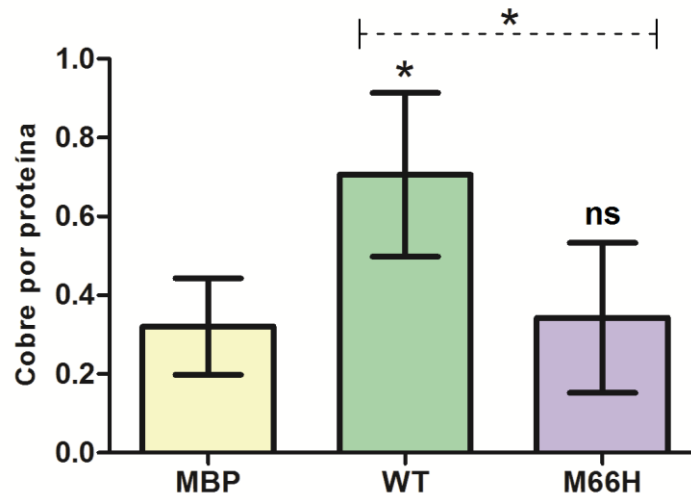


Figura 14. Relación cobre/proteína de las distintas proteínas analizadas. WT y M66H corresponden a las proteínas MBP:CusF3_{WT} y MBP:CusF3_{M66H} respectivamente. Se realizó la prueba estadística t-Student para determinar diferencias significativas con un N de 4, donde ns indica no significativo y * indica $p \leq 0,05$. Símbolos sobre las barras indican diferencias respecto al control (MBP).

4. Discusión y Proyecciones

4.1 Análisis bioinformático

Mediante el análisis bioinformático de las secuencias del sitio de unión a cobre de las CusF de bacterias se encontraron varios hechos interesantes. Como era de esperar, los aminoácidos más conservados en el sitio de unión a cobre de CusF corresponden a H₃₆, M₄₇ y M₄₉, donde todos presentaron más de un 99% de conservación. Sin embargo, la posición 44 que en *E. coli* se encuentra ocupada por triptófano presentó una cantidad casi idéntica de metionina y triptófano, donde incluso la metionina ocupa el primer puesto como el aminoácido más abundante en esa posición (Figura 15-B), al contrario de lo que se observa al analizar sólo homólogos cercanos de la CusF de *E. coli* como en la figura 3 donde aparentemente el triptófano es el residuo más abundante en esa posición.

Según este hallazgo más de la mitad de las CusF analizadas presentarían unión a cobre con 4 residuos en vez de 3. Esto es especialmente interesante ya que se ha planteado que la función del triptófano 44 en la CusF de *E. coli* es de proteger el cobre de la oxidación y evitar una coordinación de 4 ligandos al cobre, lo que podría resultar en la inhabilidad de este para ser transferido a la CusB. Aquello se demostró realizando una mutación a la CusF de *E. coli* en su triptófano 44 por metionina (W44M) donde la mutante W44M presentó una afinidad entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayor que la versión silvestre (Loftin y cols., 2009). Esto implicaría que más de la mitad de las CusF presentes en la base de datos no serían capaces de entregar el cobre a CusB, la cual tiene un sitio de unión a cobre formado por sólo 3 metioninas (Kim y cols., 2011). Adicionalmente, mediante

análisis genómicos se encontró que sólo en un 47% de las secuencias analizadas los genes *cusF* se encuentran flanqueados por genes del sistema CusCBA, y que incluso en un 3% de ellos el gen *cusF* no se encuentra flanqueado por ningún gen que codifique para algún sistema de resistencia a cobre putativo, lo que hace suponer que en ellas la CusF por sí sola podría tener un efecto protector ante el cobre mediante secuestro de el mismo (Kim y cols., 2010). Considerando estos antecedentes, es posible que las CusF que tengan una metionina en la posición 44 tengan la función de quelar el cobre en el periplasma.

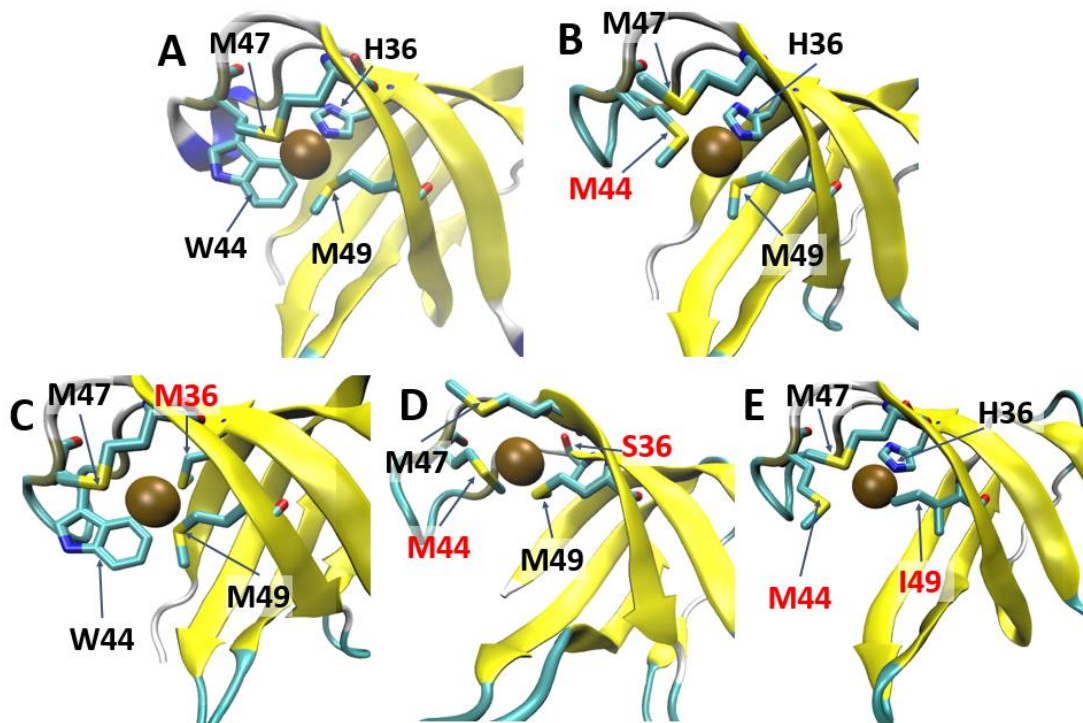


Figura 15. Modelos de todas las formas del sitio de unión a cobre de CusF encontradas mediante el análisis bioinformático. A) Sitio de unión a cobre de la CusF de *E. coli* B) Sitio de unión a cobre con M₄₄ presente en la mayoría de las CusF, ejemplificado con la de *Polaromonas sp.* C) CusF con sustitución de H₃₆ por metionina de *A. ferrooxidans*. D) CusF con sustitución de H₃₆ por Serina de *Idonella sp.* E) CusF con sustitución de M₄₉ por Isoleucina de *Methylocystis sp.* Se destacan en rojo aquellas variaciones respecto al sitio de unión a cobre de *E. coli*. Las visualizaciones B-E corresponden a modelamientos realizados basándose en la estructura del cristal de la CusF de *E. coli* (PDB: 2VB2) visualizado en A.

En cuanto a las sustituciones de los aminoácidos más conservados, es interesante notar que no se observaron sustituciones en la M₄₇. De todas formas, las CusF analizadas fueron una selección de aquellas CusF que en teoría unen cobre, es decir, que presentan al menos 3 aminoácidos esenciales para unir el metal (Met, His o Cis) en la posición de los aminoácidos que en *E. coli* interactúan con el Cu(I). Las CusF que no cumplen con este requisito probablemente perdieron su afinidad por Cu(I).

La H₃₆ presentó sustitución por diversos aminoácidos no esenciales para la unión del cobre a las proteínas, casos en los que teóricamente el cobre debiese unirse a los residuos M₄₄, M₄₇ y M₄₉, lo cual sería interesante de investigar (Figura 15-D). En esta posición, todas las sustituciones por metionina encontradas pertenecen a proteínas CusF del género *Acidithiobacillus*, por lo que esta mutación correspondería a una mutación específica y serían las únicas CusF en que el cobre presentaría coordinación por 3 metioninas y un triptófano (Figura 15-C). Se esperaba encontrar la misma sustitución en CusF de otros organismos acidófilos, pero las mutaciones en residuos conservados no son frecuentes y es raro encontrar mutaciones análogas.

Otra sustitución interesante corresponde a la sustitución de M₄₉ por Isoleucina en 2 CusF de *Methylocystis sp.*, en las que el cobre teóricamente debiese unirse a los aminoácidos H₃₆, M₄₄ y M₄₇, por lo que sería de interés analizar experimentalmente.

4.2 Medición de unión a cobre

Los resultados de la medición de unión a cobre a la CusF_{3WT} y la CusF_{3M66H} no fueron como se esperaban. Se esperaba que, a temperatura ambiente, ambas versiones de la

proteína unieran cobre en niveles similares, y que a pH ácido la unión del metal a la CusF3_{WT} fuera más fuerte. Sin embargo, a pH neutro CusF3_{M66H} presentó una cantidad de cobre unida igual a la del control negativo, por lo que es posible que esta proteína no haya unido cobre específicamente o que se haya dissociado de él en la diálisis. En este sentido, el diseño experimental no fue el adecuado, ya que al realizar diálisis sucesivas durante más de 20 horas, el equilibrio de unión del cobre a CusF3_{Af} podría haberse desplazado hacia la disociación de este, y no se estaría cuantificando la estequiometría de unión, sino que la cinética de pérdida. Esto no se consideró en la planificación del experimento debido a que según la bibliografía la constante de disociación (K_d) de la CusF_{Ec} es de $3,8 \cdot 10^{-8}$ M determinada por calorimetría de titulación isotérmica (Kittleson y cols., 2006) y de entre $8,7 \cdot 10^{-9}$ M y $4,6 \cdot 10^{-12}$ M determinada por ensayos de unión competitiva con BCA (Loftin y cols., 2009). Debido a la baja constante de disociación de la proteína al cobre, se diseñó el experimento sin considerar la posibilidad de que este se dissociara de la proteína. Sin embargo, si se aplica la ecuación de la constante de disociación (ecuación 4) al experimento diseñado, se obtiene para cada diálisis lo siguiente:

$$K_d = \frac{[Cu][P]}{[PCu]} \quad (4)$$

$$[P] = 1,5 \cdot 10^{-5} - [PCu] \quad (5)$$

$$[Cu]_i = \frac{[Cu]_{i-1} + ([PCu]_{i-1} - [PCu]_i)}{300} \quad (6)$$

(5) y (6) en (4)

$$K_{d_i} = \frac{\left(\frac{[Cu]_{i-1} + ([PCu]_{i-1} - [PCu]_i)}{300} \right) * (1,5 \cdot 10^{-5} - [PCu]_i)}{[PCu]_i} \quad (7)$$

La ecuación 5 se basa en que la cantidad total de proteína agregada fue $15 \mu\text{M}$, por lo que la suma de la concentración de proteína disociada y proteína-cobre ($[P]$ y $[\text{PCu}]$) debe ser siempre $15 \mu\text{M}$. La ecuación 6 muestra que para la diálisis i -ésima, el cobre libre ($[\text{Cu}]_i$) debe ser igual al cobre libre proveniente de la diálisis anterior ($[\text{Cu}]_{i-1}$) más el cobre soltado por la proteína ($[\text{PCu}]_{i-1} - [\text{PCu}]_i$) dividido por el factor de dilución de cada diálisis (300 veces). Si se reemplaza las ecuaciones 5 y 6 en la ecuación 4, se obtiene la ecuación 7 que es válida para cada i -ésima diálisis en función de la diálisis anterior ($i-1$). Para la realización de este modelo teórico se asumió que la estequiometría inicial de unión fue de 1, y que no hubo desnaturalización de las proteínas. También se consideró dentro del modelo el cobre liberado por la proteína (ecuaciones 6 y 7), ya que luego de las diálisis sucesivas este deja de ser despreciable respecto al cobre agregado inicialmente.

Utilizando las ecuaciones descritas, si se considera que la cantidad inicial de cobre es $5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ y se le asigna algún valor a K_d , se puede obtener la concentración final de cobre y la proporción cobre/proteína ($[\text{PCu}]/15 \mu\text{M}$) presentes luego de realizar 4 diálisis repitiendo los cálculos para cada una utilizando la ecuación 7 sucesivamente. Al realizar los cálculos con una K_d de 10^{-9} M , puede notarse que efectivamente las sucesivas diálisis tienden a desplazar el equilibrio de la ecuación hacia la disociación del complejo cobre-proteína, ya que se obtiene una relación cobre/proteína de 0,75.

Si bien este es un modelo teórico y no sirve para calcular con exactitud la constante de disociación de las proteínas utilizadas, puede estimarse (De acuerdo al modelo) el valor que la K_d debe tomar para obtener las relaciones cobre/proteína medidas experimentalmente, la cual es $1,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ para 0,71 átomos de cobre por proteína

(MBP:CusF3_{WT}) y $1,2 \cdot 10^{-8}$ M para 0,34 átomos de cobre por proteína (MBP:CusF3_{M66H}). Este diseño experimental con este modelo teórico no son una forma precisa de obtener el valor de la K_d de las proteínas, porque existen factores que no fueron controlados, como la estequiometría inicial de unión, el volumen final de la bolsa de diálisis (que aumentó levemente a lo largo de la diálisis) y la desnaturalización de las proteínas, por lo que no se podría asegurar que los valores de K_d calculados son correctos, pero sí puede establecerse que la K_d de la proteína MBP:CusF3_{WT} es mayor a la de la proteína MBP:CusF3_{M66H} ya que la primera presenta mayor capacidad para retener el cobre en su sitio de unión al metal. Este hecho podría deberse a que la CusF mutada es de *A. ferrooxidans*, y la mutación puede haber desestabilizado la proteína al punto que esta no pueda plegarse adecuadamente, o el sitio de unión a cobre no logre formarse correctamente. Técnicas similares basadas en diálisis sucesivas se han realizado anteriormente para determinar la K_d de proteínas (Colowick y Womack, 1969).

Se debe considerar que los resultados obtenidos en este seminario de título son preliminares. Es la primera aproximación a determinar la capacidad de unir cobre de la CusF3_{Af}, en la que se demostró que esta proteína sí presenta unión al metal. Será necesario en futuros estudios demostrar este hallazgo en un experimento similar con una sola diálisis al equilibrio donde el cobre no se disocie de la proteína y donde el metal se cuantifique mediante espectroscopía de absorción atómica dentro y fuera de la bolsa de diálisis (cobre libre) y se controle la mantención de la estructura secundaria de la proteína a lo largo del experimento mediante dicroísmo circular.

Debe considerarse además que la unión de cobre observada corresponde a la unión de Cu(II) a la proteína, ya que las incubaciones se realizaron en ambiente aeróbico. Se ha estudiado la unión de cobre a la CusF de *E. coli* en estas condiciones anteriormente, encontrándose una unión de 0.925 átomos de cobre por proteína mediante un método semejante (Franke y cols., 2003). Sin embargo, se ha descrito que la CusF de *E. coli* prefiere unir Cu(I), por lo que lo ideal es estudiar la unión de cobre a la proteína en presencia de algún agente reductor que permita la presencia del metal en su estado reducido.

El resultado obtenido para la unión de cobre a CusF3_{Af} es novedoso, ya que esta posee un sitio de unión a cobre compuesto por 3 metioninas y un triptófano nunca antes estudiado. En teoría, el sitio de unión a cobre de la proteína CusF3_{WT} debería ser como está visualizado en la figura 15-C y el de la CusF3_{M66H} como en la figura 15-A, en un bolsillo de unión formado por los mismos aminoácidos que en la CusF de *E. coli*. En la versión silvestre de la proteína el cobre debería unirse a un bolsillo formado por los aminoácidos M₆₆, W₇₄, M₇₇ y M₇₉.

4.3 Proyecciones

Como se ha señalado anteriormente, la medición de cobre unido a CusF3_{Af} con el ensayo con BCA es un resultado preliminar. La concentración del metal deberá confirmarse en futuros estudios mediante espectroscopía de absorción atómica. Un control negativo ideal a usar en estos experimentos sería una mutante que no uniera cobre de CusF3_{Af}. Una posibilidad para esto es la mutación de los residuos M₇₇ y M₇₉ por isoleucina, como en el

trabajo realizado en la CusF de *E. coli* por Franke y cols., 2003, donde se obtuvo una unión a cobre para la proteína mutante de 0,225 átomos de cobre por proteína. También podría realizarse este experimento digiriendo las muestras con factor Xa para separar la MBP de la CusF_{3Af}. Esto se intentó realizar para este trabajo con el objetivo de obtener CusF_{3Af} pura, pero no fue posible.

También se deberá intentar medir la unión de cobre a la CusF_{3Af} a pH ácido. Para esto, se deberán probar diferentes condiciones y métodos, como la utilización de diferentes soluciones amortiguadoras a distintos valores de pH. Existe la posibilidad que en las condiciones empleadas en nuestro estudio la CusF_{3Af} tenga una muy baja afinidad por Cu(II) y una alta afinidad por Cu(I). Es por esto que será necesario utilizar algún agente reductor para mantener el cobre como Cu(I). Una posibilidad es el Tris Carboxietil Fosfina (TCEP), que fue utilizado en un experimento similar por Padilla-Benavides y cols., 2014. Estos experimentos deberán realizarse controlando la mantención de la estructura secundaria de la proteína con dicroísmo circular.

Finalmente, será importante en estudios futuros determinar la constante de disociación de los complejos CusF_{3Af}/Cu(I), lo que es una constante mucho más sensible para determinar la unión al metal a la proteína. Esta constante es más probable que varíe al realizar la mutación M66H en la CusF_{3Af}. Idealmente se podrían utilizar ensayos de competitividad (con BCA y una cámara anaeróbica), de resonancia paramagnética electrónica, calorimetría de titulación isotérmica o espectroscopía de masa.

5. Conclusiones

Entre los aminoácidos más conservados del sitio de unión a cobre de CusF la M₃₆ se encuentra 100% conservada en las secuencias anotadas, mientras que H₃₆ y en M₄₉ presentan sustituciones, de las que sólo el género *Acidithiobacillus* presenta sustitución por metionina en la posición 36, lo que convierte al sitio de unión a cobre de la CusF_{3Af} en un sitio único y nuevo.

Se logró clonar, expresar y purificar exitosamente las versiones silvestre y mutante M66H de la CusF_{3Af} de *A. ferrooxidans* utilizando el sistema de expresión pMAL-c5X.

La CusF₃ de *A. ferrooxidans* une cobre a pH neutro. Este resultado, considerando los resultados entregados por el análisis bioinformático, correspondería a una medición de unión de cobre a un sitio no caracterizado previamente.

Los resultados sugieren que la mutación de la M₆₆ por histidina en la CusF_{3Af} producen una disminución de la capacidad de unir cobre de esta proteína a pH 7.

6. Bibliografía

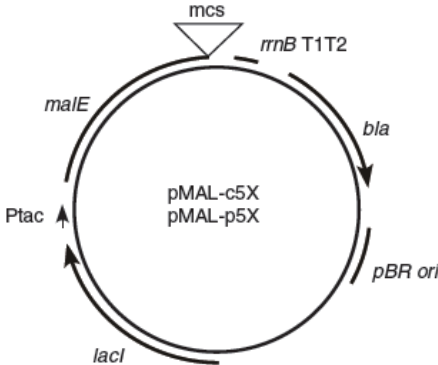
- Almárcegui, R. J., Navarro, C. A., Paradela, A., Albar, J. P., von Bernath, D., & Jerez, C. A. (2014). New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a quantitative proteomic analysis. *J. Proteome Res.*, *13*: 946-960.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Argüello, J. M., Raimunda, D., & Padilla-Benavides, T. (2013). Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, *3*: 73.
- Astashkin, A. V., Raitsimring, A. M., Walker, F. A., Rensing, C., & McEvoy, M. M. (2005). Characterization of the copper (II) binding site in the pink copper binding protein CusF by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Biol. Inorg. Chem.*, *10*: 221-230.
- Baker-Austin, C., & Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.*, *15*: 165-171.
- Brenner, A. J., & Harris, E. D. (1995). A quantitative test for copper using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, *226*: 80-84.
- Cárdenas, J. P., Valdés, J., Quatrini, R., Duarte, F., & Holmes, D. S. (2010). Lessons from the genomes of extremely acidophilic bacteria and archaea with special emphasis on bioleaching microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *88*: 605-620.
- Chiu, J., March, P. E., Lee, R., & Tillett, D. (2004). Site-directed, ligase-independent mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4 h. *Nucleic Acids Res.*, *32*: e174-e174
- Colowick, S. P., & Womack, F. C. (1969). Binding of diffusible molecules by macromolecules: rapid measurement by rate of dialysis. *J. Biol. Chem.*, *244*, 774-777.
- Consejo Minero (2016). Minería en cifras. Santiago, Chile. Recuperado de www.consejominero.cl/wp-content/uploads/2016/09/Mineria-en-Cifras-Septiembre-2016.pdf [consultado el 2.11.16].
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., & Nies, D. H. (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, *185*: 3804-3812.
- Grass, G., Rensing, C., & Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl. Environ. Microbiol.*, *77*: 1541-1547.
- Jerez, C. A. (2009). Metal extraction and biomining. *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)*: 407-420
- Jerez Guevara, C. (2011). Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, *3*: 717-729.

- Kim, E. H., Rensing, C., & McEvoy, M. M. (2010). Chaperone-mediated copper handling in the periplasm. *Nat. Prod. Rep.*, 27, 711-719.
- Kim, E. H., Nies, D. H., McEvoy, M. M., & Rensing, C. (2011). Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J. Bacteriol.*, 193: 2381-2387.
- Kittleson, J. T., Loftin, I. R., Hausrath, A. C., Engelhardt, K. P., Rensing, C., & McEvoy, M. M. (2006). Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI. *Biochemistry*, 45: 11096-11102.
- Lloyd, D. R., & Phillips, D. H. (1999). Oxidative DNA damage mediated by copper (II), iron (II) and nickel (II) Fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.*, 424: 23-36.
- Loftin, I. R., Franke, S., Roberts, S. A., Weichsel, A., Héroux, A., Montfort, W. R., Rensing, C., & McEvoy, M. M. (2005). A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry*, 44: 10533-10540.
- Loftin, I. R., Blackburn, N. J., & McEvoy, M. M. (2009). Tryptophan Cu (I)- π interaction fine-tunes the metal binding properties of the bacterial metallochaperone CusF. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 14: 905-912.
- Martínez-Bussenius, C., Navarro, C. A., Orellana, L., Paradela, A., & Jerez, C. A. (2016). Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach. *J. Proteomics*, 145: 37-45.
- Meir, A., Natan, A., Moskovitz, Y., & Ruthstein, S. (2015). EPR spectroscopy identifies Met and Lys residues that are essential for the interaction between the CusB N-terminal domain and metallochaperone CusF. *Metallomics*, 7: 1163-1172.
- Naderi, H., Abdollahy, M., & Mostoufi, N. (2015). Kinetics of chemical leaching of chalcocite from low-grade copper ore: size-distribution behavior. *J. Min. Environ.*, 6: 109-118.
- Navarro, C. A., Orellana, L. H., Mauriaca, C., & Jerez, C. A. (2009). Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 6102-6109.
- Navarro, C. A., von Bernath, D., & Jerez, C. A. (2013). Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biol. Res.*, 46: 363-371.
- Orell, A., Navarro, C. A., Arancibia, R., Mobarec, J. C., & Jerez, C. A. (2010). Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnol. Adv.*, 28: 839-848.
- Orellana, L. H., & Jerez, C. A. (2011). A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92: 761-767.

- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J. A., & O'Halloran, T. V. (2001). The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 276: 30670-30677.
- Padilla-Benavides, T., Thompson, A. M. G., McEvoy, M. M., & Argüello, J. M. (2014). Mechanism of ATPase-mediated Cu⁺ Export and Delivery to Periplasmic Chaperones: The interaction of *Escherichia coli* CopA and CusF. *J. Biol. Chem.*, 289: 20492-20501.
- Protcalc Protein calculator v3.4. <http://protcalc.sourceforge.net/cgi-bin/protcalc> [consultado el 2.11.16].
- Puig, S., & Thiele, D. J. (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6: 171-180.
- Rawlings, D. E. (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 56: 65-91.
- Rensing, C., & Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27: 197-213.
- Rubino, J. T., Riggs-Gelasco, P., & Franz, K. J. (2010). Methionine motifs of copper transport proteins provide general and flexible thioether-only binding sites for Cu (I) and Ag (I). *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15: 1033-1049.
- Rubino, J. T., Chenkin, M. P., Keller, M., Riggs-Gelasco, P., & Franz, K. J. (2011). A comparison of methionine, histidine and cysteine in copper (I)-binding peptides reveals differences relevant to copper uptake by organisms in diverse environments. *Metallomics*, 3: 61-73.
- Rubino, J. T., & Franz, K. J. (2012). Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J. Inorg. Biochem.*, 107: 129-143.
- Schrenk, M. O., Edwards, K. J., Goodman, R. M., Hamers, R. J., & Banfield, J. F. (1998). Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage. *Science*, 279: 1519-1522.
- Sievers, F., & Higgins, D. G. (2014). Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol. Biol.*, 1079: 105-116.
- UniProt Consortium. (2014). UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.*, 43: D204-D212
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R. J., Tettelin, H., Blake, R., Eisen, J. A., & Holmes, D. S. (2008). *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC genomics*, 9: 597.
- Xue, Y., Davis, A. V., Balakrishnan, G., Stasser, J. P., Staehlin, B. M., Focia, P., Spiro, T. G., Penner-Hahn, J. E., & O'Halloran, T. V. (2008). Cu (I) recognition via cation- π and methionine interactions in CusF. *Nat. Chem. Biol.*, 4: 107-109.

Material Suplementario

A)



B)

pMAL-c5X, -p5X MCS

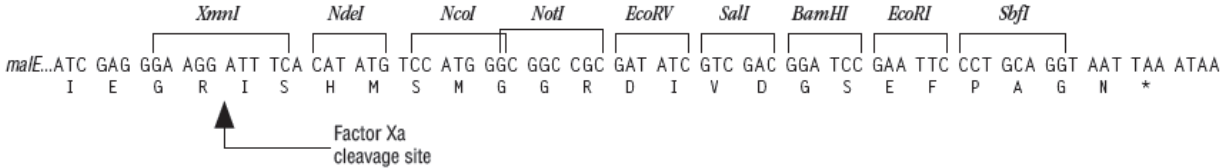


Figura S1. Vector pMAL c5X. A) Mapa genético del vector pMAL-c5X. B) Sitio de policlonamiento del vector.