

UCH-FC
MAG-Microbiología
P138
C.1



ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS EXTRACELULARES DE

***Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas

con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias



Fernando Andrés Pagliai López

Noviembre, 2008

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez

U

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

FERNANDO ANDRÉS PAGLIAI LÓPEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 7 de Octubre de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

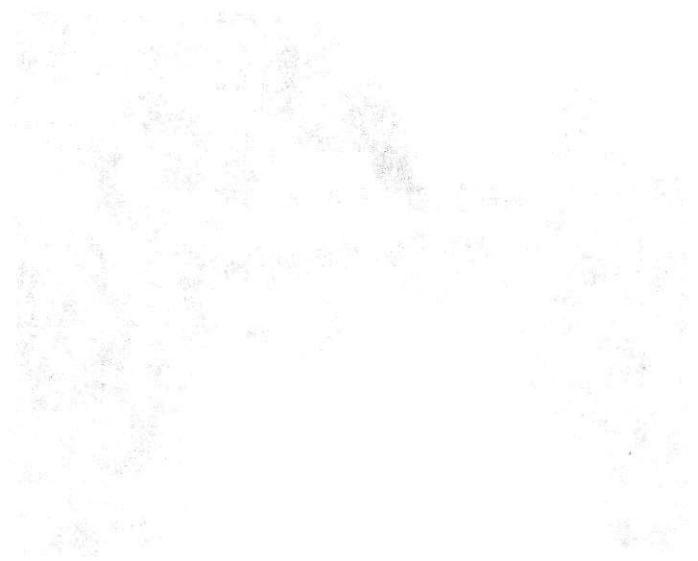
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Víctor Cifuentes
(Presidente)

Dr. Marcelo Baeza



The image shows three blue ink signatures in cursive script, each followed by a horizontal dotted line. To the right of the signatures is a circular stamp with the text "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "UNIVERSIDAD DE CHILE" around the perimeter.



[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

A mis padres y hermanas





AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la Facultad de Ciencias, a sus docentes y funcionarios, y a los miembros de la Comisión Evaluadora por las sugerencias y consejos recibidos durante la permanencia en el programa.

Agradezco al Instituto de Dinámica Celular y Biotecnología por el financiamiento económico otorgado durante la realización de esta Tesis.

Agradezco al Dr. Carlos Jerez por permitirme continuar el trabajo en su Laboratorio, por transmitir su espíritu científico y su intención de apuntar siempre a lo mejor.

A mis compañeros de trabajo, en especial a Felipe, Claudio, Simón y Francisco por la disposición a comentar y discutir resultados que me permitieron avanzar en mi investigación y ahondar en mis conocimientos. A Juan Araos por hacernos más simple el trabajo en el Laboratorio y por compartir sus años de experiencia con cada uno de nosotros, y a todo el grupo del Laboratorio de Microbiología molecular y Biotecnología, quienes hicieron muy agradable el trabajo diario y han prestado su ayuda en distintas circunstancias. También agradezco al Dr. Nicolás Guiliani y su grupo por los aportes generados para la discusión del trabajo. Una mención especial a los participantes de la liga Tomato Pickers.

A mis amigos de toda la vida Álvaro y Ricardo, a quienes considero mis hermanos.

A mis amigos del Instituto Nacional por la alegría que siempre representa reunirnos luego de varios años de egresar.

Finalmente, por sobre todo quiero agradecer a mis padres, a quienes está dedicada esta Tesis, a mis hermanas Marcela y Valeria, por el apoyo y amor recibido y con quienes conformamos una hermosa familia, algo fundamental para cualquier persona.

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1	Modelo propuesto para la oxidación del azufre por <i>A. ferrooxidans</i>	7
Figura 2	Resumen de los sistemas de secreción de proteínas descritos en bacterias Gram-negativas.....	10
Figura 3	Representación esquemática de los diferentes péptido señal en bacterias.	12
Figura 4	Predicción de la señal de secreción en las proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> ...	29
Figura 5	Análisis de las categorías funcionales de las proteínas con posible señal de secreción en <i>A. ferrooxidans</i>	31
Figura 6	2D-NEPHGE de proteínas extracelulares obtenidas mediante la precipitación con el sistema PRMM versus un extracto crudo de proteínas de <i>A. ferrooxidans</i>	32
Figura 7	2D-NEPHGE de las proteínas extracelulares de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en azufre elemental.....	33
Figura 8	Identificación del proteoma extracelular de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	35
Figura 9	Relación entre el punto isoeléctrico y la masa molecular de las proteínas encontradas en la fracción extracelular de <i>A. ferrooxidans</i>	41
Figura 10	Resumen de los posibles sistemas de secreción de proteínas presentes en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Componentes de los posibles sistemas de secreción en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	27
Tabla 2	Lista de las proteínas mayoritarias en la fracción extracelular de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en azufre elemental.....	34
Tabla 3	Proteínas con señal de secreción identificadas en la fracción extracelular de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en azufre.....	36
Tabla 4	Proteínas sin señal de secreción identificadas en la fracción extracelular de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en azufre.....	39
Tabla 5	Lista de las proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 con posible señal de secreción de acuerdo a SubCel 1.0.....	65



LISTA DE ABREVIATURAS

AFE	:	Marco abierto de lectura en la secuencia del genoma de <i>A. ferrooxidans</i> a partir de la base de datos del TIGR
ATCC	:	Colección americana de cultivos celulares
BSA	:	Albúmina de suero bovino
CBS	:	Centro para el análisis Biológico de Secuencias
COCHILCO	:	Comisión chilena del cobre
EPS	:	Sustancias poliméricas extracelulares
ESI-QUAD-TOF	:	Ionización por electrospray con analizador de cuadrupolo y tiempo de vuelo
HPLC	:	Cromatografía líquida de alta resolución
LPS	:	Lipopolisacáridos
LTQ-FT MS	:	Espectrometría de masas con transformada de Fourier acoplada a trampa iónica lineal bidimensional de alto rendimiento
MS/MS	:	Espectrometría de masas en tándem
NCBI	:	Centro Nacional de Información en Biotecnología
NEPHGE	:	Electroforesis en gradiente de pH sin alcanzar el equilibrio
OMP	:	Proteína de membrana externa
ORF	:	Marco abierto de lectura
pI	:	Punto isoeléctrico

pM	:	Peso molecular
PRMM	:	Solución rojo de pirogalol-molibdato-metanol
SDS	:	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	:	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes
TIGR	:	Instituto de Investigaciones Genómicas
TMHMM	:	Modelo oculto de Markov para proteínas de transmembrana

RESUMEN

Por muchos años la minería se ha posicionado como el principal impulsor en el desarrollo económico de nuestro país, estableciendo a Chile como el primer productor mundial de cobre. Gracias a esto, se han desarrollado nuevas y alternativas tecnologías en los procesos productivos del metal asociadas a una producción más eficiente, más segura y con menor riesgo ambiental. Una de estas tecnologías alternativas es la biolixiviación, definida como el uso de microorganismos en la recuperación de metales desde los minerales que los contienen, la cual ha sido utilizada comercialmente en el tratamiento de minerales sulfurados de baja ley para la recuperación de metales como el oro, el uranio y el cobre.

El microorganismo más estudiado del consorcio presente en las operaciones de biolixiviación es *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una γ -proteobacteria Gram-negativa, mesófila, acidófila y quimiolitotrófica, que posee la capacidad de catalizar la oxidación del ion ferroso y de los compuestos reducidos del azufre, generando ácido sulfúrico como uno de los productos finales.

Se ha descrito que para disolver los minerales *A. ferrooxidans* se adhiere a la superficie sólida del sustrato mediante interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. Productos extracelulares como las proteínas, los exopolisacáridos u otros podrían ser muy importantes en esta adhesión. Sin embargo, se desconocen muchos de los agentes que participan en el proceso.

Las proteínas extracelulares en bacterias pueden desempeñar funciones relacionadas al metabolismo, al transporte, a la adhesión, a la virulencia, entre otras, y muchas de estas proteínas están destinadas a abandonar el citoplasma debido a la presencia de señales que gobiernan su secreción. Este conocimiento de las proteínas secretadas por *A. ferrooxidans* podría ser de gran importancia para entender los mecanismos que le permiten a la bacteria obtener energía desde los minerales y sobrevivir en su extremo ambiente, y así poder desarrollar nuevas tecnologías que hagan posible una optimización en el proceso de la biolixiviación.

La identificación y caracterización del proteoma extracelular de *A. ferrooxidans*, fue realizada durante esta Tesis. Primeramente buscamos en el genoma de la cepa ATCC 23270, empleando herramientas bioinformáticas, la presencia de proteínas de los diferentes sistemas de secreción encontrando componentes para los sistemas de tipo I, II, IV, V y la vía Usher.

Para completar la aproximación *in silico* del estudio de las proteínas extracelulares de la bacteria analizamos su genoma mediante el servidor de predicción de señal de secreción SubCel 1.0, que incluye los algoritmos SignalP 3.0, TatP 1.0, LipoP 1.0, SecretomeP 2.0 y TMHMM 2.0, encontrando que el 26,7 % del total de marcos abiertos de lectura presentan posibles señales que les permitirían a estas proteínas abandonar el citoplasma en dirección a las membranas interna o externa, al periplasma o al espacio extracelular.

Empleando 2D-NEPHGE y secuenciación por Espectrometría de Masas identificamos las 11 proteínas más abundantes presentes en la fracción extracelular de la bacteria crecida en azufre elemental. Proteínas relacionadas al transporte y unión de solutos, al plegamiento, de la envoltura celular, de función desconocida y una proteína hipotética fueron encontradas.

Finalmente, efectuamos un análisis proteómico a gran escala mediante espectrometría de masas FT-ICR de la fracción extracelular de la bacteria crecida en azufre elemental. Se identificaron 177 proteínas, de las cuales el 52 % presentó señales de secreción de acuerdo a SubCel, siendo la mayoría proteínas con un punto isoeléctrico básico y peso molecular bajo. Las categorías funcionales más representadas en esta fracción fueron proteínas de la envoltura celular, de destinación de proteínas, del metabolismo energético y de transporte y unión.

Los sistemas de secreción identificados junto con la vía no-clásica podrían constituir la maquinaria de secreción de las proteínas encontradas en la fracción extracelular de *A. ferrooxidans*, que en su conjunto conforman el secretoma de la bacteria.

En general, este trabajo constituye el inicio de la identificación y caracterización de las proteínas de la fracción extracelular de la bacteria, siendo el primer estudio del secretoma en un microorganismo empleado en las faenas de biominería.

ABSTRACT

For many years, mining has been positioning as the main propeller in the economical development of our country, establishing Chile as the leading copper producer in the world. Due to this, new and alternative technologies in the metal productive processes have been developed, associated to a more efficient and safer production with less environmental risk. One of these alternative technologies is bioleaching, defined as the use of microorganisms in the recovery of metals from ores, which has been commercially used in treating of low grade sulfide minerals to recover metals such as gold, uranium, and copper.

The most studied microorganism from the consortium present in bioleaching processes is *Acidithiobacillus ferrooxidans*, a mesophilic, acidophilic, and chemolithoautotrophic Gram-negative γ -proteobacteria, since it has the ability to catalyze the ferrous iron and sulfur reducing compounds oxidation, generating sulfuric acid as one of the ends products.

It is well described that in the dissolution of ores *A. ferrooxidans* adheres to the solid substrate surface by hydrophobic and hydrophilic interactions. Also extracellular products, such as proteins, exopolysaccharides, and others may be very important in this attachment. Nevertheless, many of these agents that participate in the process are unknown.

Extracellular proteins in bacteria can perform functions related to metabolism, transport, adhesion, and virulence, among others, and many of these proteins are destined to leave the cytoplasm due to the presence of signals that govern its secretion. This knowledge of the secreted proteins from *A. ferrooxidans* could be of great importance to understand the mechanisms that allow the bacterium to obtain energy from the minerals and to survive in its extreme environment, and thus enabling the development of new technologies that make possible an optimization of the bioleaching process.

The identification and characterization of the extracellular proteome in *A. ferrooxidans* was addressed during this thesis work. We first searched in the genome of the bacterium strain ATCC 23270 the presence of proteins from each different secretion systems using bioinformatic tools, finding the needed components to the type I, II, IV, V systems and the Usher pathway.

To complete the *in silico* study of the bacterium extracellular proteins, we analyzed its genome using the secretion signal prediction server SubCel 1.0, that includes the SignalP 3.0, TatP 1.0, LipoP 1.0, SecretomeP 2.0, and TMHMM 2.0 algorithms, finding that the 26.7 % of total open reading frames showed possible signals that would allow these proteins to leave the cytoplasm towards the internal and outer membranes, the periplasm, or the extracellular milieu.

Using 2D-NEPHGE and Mass Spectrometry sequencing we identified the eleven most abundant proteins present in the extracellular fraction. Proteins related to the transport and binding of solutes, the folding of proteins, from the cell envelope, with unknown function, and one hypothetical protein were found.

Finally, a high throughput proteomic analysis using FT-ICR Mass Spectrometry of the extracellular fraction of cells of *A. ferrooxidans* grown in elemental sulfur was made. One hundred and seventy seven proteins were identified, fifty two percent of which showed possible secretion signals according to SubCel, most of them being proteins with basic isoelectric points and low molecular weights. The majority represented functional roles in this fraction were proteins from the cell envelope, protein fate, energy metabolism, and transport and binding proteins.

Along with the non-classical pathway, the protein secretion systems identified could constitute the secretion machinery of the proteins found in the extracellular fraction of *A. ferrooxidans* that as a whole conform the bacterium secretome.

In general, this work constitutes the beginning of the identification and characterization of proteins found in the bacterium extracellular fraction, being the first study of the secretome from a biomining microorganism.

ÍNDICE GENERAL

Índice General.....	1
1. Introducción.....	4
2. Planteamiento de la investigación.....	17
Hipótesis.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos.....	17
3. Materiales y Métodos.....	18
3.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	18
3.2. Monitoreo del crecimiento celular.....	18
3.3 Obtención de proteínas extracelulares.....	18
3.4 Obtención de proteínas celulares totales.....	19
3.5 Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.....	20
3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.....	20
3.5.2. Electroforesis bidimensional de proteínas.....	21
3.5.3. Tinción de los geles de poliacrilamida.....	22
3.6 Determinación cuantitativa de proteínas.....	22
3.7 Selección de proteínas y secuenciación por Espectrometría de masas.....	23
3.7.1 Identificación de las proteínas de la fracción extracelular de	

<i>A. ferrooxidans</i>	23
3.7.2 Selección de las proteínas mayoritarias en la fracción extracelular.....	24
3.8 Análisis <i>in silico</i> del genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	24
3.8.1 Búsqueda de ORFs con posibles señales de secreción.....	24
3.8.2 Análisis de las proteínas encontradas en la fracción extracelular.....	25
3.8.3 Identificación de los posibles sistemas de secreción de proteínas.....	25
4. Resultados	26
4.1 Identificación de los sistemas de secreción de proteínas.....	26
4.2 Identificación <i>in silico</i> de las proteínas con posible señal de secreción.....	29
4.3 Análisis del proteoma extracelular mediante geles bidimensionales.....	31
4.3.1 Comparación del proteoma extracelular versus un extracto total.....	31
4.3.2 Identificación de las proteínas mayoritarias en la fracción extracelular..	33
4.4 Análisis de la fracción completa de proteínas extracelulares de <i>A. ferrooxidans</i>	34
5. Discusión	42
5.1 Los sistemas de secreción de proteínas en <i>A. ferrooxidans</i>	42
5.2 Identificación <i>in silico</i> de las proteínas con posible señal de secreción.....	46
5.3 Análisis proteómicos mediante geles bidimensionales.....	48
5.3.1 Proteínas de transporte y unión.....	50
5.3.2 Plegamiento de proteínas.....	51

5.3.3 Envoltura celular.....	52
5.3.4 Proteínas de función desconocida.....	53
5.4 Identificación de la fracción extracelular completa de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en azufre.....	55
5.5 Perspectivas.....	58
6. Conclusiones.....	59
7. Referencias.....	60
8. Anexos.....	65

INTRODUCCIÓN

Chile es reconocido internacionalmente como un país minero y dentro de sus grandes reservas de minerales se encuentran el cobre, el hierro, el molibdeno, el salitre, el carbón, el plomo, el zinc, el oro y la plata, estimándose que para el año 2010 la producción de cobre alcanzará los 5,9 millones de toneladas métricas finas (COCHILCO, 2008). Esta actividad se ha establecido como uno de los pilares en el desarrollo económico del país. Los altos niveles de producción son el resultado de una alta inversión tanto pública como privada, y se espera que esta inversión alcance los US\$ 21.600 millones en el período 2008-2012 (COCHILCO, 2008). Esta inversión va acompañada con el desarrollo científico, reflejado en la aplicación de nuevas tecnologías que favorecerá una producción más eficiente, segura y con menor riesgo ambiental.

La mayoría de los metales son obtenidos y refinados desde los minerales mediante la pirometalurgia, proceso que funciona en base a la utilización de calor y que requiere altos niveles de metales en los minerales, no siendo rentable el tratamiento de minerales de baja ley. Sin embargo, hay algunos procesos de refinación y obtención de metales que no pueden llevarse a cabo mediante la pirometalurgia, como es el caso de los minerales oxidados.

Una tecnología alternativa es la biolixiviación, que se define como la utilización de microorganismos en la recuperación de metales a partir de los minerales que los contienen, y puede ser eficientemente aplicada en minerales de baja ley. El término

biolixiviación se refiere a la conversión de un metal insoluble (usualmente un sulfuro metálico) a una forma soluble (sulfato metálico) (Rawlings, 2002).

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

A. ferrooxidans fue la primera bacteria descubierta capaz de oxidar minerales y es capaz de oxidar tanto el hierro como los diversos compuestos reducidos de azufre presentes en los minerales (Rawlings, 2002). *A. ferrooxidans* es una γ -proteobacteria Gram-negativa, con pH óptimo de crecimiento entre 1,5 y 2,5 y es capaz de emplear como fuente de energía la oxidación aeróbica del ion ferroso [Fe(II)], el azufre elemental y los compuestos reducidos de azufre como los sulfuros metálicos (Pronk y col, 1990).

Aunque *A. ferrooxidans* crece mejor en condiciones aeróbicas con oxígeno como aceptor de electrones, se ha observado que es capaz de crecer en ambientes anaeróbicos en azufre elemental y sulfuros metálicos utilizando el ion férrico [Fe(III)] como aceptor de electrones (Pronk y col, 1992; Das y col, 1992). De este modo, cobra importancia el estudio de las vías metabólicas y energéticas relacionadas con el crecimiento y las adaptaciones fisiológicas de *A. ferrooxidans*, puesto que a esta bacteria se le considera

como uno de los miembros importantes del consorcio presente en los procesos de biolixiviación (Rawlings *y col*, 1994).

En la biolixiviación de la calcopirita, el más abundante y refractario de los sulfuros de cobre, la extracción del metal puede ocurrir mediante un proceso oxidativo en donde los iones férricos son los agentes oxidantes y el anión sulfuro es oxidado a azufre elemental según la reacción:



Sin embargo, en esta oxidación varias especies que contienen azufre se van depositando en la superficie del mineral, principalmente el azufre elemental, que puede ser oxidado a sulfato por microorganismos oxidadores del azufre como *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *A. caldus* y así continuar el proceso de biolixiviación (Watling, 2006).

En la oxidación del azufre elemental extracelular (S_8), se supone que éste es movilizado como persulfuro sulfano hacia el periplasma mediante una proteína especial de membrana externa (OMP) y luego es oxidado por una azufre dioxigenasa periplasmática (SDO). A continuación, el sulfito resultante es oxidado a sulfato por una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SOR) que probablemente usa citocromos como aceptores de electrones. El sulfuro libre es oxidado a azufre elemental separadamente por una deshidrogenasa (SQR) que usa quinonas como aceptor de electrones (Rohwerder *y col*, 2003) (Fig. 1).

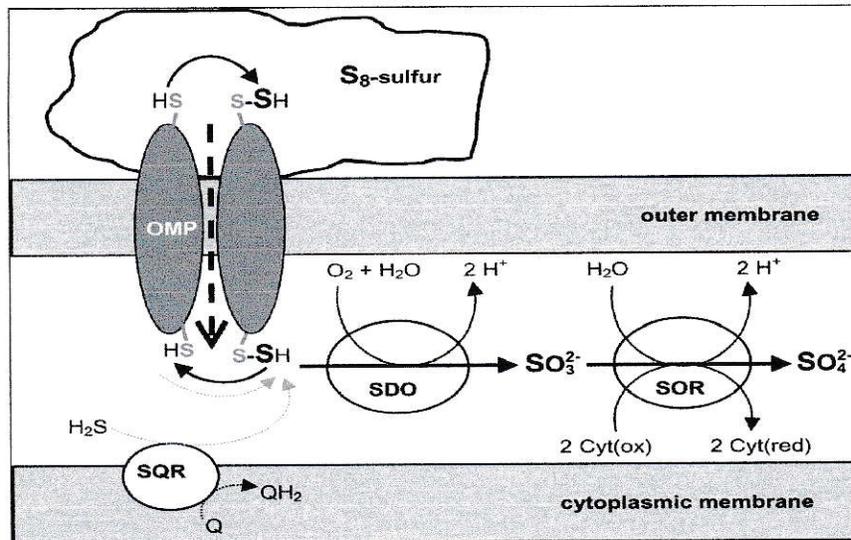


Figura 1. Modelo propuesto para la oxidación del azufre por *A. ferrooxidans* (Rohwerder y col, 2003).

Se ha visto que *A. ferrooxidans* se adhiere a la superficie de varios sustratos sólidos como el azufre (Espejo y col, 1987; Ceskova y col, 2001) y los sulfuros metálicos (Devasia y col, 1993; Myerson y col, 1983; Amaro y col, 1993) considerándose la adhesión un paso previo al proceso de oxidación (Brierley, 1978). Para disolver la calcopirita u otros compuestos sulfuro-metálicos, las bacterias se adhieren a los sustratos gracias a sustancias poliméricas y a otros productos extracelulares. Se ha descrito que la adhesión bacteriana a sustratos sólidos está mediada por interacciones hidrofóbicas (Arredondo y col, 1994; Devasia y col, 1993; Solari y col, 1992) e hidrofílicas (Ohmura y col, 1993).

Los componentes de la envoltura celular de las bacterias Gram-negativas tales como los lipopolisacáridos (LPS) y las proteínas de membrana externa juegan un papel importante en la adhesión, y esta envoltura celular en *A. ferrooxidans* se ha descrito que

está sujeta a cambios de acuerdo a las condiciones de crecimiento (Amaro *y col*, 1993; Arredondo *y col*, 1994). Gehrke (1998) demostró que existe una diferencia en la cantidad y composición de los azúcares y los lípidos de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de *A. ferrooxidans* cuando éste se crece en distintas fuentes de energía. Buonfiglio *y col* (1999) identificaron una proteína de membrana externa con un alto nivel de expresión cuando la bacteria se creció en azufre elemental, sugiriendo una posible participación en el proceso de oxidación de los minerales azufrados.

El perfil de las proteínas de la superficie celular en *A. ferrooxidans* está determinado principalmente por la diferencia de los sustratos de los medios de cultivo y por otros factores (temperatura, pH, osmolaridad, etc.) (Amaro *y col*, 1993; Arredondo *y col*, 1994). El cambio de las proteínas superficiales puede ser regulado por un mecanismo aún no bien identificado y que podría ser elaborado para adaptarse a la utilización del sustrato oxidable (Arredondo *y col*, 1988; Amaro *y col*, 1992; Ohmura *y col*, 1996). Por otro lado, no existe información sobre las proteínas extracelulares en esta bacteria.

Tettelin *y col* del Institute for Genomic Research (TIGR) obtuvieron en 2002 la secuencia completa del genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* mencionando en ese entonces que el análisis de las proteínas extracelulares y de superficie es de gran importancia para entender los mecanismos que permiten a la bacteria obtener la energía desde los minerales y sobrevivir en su ambiente. El genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* se encuentra actualmente anotado y está disponible en la base de datos pública del TIGR (<http://www.tigr.org>).

En una reunión que incluyó a la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) y a la Federación de Sociedades de Microbiología Europeas (FEMS) se unificaron algunos conceptos básicos en relación al tráfico de las proteínas en los procariontes. A este respecto se definió el término “*Exportación*” como el transporte de proteínas al exterior del citoplasma pero dentro de la célula, siendo los posibles destinos en bacterias Gram-negativas la membrana interna, el periplasma o la membrana externa. El término “*Secreción*” se aplica para las proteínas extracelulares que son activamente transportadas hacia el exterior de la célula o bien, que se encuentren completamente fuera de la última bicapa lipídica, incluyendo las proteínas solubles libres, las asociadas a la superficie o los apéndices superficiales (Ecomonou y col 2006). Previamente se definió el término “*Secretoma*”, el cual comprende a las proteínas secretadas y su maquinaria de secreción (Tjalsma y col, 2000). Durante este trabajo adoptaremos los términos acordados en esta reunión.

Las bacterias Gram-negativas secretan una gran cantidad de proteínas cuyas funciones incluyen la biogénesis del pili, del flagelo; la adquisición de nutrientes; la virulencia; el eflujo de toxinas o drogas; la adhesión a sustratos; la comunicación célula-célula, etc. El transporte de estas proteínas hacia la superficie celular incluye el atravesar la membrana interna, el periplasma y luego la membrana externa de la bacteria. Es así como las bacterias Gram-negativas han desarrollado varias vías para completar el proceso de secreción (Henderson y col, 2004; Kostakioti y col, 2005).

Las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas no comparten los mismos sistemas de secreción de proteínas. Hasta el momento se han descrito 5 sistemas de

secreción en bacterias Gram-negativas (Fig. 3), de los cuales sólo tienen equivalentes en bacterias Gram-positivas el sistema I y las translocasas Sec y Tat de membrana interna (Bendtsen *et al*, comunicación personal).

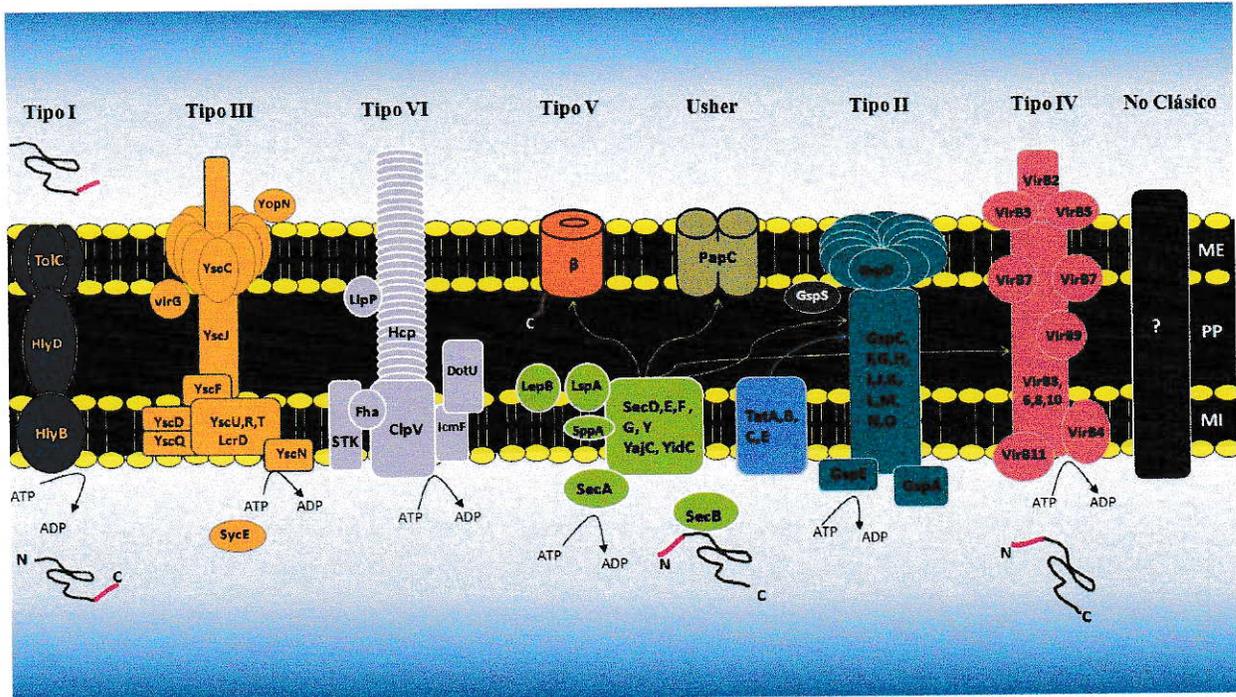


Figura 2. Resumen de los sistemas de secreción de proteínas descritos en bacterias Gram-negativas.

El sistema de secreción tipo I es el sistema más simple, puesto que comprende 3 componentes en el que las proteínas atraviesan las dos membranas mediante un solo paso. El sistema tipo II es el mecanismo de secreción más común y fue definido mucho tiempo atrás como la Vía General de Secreción (Pugsley, 1978). El sistema tipo III está descrito en algunos patógenos y tiene que ver con los fenómenos de virulencia, y también se ha descrito que la maquinaria de síntesis del flagelo representa una forma de secreción de tipo III. El sistema tipo IV ha sido caracterizado como un transportador tanto de proteínas como de complejos nucleoproteicos desde una célula a otra, siendo

ampliamente estudiado el sistema VirB en *Agrobacterium tumefaciens*. El sistema tipo V es relativamente simple e incluye la familia de los autotransportadores, necesarios para atravesar la membrana externa y se ha asociado a los fenómenos de adherencia, la colonización de superficies, la formación de biopelículas, etc (Bendtsen *y col*, comunicación personal; Preston *y col*, 2005). Recientemente se ha descrito un sexto mecanismo para el transporte de proteínas en bacterias Gram-negativas y se le denominó Sistema tipo VI, el cual se ha relacionado con la interacción con hospederos eucariontes en relaciones patogénicas o simbióticas (Filloux *y col*, 2008). La secreción a través de los sistemas II y V, y en determinados casos el sistema IV, requiere de un paso previo para atravesar la membrana interna, el cual es llevado a cabo por la maquinaria de translocación Sec (Fig. 2). Los sistemas de secreción de proteínas también han sido descritos y agrupados como Sec-dependientes (tipos II, IV y V) o Sec-independientes (I y III) (Kostakioti *y col*, 2005). Hasta el momento no se ha asociado la secreción de proteínas mediante el sistema tipo VI con la translocasa Sec, por lo que también se consideraría este último como Sec-independiente.

La mayoría de las proteínas bacterianas destinadas a abandonar el citoplasma se exportan a través del sistema Sec (Secretory), el que se encuentra altamente conservado. Estas preproteínas exportadas se sintetizan como precursores con su péptido señal en el extremo N-terminal, el cual es reconocido por factores solubles específicos para su transporte y translocación a través de la membrana. Luego de esta translocación, el péptido señal es removido, lo cual resulta en la liberación de la proteína desde la membrana, adquiriendo inmediatamente después de esto su conformación correcta

(Antelmann *y col*, 2001). Se han reportado otros mecanismos para la exportación de algunas proteínas, típicamente con alguna función o propósito específico para la bacteria, tales como las señales de secreción del sistema TAT (Twin Arginine Translocation) que transporta proteínas ya plegadas, las señales de lipoproteínas, los transportadores ABC, entre otros (Fekkes *y col*, 1999).

Existen tres dominios en un péptido señal (Fig. 3): n, h y c. El dominio n contiene al menos un residuo de arginina o lisina, que se sugiere participan en la interacción con la maquinaria de traslocación y los fosfolípidos cargados negativamente de la membrana. El dominio h consiste en una larga región de residuos hidrofóbicos que le permiten insertarse en la membrana. Finalmente el dominio c, que se encuentra a continuación del dominio h, es una región polar que contiene los sitios de clivaje para las señal peptidasas específicas (Tjalsma *y col*, 2004).

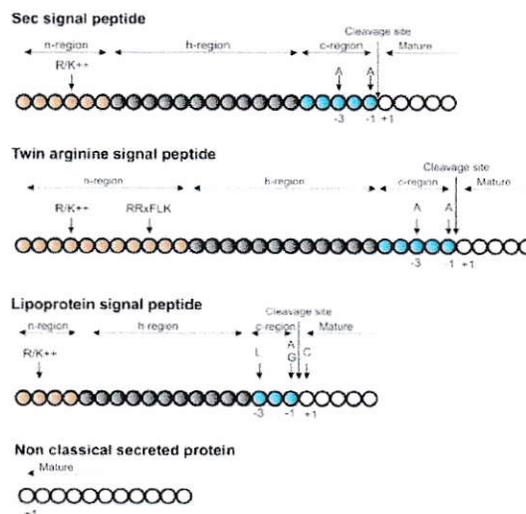


Figura 3. Representación esquemática de los diferentes péptidos señal en bacterias, en donde los círculos naranja representan la región n, los círculos grises la región h y los círculos azules la región c. Los círculos blancos son parte de la proteína madura. +1 indica el primer aminoácido de la proteína madura. El largo del péptido señal no está necesariamente dibujado a escala. (Bendtsen *y col*, comunicación personal).

Hace algunos años se identificó un nuevo sistema para la secreción de proteínas desde el citoplasma y se le denominó Sistema de Secreción tipo No-clásico (Bendtsen *y col*, 2005), el cual agrupa a proteínas que se han identificado y confirmado su presencia en el espacio extracelular, que son secretadas por algún mecanismo aún desconocido y que no poseen un péptido señal clásico o motivos que gobiernen su secreción.

El desafío ahora es cómo usar la información conocida en los genomas para predecir y deducir información aún desconocida. Diversos resultados sustentaron la idea que la información para el destino subcelular de las proteínas estaba provisto por su composición de aminoácidos (Nakashima *y col*, 1994; Schneider, 1999). Desde el año 1991 se han desarrollado varios predictores automatizados de localización subcelular basados principalmente en la secuencia de aminoácidos (Claros *y col*, 1997). Estos programas varían considerablemente y van desde métodos predictivos contruidos manualmente con la información existente hasta las diversas aproximaciones que ofrecen las máquinas de aprendizaje que son previamente entrenadas con información también ya conocida. Ejemplos de estos programas son PSORT-B, Gneg-PLoc, iPSORT, TargetP, NNPSL, ProtLock, etc. (Gardy *y col*, 2003; Chou *y col*, 2006).

Junto con esto, se ha desarrollado un servidor de predicción de señal de secreción basado en diferentes algoritmos automatizados y entrenados que analizan la secuencia de aminoácidos según varios parámetros. Este servidor de predicción de señal de secreción (disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services>) emplea programas que predicen la presencia de señales de secreción de tipo Sec, Tat y Lipoproteico, siendo éstos SignalP

3.0, TatP 1.0 y LipoP 1.0 respectivamente (Tjalsma *y col*, 2004; Bendtsen *y col*, 2005b). Estos programas reconocen en la secuencia de aminoácidos la presencia del péptido señal y de los sitios de corte de las señales peptidasas usando diferentes algoritmos basados en modelos de *Hidden Markov* y *Neural Network*. Recientemente se elaboró un nuevo programa llamado SecretomeP, que detecta las posibles proteínas que son transportadas desde el citoplasma mediante el Sistema de Secreción de tipo No Clásico (Bendtsen *y col*, 2005). Todos estos modelos predictivos permiten identificar posibles candidatos para el desarrollo en la búsqueda de drogas, la anotación de genes y otros estudios a nivel de proteínas.

En *Bacillus subtilis*, una bacteria Gram-positiva que se considera uno de los organismos modelos para el estudio del secretoma, cerca del 50 % del proteoma extracelular es secretado mediante las vías Sec y Tat (Antelmann *y col*, 2001). Se demostró que en esta bacteria existían al menos 4 mecanismos diferentes para la secreción de proteínas e identificaron 90 proteínas extracelulares, de las cuales sólo el 53 % fue predicho a poseer péptido señal. El 47 % restante consistió en proteínas que tenían péptido señal lipoproteicos y potenciales segmentos de membrana, pudiendo estas proteínas ser liberadas hacia el medio extracelular por fuga o simple liberación de la membrana, recambio de las proteínas de la membrana, la lisis celular, por la maquinaria de exportación del flagelo, el sistema de holinas, o bien otros sistemas de secreción aún no conocidos.

Watt *y col* (2005) afirmaron que existen dos grupos de exoproteínas, luego de analizar el proteoma extracelular de la bacteria fitopatogénica Gram-negativa

Xanthomonas campestris pv. *campestris* B100: i) las proteínas activamente secretadas, que comprenden enzimas extracelulares y proteínas que unen nutrientes y apéndices celulares, siendo su secreción y síntesis regulada por la densidad celular o el sustrato y, ii) proteínas que cumplen su función en el citoplasma y que no son activamente secretadas, pero que son liberadas al espacio extracelular por lisis o bien otro mecanismo desconocido. Junto con esto proponen que la presencia de proteínas de membrana externa en el espacio extracelular puede deberse a que algunas proteínas no se insertan bien en la membrana o que existe una digestión parcial de proteasas. Algunas de las proteínas encontradas en esta fracción extracelular tienen diversas funciones tales como la adquisición de elementos traza, enzimas degradativas, enzimas metabólicas, chaperonas y proteínas de membrana externa.

En la aproximación proteómica del estudio de un compartimento celular es necesario disponer de un rápido y simple procedimiento de obtención de las proteínas desde el espacio subcelular que las contiene, luego un método sensible que permita la separación de las proteínas, en donde la electroforesis bidimensional es la herramienta más poderosa, para finalmente proceder a la identificación de aquellas proteínas. En esta etapa la instrumentación ha mejorado considerablemente a través de los años, pasando de la secuenciación de Edman hasta los modernos equipos de espectrometría de masas con alto poder resolutivo que ofrecen los espectrómetros de masas que usan Transformada de Fourier (FT-ICR MS: Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer) (Domon y col, 2006).

Sabiendo que en otras bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas se encuentra documentado el proteoma extracelular, con variadas funciones descritas para muchas de sus proteínas, podemos plantearnos varias preguntas aún sin respuesta en relación a *A. ferrooxidans*: ¿Este acidófilo secreta proteínas?, ¿Qué características especiales tienen estas proteínas que las hacen resistir las condiciones ácidas del medio?, ¿Qué vías de secreción están involucradas?, etc.

Puesto que disponemos de una metodología concreta y clara para efectuar la aproximación proteómica en el estudio de las proteínas extracelulares (Pagliai, 2007), se propone en esta Tesis identificar y estudiar el proteoma extracelular de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* cuando la bacteria es crecida en un sustrato sólido como es el azufre elemental, así como predecir los posibles tipos de sistemas involucrados en la secreción de dichas proteínas.

La identificación de las proteínas de la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* constituye el primer paso en el estudio de la posible relación entre las proteínas secretadas y la interacción de la bacteria con el mineral.

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

HIPÓTESIS

A. ferrooxidans ATCC 23270 secreta proteínas que se mantienen solubles al pH ácido de su medio extracelular, usando vías de secreción conocidas para otros microorganismos.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el proteoma extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental.

Objetivos Específicos

1. Identificar *in silico* los componentes de los sistemas de secreción de proteínas presentes en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y las proteínas con posible señal de secreción.
2. Caracterizar mediante técnicas de proteómica las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, la cual se creció aeróbicamente a 30 ° C con agitación en el medio 9K modificado (9K_M) según el sustrato a oxidar. Para el crecimiento en azufre elemental, el medio contenía 0,4 g/L de MgSO₄ × 7 H₂O, 0,1 g/L de (NH₄)₂SO₄ y 0,04 g/L de KH₂PO₄ × 3 H₂O y 50 g/L de perlas de azufre esterilizadas previamente, ajustando el pH a 2,5 con ácido sulfúrico concentrado (Amaro y col, 1991).

3.2 MONITOREO DEL CRECIMIENTO CELULAR

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

3.3 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES

Las proteínas a estudiar se obtuvieron desde el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*, para lo cual éste se creció hasta fase exponencial tardía. Este sobrenadante de cultivo se centrifugó a 5500 g durante 15 min a 4 ° C, luego de lo cual se filtró a través de

una membrana GV Durapore PDVF (Millipore) con un tamaño de poro de 0,22 μm para descartar el resto de las células no separadas durante la centrifugación.

El protocolo empleado para la extracción y concentración de las proteínas de la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* fue el método PRMM, cuya solución contenía 0,05 mM rojo de pirogalol, 0,16 mM molibdato de sodio, 1,0 mM oxalato de sodio, 50 mM ácido succínico y 20 % (v/v) de metanol ajustado a pH 2 con HCl concentrado (Caldwell y col, 2003). Un volumen de esta solución se agregó a un volumen de sobrenadante, luego se ajustó a pH 2,8 con NaOH 5 N. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante dos h y luego a 4 ° C durante toda la noche para luego centrifugar a 12500 g durante 1 h a 4 ° C. El precipitado obtenido se lavó tres veces con etanol al 100 % y luego una vez con etanol al 70 %, y el etanol fue removido del pellet final de proteínas por evaporación a temperatura ambiente. El precipitado seco de proteínas se guardó a -20 ° C hasta su uso.

3.4 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS CELULARES TOTALES

Las células obtenidas luego de centrifugar el medio de cultivo y separar el sobrenadante se lavaron 4 veces con las sales del medio 9K_M (pH 2,5). Para obtener un extracto total de proteínas, las células se resuspendieron en 15 μL de amortiguador de sonicación por miligramo de célula, el cual contenía 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂ y 50 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa pancreática. Se agregó un cóctel de inhibidor de proteasas (SIGMA[®]) en proporción de 1 μL de cóctel por cada 4 mg de peso húmedo de células y luego éstas se sonicaron con el Homogenizador MISONIX XL-2010 en lapsos de 20 s, dejando las células 40 s en hielo entre cada lapso de sonicación. La concentración de

proteínas se obtuvo mediante el ensayo de Bradford usando albúmina de suero de bovino como estándar. Posteriormente se trató la muestra con DNasa (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentración final) por 10 min en hielo.

3.5 ANALISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

3.5.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Las muestras para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes se trataron con amortiguador de muestra (Laemmli, 1970) que contenía: Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, SDS al 2 %, glicerol al 10 %, β -mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,06 %. Se calentó la mezcla a 100 ° C durante 5 min, luego se centrifugó a 10000 rpm por 5 min para quedarse con las proteínas solubilizadas en este amortiguador.

Las muestras para electroforesis bidimensional sin alcanzar el equilibrio (2D-NEPHGE) se trataron con un amortiguador de rehidratación que contenía urea 9,5 M, Nonidet P-40 al 2 %, anfolitos al 2 % (pH 3-10, BioRad[®]) y β -mercaptoetanol al 5 % (O'Farrel, 1975).

Se prepararon geles para la electroforesis de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970). Se usaron geles con un gel concentrador al 3 % y un separador al 12,5 % en poliacrilamida en presencia de SDS al 0,1 %. La electroforesis se corrió a 50 V hasta que la muestra ingresa completamente al gel concentrador para luego someterla a 150 V hasta que el azul de bromofenol alcanzara el extremo inferior del gel. Para estimar el peso molecular

de las proteínas a analizar, se utilizó el marcador de peso molecular BenchMark™ (Invitrogen).

3.5.2 Electroforesis bidimensional de proteínas

La electroforesis bidimensional se llevó a cabo según lo descrito por O'Farrel en 1975 y O'Farrel *et al* en 1977. La primera dimensión consistió en una electroforesis en gradiente de pH de 3 a 10, sin alcanzar el equilibrio (NEPHGE). La solución del gel contenía Urea 9,2 M, 2 % Nonidet P-40, 3,8 % acrilamida, 0,2 % bisacrilamida, 2 % anfolitos (del rango de pH 3 a 10 BioRad®), 0,02 % persulfato de amonio y 0,014 % N,N,N',N'-tetrametilendiamina. La muestra se aplicó en la parte superior del gel y se cubrió con una solución 9 M urea y 1 % anfolitos (0,8 % anfolitos pH 5-7, 0,2 % anfolitos pH 3-10, BioRad®). La electroforesis se realizó de modo que la parte superior de la cámara (ánodo) contuviese la solución de H₃PO₄ 10 mM y la inferior (cátodo) tuviera la solución de NaOH 20 mM. Los geles con las muestras de interés se sometieron al isoelectroenfoco durante 5 h a 400 V, luego de lo cual los geles se equilibraron y lavaron en una solución que contenía 10 % glicerol, 5 % β-mercaptoetanol, 2,3 % SDS y 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8 durante 90 min, cambiando la solución cada 30 min. Luego se lavó dos veces con agua bidestilada durante 10 min, para luego enjuagar el gel en amortiguador de corrida de Laemmli. La segunda dimensión se llevó a cabo según lo descrito en el punto 3.5.1 a excepción de que el voltaje usado fue de 50 V durante toda la electroforesis. Sobre el gel concentrador se colocó el gel de la primera dimensión y se cubrió con solución de agarosa al 1 % con azul de bromofenol al 0,01 %.

3.5.3 Tinción de los geles de poliacrilamida

Tanto los geles monodimensionales como los bidimensionales se tiñeron con azul de Coomassie G-250 o mediante nitrato de plata.

Para el caso de la tinción con azul de Coomassie G-250, los geles se fijaron durante una hora en una solución que contenía 50 % etanol y 2 % ácido fosfórico, luego de lo cual se tiñeron toda la noche con una solución que contenía 34 % metanol, 0,1 % Coomassie G-250, 2 % ácido fosfórico y 15 % sulfato de amonio. Una vez que los geles se tiñeron completamente, éstos se destiñeron con lavados sucesivos de agua bidestilada (Neuhoff *y col*, 1988). Un método alternativo usado para la tinción de los geles bidimensionales correspondió al denominado Blue Silver, el cual es una modificación del protocolo de Neuhoff que involucra el aumento de la cantidad de Coomassie usado en la mezcla de tinción de un 0,1 % a 0,12 % y el aumento del ácido fosfórico de 2 % al 10 % (Candiano *y cols*, 2004).

La tinción con nitrato de plata se efectuó según lo descrito por Rabilloud *y col* (1988) y Shevshenko *y col* (1996).

Una vez teñidos los geles, éstos se conservaron a 4 ° C en agua bidestilada con 20 % sulfato de amonio.

3.6 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

Se realizó de acuerdo al método de Bradford (1976) usando el Coomassie Plus Protein Assay Reagent Kit (Pierce®) y el Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad®).

La cuantificación de las proteínas que unen el rojo de pirogalol se realizó espectrofotométricamente a 540 nm, para lo cual se elaboró previamente una curva de

calibración con concentraciones conocidas de albúmina de suero de bovino precipitadas mediante el sistema PRMM (Pagliai, 2007).

3.7 SELECCIÓN DE PROTEINAS Y SECUENCIACION POR ESPECTROMETRIA DE MASAS

3.7.1 Identificación de las proteínas de la fracción extracelular de *A. ferrooxidans*

Las proteínas de la fracción extracelular completa de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental, precipitadas usando el método PRMM, se solubilizaron directamente en amortiguador de carga para proteínas y una alícuota de cada muestra, de aproximadamente 20 µg de proteínas por carril, se separó en un gel SDS-PAGE, y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie G-250. El análisis de esta fracción completa se realizó gracias a una colaboración de nuestro laboratorio con el Dr. Donald Hunt en el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Facultad de Química de la Universidad de Virginia en Estados Unidos. Cada porción del gel que contenía las proteínas así separadas fue cortado en 5 partes y se realizó la digestión con tripsina de acuerdo al protocolo de Shevshenko *y col* (1996).

Los péptidos obtenidos de la digestión de las proteínas extracelulares se analizaron en un equipo de HPLC Agilent serie 1100 (Palo Alto, CA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas de transformada de Fourier LTQ-FT (Hybrid Linear Ion Trap Fourier Transform) (ThermoElectron, San José, CA) para la separación y análisis en línea de los péptidos. Con esto se obtuvo la información de la secuencia de cada una de las proteínas presentes en la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental.

3.7.2 Selección de las proteínas mayoritarias en la fracción extracelular

En los geles bidimensionales del proteoma extracelular de *A. ferrooxidans*, se midió por triplicado la intensidad de las manchas presentes mediante un software de tratamiento de imágenes llamado *Quantity One*, versión 4.21 (Bio-Rad®). Para la identificación de las proteínas extracelulares, se seleccionaron y aislaron las manchas más abundantes a partir de estos geles bidimensionales y luego se sometieron a digestión con tripsina. La solución de péptidos resultante se analizó y secuenció mediante espectrometría de masas (MS) con un equipo de ionización por electro-spray y analizador de tiempo de vuelo (ESI-QUAD-TOF). Las muestras se procesaron en el Centro de System Biology de Cambridge, Universidad de Cambridge, Reino Unido. La información obtenida con la espectrometría en tándem (MS/MS) se usó para identificar las proteínas usando el software MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra la base de datos de proteínas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

3.8 ANALISIS *In Silico* DEL GENOMA DE *A. ferrooxidans* ATCC 23270

3.8.1 Búsqueda de ORFs con posibles señales de secreción

Con el fin de identificar las posibles proteínas transportadas mediante las vías de secreción de tipo Sec, Tat, Lipoproteico y No Clásico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se analizó su genoma anotado y disponible (www.tigr.org) empleando el servidor SubCel 1.0 (www.cbs.dtu.dk). Este servidor incluye los programas SignalP 3.0, TatP 1.0, LipopP 1.0 y SecretomeP 2.0. Además incluye el programa TMHMM 2.0 que predice proteínas con posibles dominios de transmembrana (Bendtsen *et al.*, 2005b).

La masa molecular y el punto isoelectrico de las proteínas identificadas por espectrometría de masas así como de las predichas a poseer señal de secreción se obtuvieron usando la herramienta ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam>).

Se empleó el programa BlastP del Nacional Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en las búsquedas de la identidad en las bases de datos.

3.8.2 Análisis de las proteínas encontradas en la fracción extracelular

Las proteínas secuenciadas a partir de la fracción extracelular completa de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental se compararon con los ORFs sometidos al análisis de SubCel 1.0 para identificar cuáles de estas proteínas encontradas en la fracción extracelular poseen posibles señales de secreción.

3.8.3 Identificación de los posibles sistemas de secreción de proteínas

Para predecir algunos de los posibles mecanismos involucrados en la secreción de las proteínas en *A. ferrooxidans* se utilizó una base de datos (con las secuencias de proteínas de 225 genomas bacterianos) que agrupa los diferentes sistemas de secreción descritos (I, II, III, IV y V) (www.cbs.dtu.dk) y se comparó mediante la herramienta BlastP la similitud de estas proteínas contra el genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*. Adicionalmente se consultó otra base de datos con información relevante y disponible sobre los componentes de los sistemas de secreción de tipo II, III y IV (KEGG pathway; www.genome.ad.jp). Junto a esto, se buscó en el genoma las proteínas ya anotadas y descritas a pertenecer a algún sistema de secreción.

RESULTADOS

4.1 Identificación de los sistemas de secreción de proteínas

El primer paso de nuestro análisis fue identificar los posibles sistemas de secreción presentes en el genoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* involucrados en el transporte de las proteínas desde el citoplasma hacia el medio extracelular. Para lograr esto se utilizaron 2 bases de datos con las secuencias de proteínas conservadas e identificadas a pertenecer a cada una de estas vías (I → V) (Fig. 3), correspondiendo estas bases de datos a “*Secretion systems Overview*” y “*KEGG Pathway Database – Folding, Sorting and Degradation*”.

El análisis *in silico* sugiere la presencia de los 3 componentes fundamentales del sistema tipo I, los cuales parecen estar contenidos más de una vez en el genoma de este acidófilo. En el caso del sistema II, se identificaron prácticamente todos los componentes de las translocasas Sec y Tat, y algunos de la vía II en sí (vía general de secreción) y la maquinaria de ensamblaje del pili tipo IV. Así mismo se detectaron proteínas que participan en la secreción mediante el sistema tipo V de los autotransportadores, y una proteína de la familia Usher que puede participar en el transporte a través de la membrana externa hacia el medio extracelular. Reportes previos ya identificaron la presencia de los genes necesarios para la secreción del sistema tipo IV (Barreto *y col*, 2003; Valenzuela *y col*, 2006).

La lista de las proteínas identificadas en *A. ferrooxidans* se detalla en la Tabla 1, a excepción de aquellas que participan en la formación y ensamblaje del pili tipo IV. No

se encontraron ortólogos para las proteínas pertenecientes a los sistemas III y VI, por lo que se puede suponer que estos dos sistemas no se encuentran presentes en la bacteria.

Tabla 1. Componentes de los posibles sistemas de secreción de proteínas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

SISTEMA TIPO I	
AFE_0247	proteína de secreción, familia HlyD
AFE_0412	ATPasa sistema de secreción tipo I (transportador ABC familia HlyB)
AFE_0413	proteína de fusión de membranas sistema de secreción tipo I, familia HlyD
AFE_0415	proteína de membrana externa sistema de secreción tipo I, putativa (dominio <i>TolC</i>)
AFE_0929	proteína de membrana externa de secreción y eflujo de toxina (dominio <i>TolC</i>)
AFE_0930	transportador ABC de secreción de toxina, proteína de unión a ATP, familia HlyB
AFE_0931	proteína de secreción de toxina, familia HlyD
AFE_1478	proteína de secreción, familia HlyD
AFE_2181	transportador de resistencia a drogas, putativo (proteína de secreción familia <i>HlyD</i>)
AFE_2422	transportador ABC, proteína permeasa de unión a ATP (transportador ABC familia <i>HlyB</i>)
AFE_2463	proteína de membrana externa sistema de secreción tipo I, familia <i>TolC</i>
AFE_2771	proteína de secreción, familia HlyD
AFE_2985	sistema de eflujo RND, lipoproteína de membrana externa (dominio <i>TolC</i>)
AFE_2986	proteína de secreción de resistencia a droga, putativa na de secreción familia <i>HlyD</i>)
SISTEMA TIPO II	
AFE_0473	preproteína de la translocasa, subunidad SecG
AFE_0968	preproteína de la translocasa, subunidad SecB
AFE_1037	preproteína de la translocasa, subunidad YajC
AFE_1038	proteína de membrana de exportación, SecD
AFE_1039	proteína de membrana de exportación, SecF
AFE_2685	preproteína de la translocasa, subunidad SecY
AFE_2719	preproteína de la translocasa, subunidad SecE
AFE_2803	preproteína de la translocasa, subunidad SecA
AFE_2992	proteína de membrana interna, 60 kDa (<i>YidC</i>)
AFE_0060	proteína de la translocasa Sec-independiente, TatC
AFE_0061	proteína de translocación argininas gemelas, TatB
AFE_0062	proteína de translocación argininas gemelas, familia TatA/E
AFE_3201	proteína de translocación argininas gemelas, familia TatA/E
AFE_1015	peptidasa del péptido señal SppA, tipo 67k
AFE_1683	señal peptidasa I [LepB]
AFE_2483	señal peptidasa II [LspA]
AFE_0401	proteína bacteriana de secreción tipo II/III (superfamilia de <i>Secretinas</i>)
AFE_1960	proteína de sistema de secreción tipo II/IV (proteína E sistema de secreción tipo II)
AFE_2075	proteína de ensamblaje pili tipo IV, PilC (proteína F sistema de secreción tipo II)
AFE_2076	proteína con dominio pilina (proteína H vía general de secreción)
AFE_2203	proteína A vía general de secreción, putativa
AFE_2305	proteína ensamblaje de fimbria PilQ, putativa (superfamilia de <i>Secretinas</i>)
AFE_2621	pilina, putativa (proteína G vía general de secreción)
AFE_2840	peptidasa de la prepilina pili tipo IV, PilD (proteína O vía general de secreción)
AFE_2843	proteína de ensamblaje pili tipo IV (proteína E sistema de secreción tipo II)

continuación...

SISTEMA TIPO IV	
AFE_1386	proteína familia TraG-TraD
AFE_1387	proteína tipo conjugación (virB1)
AFE_1388	proteína de conjugación y transferencia, putativa (TrbI)
AFE_1389	proteína de conjugación y transferencia, putativa (TrbG2)
AFE_1390	proteína de conjugación y transferencia, putativa (TrbG1)
AFE_1391	proteína de conjugación y transferencia (TrbF)
AFE_1443	proteína de conjugación y transferencia (TrbL)
AFE_1445	proteína de conjugación y transferencia (TrbJ)
AFE_1447	proteína de conjugación y transferencia (TrbE)
AFE_1448	proteína de conjugación y transferencia (TrbD)
AFE_1451	proteína conjugación tipo-P (TrbB)
AFE_1464	proteína hipotética conservada (virD2)
SISTEMA TIPO V	
AFE_0421	proteína de la familia hemaglutinina
AFE_1077	proteína familia PspA/IM30
AFE_1872	proteína autotransportadora de membrana externa, putativa
AFE_1873	autotransportador de membrana externa TapA
VIA USHER	
AFE_3017	proteína usher de membrana externa, putativa <i>(superfamilia Usher)</i>

La búsqueda *in silico* de los posibles sistemas de secreción en *A. ferrooxidans* es un paso necesario para iniciar la caracterización de las proteínas extracelulares de la bacteria, puesto que hasta ahora no existen reportes en los que se identifiquen las vías de secreción de proteínas en microorganismos acidófilos. Por otra parte, durante el proceso de anotación del genoma pueden cometerse errores, o bien, que esta anotación no entregue información concreta. En el caso de *A. ferrooxidans*, pudimos observar que algunas proteínas presentaron alto porcentaje de identidad con componentes de los sistemas tipo I y IV, a pesar de que la anotación entregaba otro tipo de información.

4.2 Identificación *in silico* de las proteínas con posible señal de secreción

Se analizó *in silico* el genoma anotado y disponible de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, en donde se buscó para cada marco abierto de lectura la presencia de posibles señales de secreción empleando el servidor SubCel 1.0. Éste incluye algoritmos para los programas SignalP 3.0, que predice la presencia de señales tipo Sec; TatP 1.0, que predice señales de tipo Tat; LipoP 1.0, que reconoce señales de tipo lipoproteicas; TMHMM 2.0, que predice proteínas con regiones de transmembrana; y, SecretomeP 2.0, que reconoce proteínas secretadas mediante la vía no clásica.

Del total de marcos abiertos de lectura analizados (3170), un total de 824 secuencias de proteínas dieron positivo a contener posibles señales de secreción de acuerdo a los programas mencionados anteriormente (Fig. 4).

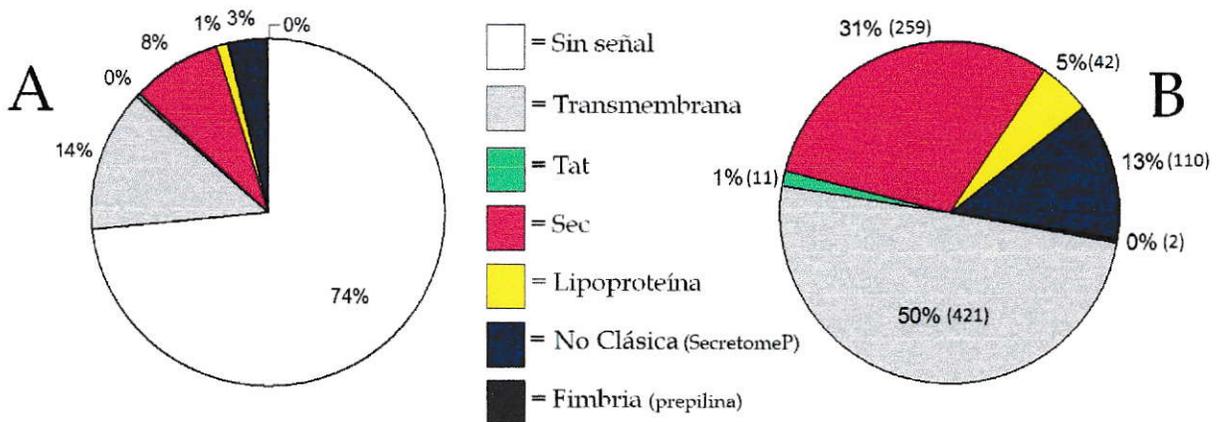


Figura 4. Predicción de la señal de secreción en las proteínas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 anotadas por el TIGR (A). En (B), la distribución de las proteínas excluyendo aquellas sin una señal reconocida. Entre paréntesis se muestra la cantidad de secuencias predichas a poseer señal de secreción para cada caso.

Destaca la cantidad de proteínas identificadas mediante el algoritmo TMHMM, que reconoce proteínas de membrana, siendo casi la mitad del total de proteínas con algún tipo de señal de secreción. Por otro lado, aparecen 259 proteínas predichas a poseer péptido señal de tipo Sec, el más común en todos los microorganismos, equivalentes al 31 % de todas las proteínas con señal de secreción. Es interesante mencionar las 110 proteínas que pueden ser secretadas mediante la vía no clásica, entre las cuales podrían encontrarse proteínas con señales aún no identificadas o pertenecientes a sistemas de secreción aún no descritos.

Estas 824 proteínas que dieron positivo a poseer algún tipo de péptido señal, y según la anotación disponible en TIGR, se agruparon de acuerdo a su función, encontrándose un 34 % de proteínas que no poseen una función asociada, siendo anotadas mayormente como proteínas hipotéticas. El 66 % de las proteínas anotadas con alguna función se analizó en la misma base de datos de TIGR y se agruparon de acuerdo a las categorías funcionales (Fig. 5), destacando la alta cantidad de proteínas relacionadas al transporte y unión, la envoltura celular, los procesos celulares, el metabolismo energético y otro grupo con función desconocida.

Los resultados de la predicción de la señal de secreción usando el servidor SubCel y la anotación del TIGR para estas 824 secuencias se adjuntan en la tabla 5 de la sección Anexos.

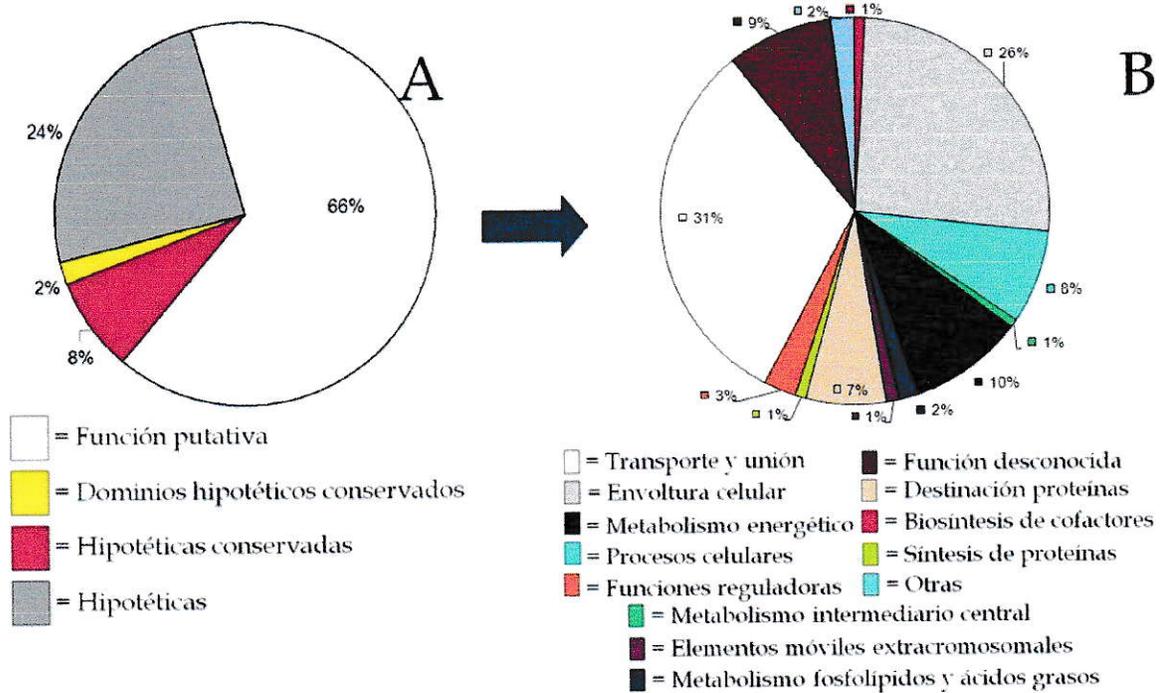


Figura 5. Análisis de las categorías funcionales de las proteínas con posible señal de secreción en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 de acuerdo a SubCel 1.0. En (A) se agrupan las proteínas de acuerdo a si éstas tienen función asociada o no, y en (B) según sus categorías funcionales.

4.3 Análisis del proteoma extracelular mediante geles bidimensionales

4.3.1 Comparación del proteoma extracelular versus un extracto total

Se crecieron cultivos aeróbicos y con agitación constante a 60 rpm en medio 9K_M y las proteínas presentes en la fracción extracelular se obtuvieron precipitando el sobrenadante de cultivo de esta cepa en fase exponencial tardía mediante el sistema PRMM, puesto que anteriormente demostramos que esta metodología presentó el mejor rendimiento de precipitación en comparación a otros protocolos (Pagliai, 2007). De este modo, comparamos las proteínas de la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* con un extracto de proteínas celulares totales de este acidófilo crecido en el mismo sustrato

(Fig. 6). Las muestras se sometieron a electroforesis bidimensional para obtener una separación eficiente de las proteínas de cada extracto. La primera dimensión consistió en un NEPHGE en gradiente de pH de 3 a 10 (O' Farrell, 1975). La segunda dimensión correspondió a un SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

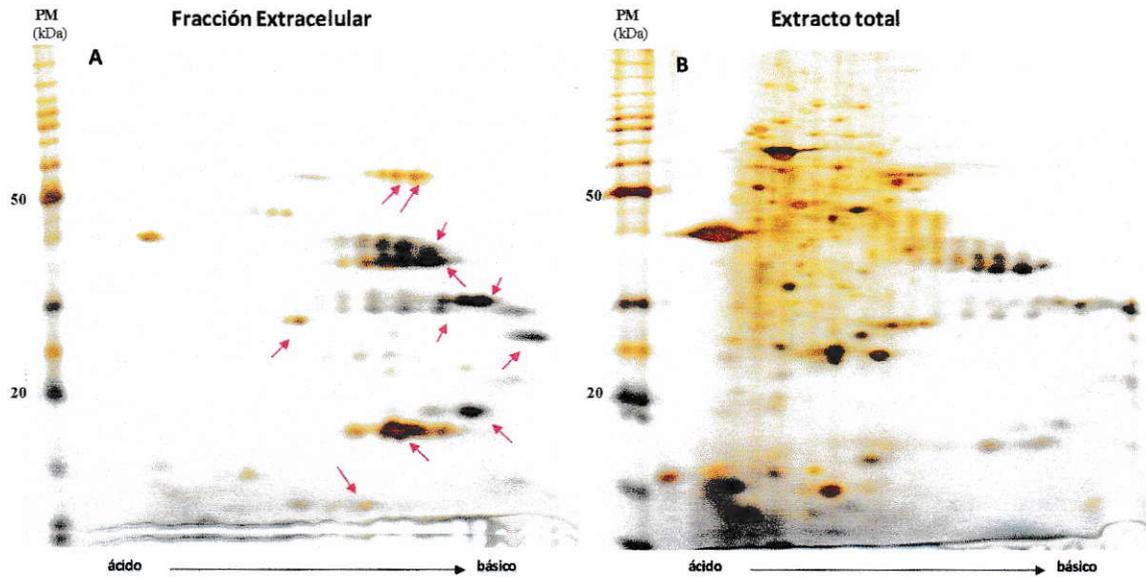


Figura 6. 2D-NEPHGE de proteínas extracelulares (A) versus las proteínas de un extracto total de células (B) de *A. ferrooxidans*. Las flechas indican las proteínas que aumentan su intensidad en la fracción extracelular.

Usando esta metodología de separación de proteínas fue posible visualizar al menos 11 proteínas que cambiaron su intensidad, aumentando en la fracción extracelular con respecto a las del extracto total de células. El perfil de proteínas en ambos geles fue muy diferente, lo cual nos dio un primer indicio de que las proteínas obtenidas desde la fracción extracelular no provenían únicamente de la lisis celular.

4.3.2 Identificación de las proteínas mayoritarias presentes en la fracción extracelular

A partir de los geles bidimensionales del proteoma extracelular de *A. ferrooxidans* teñidos con azul de Coomassie G-250 (Fig. 7), se midió la intensidad de las 12 bandas mayoritarias mediante el software *Quantity One*. Estas manchas se aislaron individualmente del gel y se secuenciaron mediante espectrometría de masas (ESI-QUAD-TOF) (Tabla 2). Pese a que la mancha #5b no era una de las más abundantes, nos llamó la atención que ésta apareciera migrando de manera muy similar junto a las manchas #5 y #5a y por esto fue incluida en el análisis.

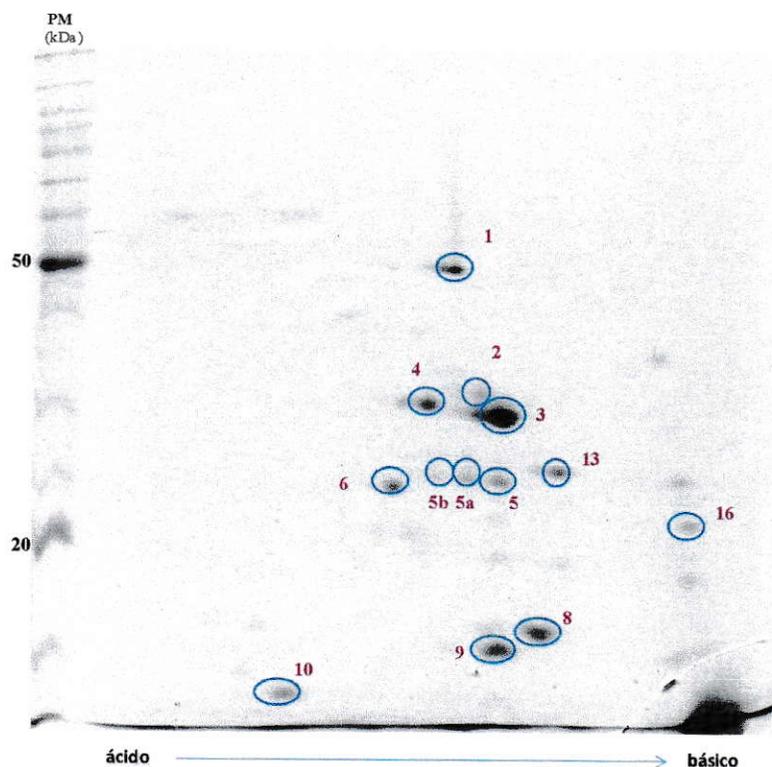


Figura 7. 2D-NEPHGE de proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental. En círculos se muestran las manchas mayoritarias presentes en 3 réplicas biológicas, las cuales se aislaron de los geles y secuenciaron para poder identificarlas.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas mediante la espectrometría de masas nos permitió identificar aquellas proteínas mayoritarias presentes en la fracción extracelular de la bacteria crecida en azufre. Para cada una de ellas se le calculó su peso molecular, su punto isoeléctrico y se buscó la presencia de posibles señales de secreción mediante herramientas bioinformáticas, y con los péptidos obtenidos en la secuenciación se determinó el porcentaje de cobertura que éstos representan en cada proteína.

Tabla 2. Lista de las proteínas mayoritarias presentes en la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental.

spot #	Nombre proteína	pM (kDa)	pl	% intensidad en gel	Señal de secreción	Score	# péptidos	% cobertura	TIGR Role Category
1	AFE_2996 proteína de membrana externa	53,1	9,15	5,5	Sec	1024	57	39,3	Envoltura celular
2	AFE_3006 proteína con dominio LysM	37,6	9,62	1,1	Sec	131	4	15,8	Función desconocida
3	AFE_2981 proteína periplasmática de unión a soluto	36,7	9,1	36,8	Sec	10310	273	48,8	Transporte y unión
4	AFE_1151 transportador ABC de fosfato, proteína periplasmática de unión a fosfato PstS	37,9	9,21	2,6	Sec	1433	54	36,6	Transporte y unión
5	AFE_2516 isomerasa cis-trans peptidil-prolil, tipo PPIC	28	9,24	2,7	Sec	832	43	43	Destino de proteínas
	AFE_0157 proteína hipotética	31,1	10,8		Sec	286	9	38,7	Hipotética
5a	AFE_2516 isomerasa cis-trans peptidil-prolil, tipo PPIC			1,5		845	41	41,9	
5b	AFE_2516 isomerasa cis-trans peptidil-prolil, tipo PPIC			1,2		437	21	36,4	
6	AFE_2982 proteína con secuencia señal Tat	29,5	6,55	3,6	Tat	425	19	32,2	Función desconocida
8	AFE_2982 proteína con secuencia señal Tat			6,7					
9	AFE_3186 rusticianina	19,9	8,85	7,5	Sec	3851	108	35,8	Metabolismo energético
10	AFE_2495 chaperonina, 10 kDa groES	10,7	5,7	3	X	247	11	63,5	Destino proteínas
13	AFE_1586 transportador ABC, proteína periplasmática de unión a sustrato	33,5	9,31	5,6	Sec	5655	181	47,3	Transporte y unión
16	AFE_3018 proteína chaperona del pili, putativa	26,6	11,5	3,7	Sec	73	8	29,1	Envoltura celular

4.4 Análisis de la fracción completa de proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans*

Finalmente, y gracias a una colaboración con el Dr. Donald Hunt de la Universidad de Virginia, analizamos la fracción completa de las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* cuando la bacteria se creció en azufre elemental. La secuenciación de

este extracto por LTQ-FT MS permitió identificar un total de 177 proteínas, las cuales se analizaron y compararon mediante el servidor SubCel 1.0. A cada una de estas secuencias se les determinó la presencia de señal de secreción, la masa molecular y el punto isoeléctrico (Tablas 3 y 4). Se observó que 92 proteínas identificadas en este extracto, equivalentes al 52 % del total, presentaron posible señal de secreción. Un resumen de la metodología empleada se muestra en la figura 8.

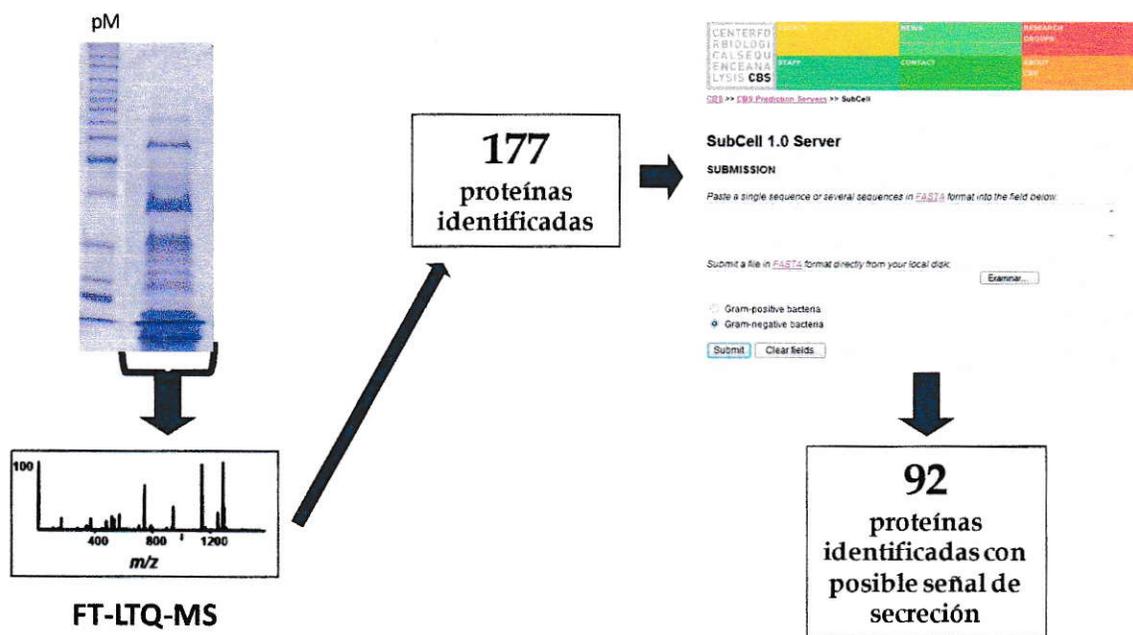


Figura 8. Identificación del proteoma extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Este extracto se separó mediante un SDS-PAGE para su posterior secuenciación por espectrometría de masas acoplado a transformada de Fourier (FT-LTQ MS). Las proteínas así identificadas se compararon con los marcos abiertos de lectura sometidos al análisis de SubCel 1.0 permitiendo determinar cuáles de estas proteínas poseen posibles señales de secreción.

Esta secuenciación permitió confirmar la presencia de 73 proteínas que hasta la fecha no han sido identificadas en otro espacio subcelular. Las otras 104 proteínas habían sido previamente identificadas también en el espacio periplasmático de esta

bacteria crecida en azufre elemental (Chi y col, 2007). La coincidencia de estos resultados puede ser explicada porque muchas de estas proteínas aparecen en el periplasma como precursores de proteínas secretadas, o bien porque son proteínas periplasmáticas o asociadas a la membrana que se liberan al espacio extracelular.

Tabla 3. Proteínas con señal de secreción identificadas en la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre.

AFE	pM (kDa)	pI	Señal de secreción	Nombre Proteína
Destinación de proteínas (7)				
259	53,4	7,3	SignalP	serin proteasa, familia DO/DeqQ
1199	32,2	9,3	SignalP	proteína hflC (hflC)
1214	25,9	5,88	SecretomeP	proteína de intercambio tiol:disulfuro, putativa
1685	49,7	7,14	SignalP	serin proteasa, familia DO/DeqQ
2129	55,3	8,53	SignalP	isomerasa cis-trans peptidil-prolil D
2514	50,8	8,93	SignalP	peptidasa carboxi-terminal (ctpA)
2516	28	9,24	SignalP	isomerasa cis-trans peptidil-prolil, tipo PPIC
Envoltura celular (16)				
158	15,5	11,3	LipoP	lipoproteína, putativa
186	41,3	8,76	SignalP	carboxipeptidasa D-alanil-D-alanina
297	10,3	9,42	LipoP	lipoproteína, putativa
535	42	9,32	SignalP	carboxipeptidasa D-alanil-D-alanina
560	47	8,59	SignalP	proteína de membrana externa, familia OMPP1/FadL/TodX
745	40,7	9,37	SecretomeP	lipoproteína, putativa
850	16,2	8,49	LipoP	lipoproteína, putativa
2087	57,4	7,38	SignalP	proteína periplasmática de biosíntesis de glucanos, MdoG
2445	13,6	10,3	LipoP	lipoproteína, putativa
2621	17,7	5,09	SignalP	pilina, putativa
2654	36,9	5,92	SignalP	proteína de membrana externa, familia OMPP1/FadL/TodX
2722	22,9	9,4	SignalP	proteína de la familia OmpA
2882	65,1	8,34	LipoP	lipoproteína, putativa
2953	19,6	6,4	LipoP	lipoproteína asociada al peptidoglicano, putativa
2996	53,1	9,15	SignalP	proteína de membrana externa
3018	26,6	11,5	SignalP	proteína chaperona del pili, putativa
Función desconocida (10)				
847	43,2	9,61	SignalP	proteína con dominio repetido PQQ
851	22,2	8,4	SignalP	proteína con dominio dsbG
1147	24,2	9,22	LipoP	proteína con dominio dsbG
1154	41,7	7,82	SignalP	proteína con dominio repetido PQQ
1396	78,3	9,36	TatP	proteína con señal de la vía Tat
2576	23,4	9,23	SignalP	proteína de la familia tipo YceI
2650	37,6	7,77	SignalP	proteína de la familia ErtK/YbiS/YcfS/YnhG
2974	29,5	6,24	TatP	proteína con señal de la vía Tat
2982	29,5	6,55	TatP	proteína con señal de la vía Tat
3006	37,6	9,62	SignalP	proteína con domino LysM
Metabolismo intermediario central (1)				
2979	23,8	9,36	SignalP	proteína inducida en azufre/pirita/tiosulfato

continuación...

AFE	pM (kDa)	pI	Señal de secreción	Nombre Proteína
Metabolismo energético (7)				
373	10,8	9	SecretomeP	oxidasa de hierro (iro)
376	22,6	8,75	SignalP	reductasa ubiquinol-citocromo C, subunidad hierro-azufre (petA-2)
378	22,9	9,75	SignalP	citocromo c4 (cycA-2)
555	15	4,74	SecretomeP	proteína del sistema de clivaje de glicina, putativa
1655	23,2	9,77	SignalP	citocromo c552, putativo
3180	25,2	9,2	SignalP	citocromo c552 (cyc1)
3186	19,9	8,85	SignalP	rusticianina (rus)
Procesos celulares (5)				
1390	40	7,75	SignalP	proteína de conjugación y transferencia, putativa (TrbG1)
1445	26,2	4,52	SignalP	proteína de conjugación y transferencia (TrbJ)
2607	28	8,66	LipoP	lipoproteína de competencia ComL, putativa
2865	23,5	9,33	SignalP	proteína de tolerancia a tolueno, putativa
2958	32,9	10,2	SignalP	proteína TolA
Proteínas de transporte y unión (14)				
735	50,8	9,29	SignalP	proteína de membrana externa de eflujo
736	37,7	9,04	LipoP	transportador de eflujo, familia RND, subunidad MFP
848	40,7	7,05	SignalP	porina selectiva de carbohidratos, familia OprB
1151	37,9	9,21	SignalP	transportador ABC de fosfato, proteína periplasmática de unión a fosfato PstS
1256	25,2	9,08	SignalP	proteína de tolerancia a tolueno, putativa
1586	33,5	9,31	SignalP	transportador ABC, proteína periplasmática de unión a sustrato, putativa
1590	38,4	9,72	SignalP	transportador ABC de compuestos de hierro, proteína periplasmática de unión a hierro
1631	20,1	9,69	SignalP	proteína de membrana externa, familia OmpH
1648	36,2	9,41	SignalP	transportador ABC de fosfato, proteína periplasmática de unión a fosfato (pstS-2)
2438	31,7	8,51	SignalP	transportador ABC de cationes, proteína periplasmática de unión a cationes, putativa
2771	36,4	8,89	SignalP	proteína de secreción, familia HlyD
2957	44,7	7,85	SignalP	proteína con repetidos del sistema propulsor beta tol-pal TolB
2975	36,6	8,73	SignalP	proteína periplasmática de unión a soluto, putativa
2981	36,7	9,1	SignalP	proteína periplasmática de unión a soluto, putativa
Síntesis de proteínas (2)				
2690	19	9,6	SecretomeP	proteína ribosomal L6 (rplF)
2717	15	9,84	SecretomeP	proteína ribosomal L11 (rplK)
ORFs no anotado por TIGR (5)*				
51	15,5	7,25	SignalP	gene hipotético predicho por Glimmer
675	13,5	10,2	SignalP	proteína de resistencia a cobre CopC [<i>Burkholderia fungorum</i>]
1450	20,5	9,4	SignalP	proteína putativa [<i>Aquifex aeolicus</i>]
4302	16,8	9,33	SignalP	gene hipotético predicho por Glimmer
4616	32,2	9,99	SecretomeP	proteína hipotética [<i>Ralstonia metallidurans</i>]

continuación...

AFE	pM (kDa)	pI	Señal de secreción	Nombre Proteína
<i>Proteínas hipotéticas (25)</i>				
136	65,9	9,89	SignalP	proteína hipotética conservada
153	16,5	9,12	SecretomeP	proteína hipotética
157	31,2	10,8	SignalP	proteína hipotética
292	15,5	9,3	SignalP	proteína hipotética
457	15,4	9,74	SignalP	proteína hipotética
610	10,9	12,2	SignalP	proteína hipotética
841	27,2	9,9	SignalP	proteína hipotética conservada
981	23,5	8,94	SignalP	proteína hipotética conservada
1023	74,5	5,26	SecretomeP	proteína con dominio conservado
1110	16,1	10	SignalP	proteína hipotética
1158	33,4	6,54	TMHMM	proteína hipotética conservada
1466	34,9	5,93	SecretomeP	proteína hipotética
2236	11,2	9,52	SignalP	proteína hipotética conservada
2398	23,2	9,55	LipoP	proteína hipotética
2429	46,3	9,04	SignalP	proteína hipotética
2434	44,5	8,78	SignalP	proteína hipotética
2570	17,7	9,83	SignalP	proteína hipotética conservada
2910	52,2	9,31	SignalP	proteína con dominio conservado
2928	14,8	7,8	SignalP	proteína hipotética
2954	28,7	8,91	SignalP	proteína hipotética conservada
3060	17	10,2	SecretomeP	proteína hipotética
3099	21,1	8,54	SignalP	proteína hipotética
3106	23,7	10,6	SignalP	proteína hipotética
3181	19,9	8,54	SignalP	proteína hipotética conservada
3197	14,5	9,48	SignalP	proteína hipotética

Los nombres de las proteínas corresponden a los asignados por el TIGR. AFE, proteínas predichas desde "TIGR – Comprehensive Microbial Resource". pM, peso molecular. pI, punto isoelectrico. Este detalle también se aplica para la tabla 4.

Tabla 4. Proteínas sin señal de secreción identificadas en la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre.

AFE	pM (kDa)	pI	Nombre Proteína
Biosíntesis de aminoácidos (6)			
1412	58,6	6,04	deshidratasa ácido-dihidroxi (ilvD-1)
2293	36,4	6,02	reductoisomerasa ceto-ácida (ilvC)
2491	34,4	5,85	aminotransferasa de aminoácidos (ilvE)
2506	42,1	5,12	sintetasa de la S-adenosilmetionina (metK)
2571	51,8	5,1	sintetasa de la glutamina, tipo I (glnA)
2740	87,9	5,86	S-metiltransferasa de homocisteína (S-metiltetrahidropterilglutamato) (metE)
Biosíntesis de cofactores (2)			
716	44,7	9,61	hidroxilasa 2-octaprenil-6-metoxifenol (ubiH-2)
2411	24,9	6,3	oxidasa de piridoxamina 5-fosfato (pdxH)
Destino de proteínas (8)			
75	48,2	5,98	proteína supervivencia SurA (surA)
162	31,8	8,54	proteína de intercambio tiol:disulfuro DsbG, putativa
439	19	5,12	co-chaperona GrpE (grpE)
440	68,2	5,04	chaperona DnaK (dnaK)
1009	16,9	6,2	proteína de shock de calor, familia Hsp20
1437	16,7	5,43	proteína de shock de calor, familia Hsp20
2496	58,6	5,2	chaperonina, 60 kDa (groEL)
2655	25,8	9,97	lipoproteína de membrana externa LolA, putativa
Envoltura celular (1)			
1159	27,1	8,87	proteína de biogénesis/estabilidad del pili tipo IV PilW (pilF)
Función desconocida (5)			
444	38,2	5,67	proteína Mrp
549	37,7	5,58	oxidoreductasa nucleótido-disulfuro de piridina
1369	33,2	9,6	proteína de unión a GTP
1408	87,9	5,34	proteína con dominio del factor von Willebrand tipo A
2665	27,5	5,3	proteína con dominio AhpC/TSA familia/glutaredoxina
Funciones regulatorias (2)			
1202	9,8	5,24	chaperona RNA Hfq (hfq)
2577	21,8	6,12	proteína represora de unión a trp (wrbA)
Metabolismo de DNA (3)			
263	16,9	5,31	proteína de unión a hebra simple (ssb-1)
2130	9,4	9,77	proteína de unión a DNA HU (hup)
2130	11,3	9	factor de integración al hospedero, subunidad beta (ihfB)
Metabolismo energético (12)			
41	35,6	5,36	piruvato deshidrogenasa, componente E1, subunidad beta (pdhB)
241	9,5	7,76	proteína de la familia de las tioredoxinas
942	50,4	5,69	carboxilasa de ribulosa bifosfato, subunidad larga 2 (cbbL2)
1242	23,3	5,15	ferredoxina
1394	52,8	5,8	carboxilasa de ribulosa bifosfato, subunidad larga (cbbL2)
2383	11,9	4,59	tioredoxina (trx)
2502	32,8	5,95	fosforibuloquinasa (cbbP)
2504	50,6	5,44	adenosilhomocisteinasa (ahcY)
2618	39,5	5,4	transaldolasa (tal)
2837	37,2	5,5	fructosa-1-6-bisfosfatasa (fbp)
3084	51,6	6,17	piruvato quinasa II (pykA)
3085	38,4	5,76	fructosa-bisfosfato aldolasa, clase II (fba)

continuación...

AFE	pM (kDa)	pI	Nombre Proteína
Metabolismo intermediario central (2)			
1293	47,4	6,33	reductasa de sulfuro-quinonas, putativa
2545	19,1	5,07	pirofosfatasa inorgánica (ppa)
Procesos celulares (8)			
443	12	6,08	proteína de la familia de las monooxigenasas
1077	26,5	4,87	familia PspA/IM30
1188	22,9	6,05	superóxido dismutasa (sod)
1391	24,4	7,14	proteína de conjugación y transferencia (TrbF)
1399	9,2	8,21	peptido B del carboxisoma
1400	9,9	5,3	peptido del carboxisoma
2062	22,4	5,69	antioxidante, familia AhpC/Tsa
2450	7,4	6,72	proteína de shock frío
Proteínas de transporte y unión (1)			
1539	7,2	5,77	proteína de unión a molibdeno-pterina
Proteínas hipotéticas (10)			
411	23,2	9,69	proteína hipotética conservada
542	11,9	9,69	proteína hipotética
545	8,3	6,19	proteína hipotética conservada
564	12,8	4,25	proteína hipotética
714	9,5	4,77	proteína hipotética conservada
1425	39,4	5,64	proteína hipotética
1469	43,7	5,86	proteína hipotética
1500	13,3	9,88	proteína hipotética
2775	14,5	11,1	proteína con dominio conservado
2969	8,9	6,87	proteína hipotética conservada
Purinas, pirimidinas y nucleótidos (1)			
1161	15	5,5	nucleósido difosfato quinasa (ndk)
Síntesis de proteínas (24)			
36	14,5	11,2	proteína ribosomal S9 (rpsI)
285	10,6	10,5	proteína ribosomal S18 (rpS18)
435	9,1	11,2	proteína ribosomal L28 (rpmB)
492	13,7	11,7	proteína ribosomal L20 (rplT)
761	8,7	11,4	proteína ribosomal S21 (rpsU)
1637	20,8	6,22	factor de reciclaje del ribosoma (frr)
1640	28,1	5,71	proteína ribosomal S2 (rpsB)
2646	92,8	5,92	factor de inicio de la traducción IF-2 (infB)
2677	14,2	11,1	proteína ribosomal L17 (rplQ)
2680	14,2	11,4	proteína ribosomal S11 (rpsK)
2681	13,4	10,9	proteína ribosomal S13 (rpsM)
2687	7,1	10,5	proteína ribosomal L30 (rpmD)
2688	18,7	10,5	proteína ribosomal S5 (rpsE)
2693	20,1	9,64	proteína ribosomal L5 (rplE)
2695	13,4	10,5	proteína ribosomal L14 (rplN)
2696	10,4	9,47	proteína ribosomal S17 (rpS17)
2698	15,5	11,6	proteína ribosomal L16 (rplP)
2701	10,3	11,3	proteína ribosomal S19 (rpsS)
2705	22,4	11,2	proteína ribosomal L3 (rplC)
2707	43,2	5,35	factor de elongación de la traducción Tu (tuf-1)
2709	18,1	10,5	proteína ribosomal S7 (rpsG)
2710	13,7	11,5	proteína ribosomal S12 (rpsL)
2715	18,7	10,3	proteína ribosomal L10 (rplJ)
2716	24,3	9,69	proteína ribosomal L1 (rplA)

Al relacionar la masa molecular con el punto isoeléctrico de estas 177 proteínas, en lo que podría denominarse un gel 2D *in silico*, se pudo ver la mayoritaria presencia, en aquellas con señal de secreción, de proteínas con un punto isoeléctrico básico y de tamaño menor a 60 kDa (Fig. 9A).

Si consideramos únicamente las 73 proteínas hasta ahora exclusivas de esta fracción extracelular, la relación péptido señal-basicidad se hace más evidente, siendo la mayoría de las proteínas con posible señal de secreción proteínas con un punto isoeléctrico básico (Fig. 9B). El resto de las proteínas con un punto isoeléctrico básico corresponde en su mayoría a proteínas ribosomales, siendo la mayoría de bajo peso molecular (menor a 25 kDa).

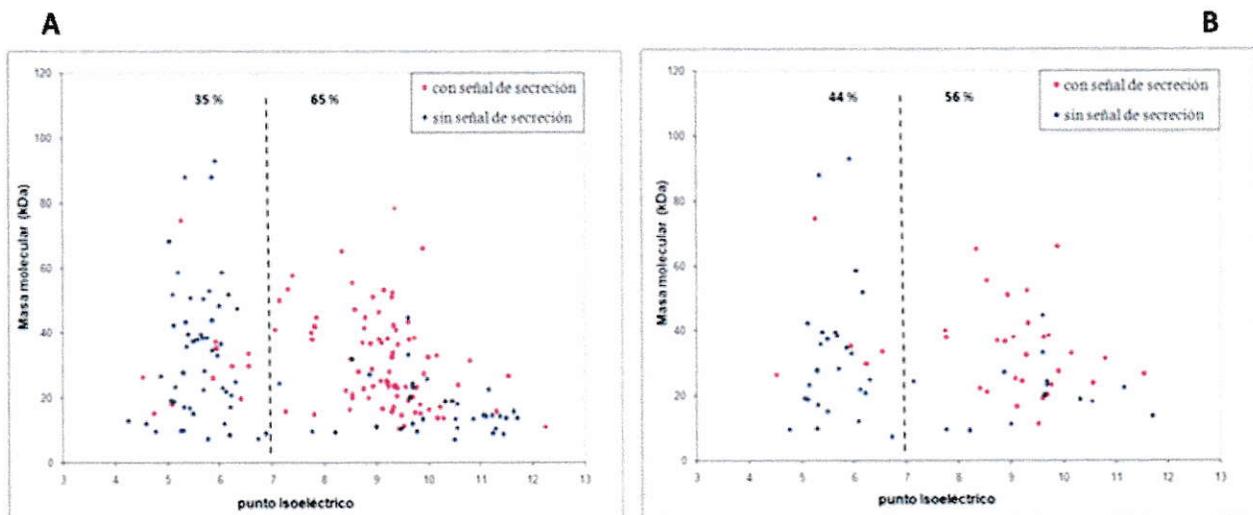


Figura 9. Relación entre el punto isoeléctrico y la masa molecular de las 177 proteínas encontradas en la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre (A). En (B) se muestran las 73 proteínas encontradas en la fracción extracelular y que hasta ahora no han sido identificadas en otro compartimento de la bacteria

DISCUSIÓN

5.1 Los sistemas de secreción de proteínas en *A. ferrooxidans*

Los resultados *in silico*, obtenidos a partir de las bases de datos del CBS y del KEGG Pathway, nos permitieron sugerir la presencia de al menos 4 sistemas de secreción de proteínas en la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, siendo estos los tipos I, II, IV y V, la vía Usher, y adicionalmente, se encontraron proteínas que pueden seguir la vía de secreción no clásica (Fig. 10).

El sistema tipo I secreta proteínas directamente desde el citoplasma hacia el medio extracelular empleando solamente 3 componentes, cuyos genes se encontraron en el genoma de la bacteria. Las proteínas secretadas mediante este sistema no poseen un péptido señal en el extremo N-terminal, y en vez de ello poseen una secuencia señal en el extremo C-terminal (Henderson *et al.*, 2004). Los actuales servidores de predicción de señal de secreción no están diseñados para reconocer este tipo de dominios en las secuencias de aminoácidos, por lo que no nos fue posible determinar cuáles proteínas pueden atravesar la barrera celular de las membranas mediante esta vía.

En el caso del sistema de secreción tipo II todos los genes que codifican para los componentes necesarios para la translocación a través de la membrana interna así como las señales peptidasas se encontraron en el genoma de *A. ferrooxidans*. Sin embargo, no se encontraron todas las proteínas responsables del transporte a través del periplasma y de la membrana externa, que en su conjunto se definen como el secretón. Esto puede

significar que estos componentes ausentes no son esenciales para lograr la secreción de proteínas en *A. ferrooxidans*.

Reportes previos, confirmados con el análisis bioinformático efectuado en esta Tesis, revelaron que *A. ferrooxidans* contiene homólogos para casi todos los genes *trb* y *tra* pertenecientes al sistema de secreción tipo IV y que son requeridos para la conjugación del DNA en *A. tumefaciens* (Barreto y col, 2003). En nuestro laboratorio reportamos la expresión de estos genes del sistema tipo IV mediante macroarreglos de DNA y PCR en tiempo real, lo cual sugiere fuertemente que este sistema podría ser funcional en *A. ferrooxidans*, teniendo una posible participación en la formación de biopelículas y en el intercambio de macromoléculas como el DNA durante una conjugación (Valenzuela y col, 2006).

En *A. ferrooxidans* encontramos un grupo de genes que codifican para proteínas con dominios conservados de la familia de los autotransportadores, pertenecientes al sistema de secreción tipo V, y que se agrupan según la clasificación funcional del TIGR en una categoría relacionada al tráfico y secreción de péptidos y proteínas.

La vía Usher se usa para ensamblar proteínas periplasmáticas en las estructuras de tipo fimbria o pili que median la adherencia de las bacterias a diversos tejidos y promueve la formación de microcolonias y biopelículas (Preston y col, 2005). En su mecanismo actúan dos componentes concertados, una chaperona periplasmática y una proteína de membrana externa denominada Usher (Kostakioti y col, 2005). Precisamente

una proteína de la membrana externa de *A. ferrooxidans* presentó una alta identidad con la proteína PapC, que corresponde a la proteína Usher.

El análisis *in silico* mostró la posible presencia de proteínas que comparten dos características en común: su presencia en el espacio extracelular y la ausencia de señales de secreción clásicas o de motivos que gobiernen su secreción (Bendtsen *y col*, 2005a), siendo entonces este grupo de proteínas las que se podrían calificar como secretadas por la vía no clásica de secreción.

Muchas bacterias Gram-negativas liberan al exterior vesículas que contienen proteínas en su interior, aparentemente sin la participación de algún factor de secreción conocido (Economou *y col*, 2006). Este hecho también podría explicar la presencia de algunas proteínas citoplasmáticas o sin señal de secreción reconocida en la fracción extracelular de *A. ferrooxidans*.

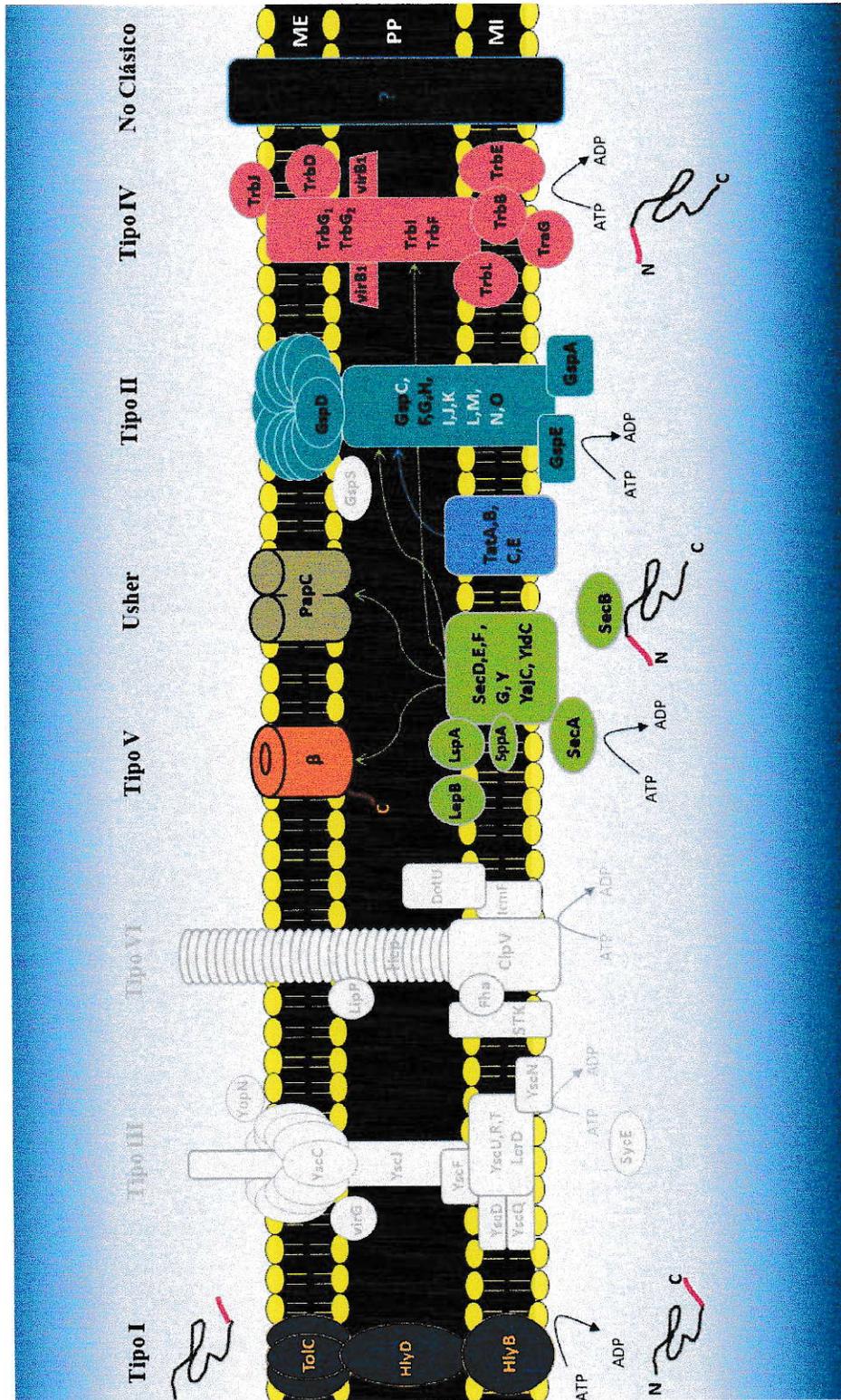


Figura 10. Resumen de los posibles sistemas de secreción de proteínas presentes en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En gris se destacan los sistemas o los componentes no encontrados en la bacteria

5.2 Identificación *in silico* de las proteínas con posible señal de secreción

Una primera aproximación en la identificación de las proteínas extracelulares fue analizar el genoma disponible de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans* mediante el uso de un servidor que predice señales de secreción como es SubCel 1.0 (Bendtsen *y col*, 2005b). Empleando este servidor encontramos que del total de proteínas anotadas por el TIGR, el 26 % parecieran tener alguna señal que les permite abandonar el citoplasma, siendo sus posibles destinos las membranas interna o externa, el periplasma o el espacio extracelular. Cabe destacar que este servidor sólo reconoce los péptidos señales que gobiernan el tránsito de proteínas a través de la membrana mediante las translocasas Sec o Tat, y no incluye el reconocimiento de señales de secreción para los otros sistemas.

La mayor cantidad de proteínas predichas a abandonar el citoplasma fueron reconocidas por el algoritmo TMHMM que predice proteínas de membrana (421 proteínas → 14 %), las cuales deberían permanecer en la membrana interna de la bacteria (Krogh *y col*, 2001; Käll *y col*, 2004). Por otro lado, 259 proteínas, equivalentes al 8 % del genoma de la bacteria, abandonan el citoplasma mediante la translocasa Sec, cuyos componentes se encuentran altamente conservados (Tjalsma *y col*, 2004). Las proteínas que atraviesan la membrana interna mediante las translocasas Sec o Tat pueden ser destinadas finalmente al periplasma, membrana externa o al medio extracelular.

Al revisar la base de datos del CBS se pudo comparar estos resultados *in silico* frente a los obtenidos en otros genomas de bacterias ya analizados. El 26 % de las

proteínas extracitoplasmáticas en *A. ferrooxidans* y la cantidad de cada uno de los tipos de señal de secreción fueron valores coincidentes con lo encontrado en la gran mayoría de los genomas de las bacterias depositadas en esta base de datos.

La identificación de estas señales de secreción en las secuencias de aminoácidos de las proteínas de *A. ferrooxidans* nos indica que éstas abandonan el citoplasma. Sin embargo, no predicen la condición o momento en el cual este hecho ocurre ni la localización subcelular final de cada una de estas proteínas. No obstante, este análisis *in silico* puede ser uno de los primeros pasos en la identificación y caracterización del proteoma extracelular, entendiendo como proteoma a la totalidad de proteínas expresadas por un genoma, célula o tejido en un tiempo y condición dada.

Una manera de abordar esta desventaja fue analizar mediante categorías funcionales las 824 proteínas predichas a abandonar el citoplasma. En esta etapa encontramos que el 66 % de éstas presenta alguna función putativa, destacándose principalmente los roles de proteínas de transporte y unión, con subroles para los transportadores ABC, los cationes, los aniones y las porinas; el de envoltura celular, con los subroles de biosíntesis y degradación del peptidoglicano, los polisacáridos y los lipopolisacáridos; el metabolismo energético, con el subrol de transporte de electrones; el de procesos celulares, con los subroles de división celular, la conjugación y la destoxificación; y un grupo de proteínas con función desconocida.

Es interesante destacar que el restante 34 % de las proteínas predichas a abandonar el citoplasma no tienen una función asociada y se anotaron en su gran

mayoría como proteínas hipotéticas, de las cuales la mayoría son únicas de *A. ferrooxidans*. Sin embargo, en la medida que nuevos genomas son secuenciados junto con la identificación de nuevas funciones en genomas ya anotados, este número de proteínas hipotéticas debiese disminuir, sumado al hecho que la anotación de este genoma no se ha actualizado desde la fecha que se liberó en 2005.

Todos estos resultados *in silico* nos ayudan a identificar globalmente grupos de proteínas, que comparten ciertas características y permite comparaciones con otros microorganismos a nivel de genomas o secuencias de aminoácidos. Sin embargo, para nuestro enfoque relacionado con la identificación de un proteoma en especial, como es el extracelular de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental, se requiere una serie de nuevos experimentos y estudios. Los resultados *in silico* nos ofrecen una base para comenzar el estudio experimental en la identificación y caracterización del secretoma de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*.

5.3 Análisis proteómicos mediante geles bidimensionales

La primera etapa de la aproximación proteómica en el estudio de la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 fue abordada durante el Seminario de Título (Pagliai, 2007), en donde se demostró que el protocolo más eficiente para concentrar y recuperar las proteínas extracelulares correspondió a la precipitación en condiciones ácidas mediante el sistema PRMM, logrando en promedio precipitar más del 60 % del total de las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo. Esto no fue

un paso sencillo considerando las condiciones ácidas del sobrenadante de cultivo de la bacteria y la baja concentración de proteínas de la fracción extracelular, sumado al hecho que algunos protocolos ampliamente usados para concentrar proteínas no fueron eficientes. El perfil electroforético de las proteínas recuperadas mediante el sistema PRMM no difirió del obtenido previo a la precipitación, lo que indica que no se pierden proteínas específicas por la ejecución de este protocolo (Pagliai, 2007).

El perfil de proteínas en geles bidimensionales fue muy diferente al momento de comparar las proteínas extracelulares versus las proteínas totales de un extracto crudo originado por la sonicación de células de *A. ferrooxidans*. Varios estudios del proteoma extracelular en otras bacterias plantean la interrogante sobre la presencia de un número importante de proteínas descritas como citoplasmáticas en la fracción extracelular sin llegar a una respuesta clara para esta inquietud (Tjalsma y col, 2004). Estas diferencias observadas nos dieron los primeros indicios de que las proteínas recuperadas desde el sobrenadante de cultivo no provienen solamente de la lisis celular sino posiblemente debido a otros mecanismos más sofisticados en la secreción de proteínas (Tjalsma y col, 2004; Pagliai, 2007).

La secuenciación por espectrometría de masas ESI-QUAD-TOF de las manchas de un gel bidimensional de la fracción extracelular de proteínas de *A. ferrooxidans* nos permitió identificar cuáles de ellas eran las más abundantes de este proteoma extracelular así como plantear qué posibles funciones son las más representadas en este espacio celular.

En términos generales, la cantidad de manchas observadas en los geles bidimensionales de la fracción extracelular fue mucho menor al número de proteínas identificadas en el mismo extracto mediante proteómica a gran escala. No obstante, las proteínas aquí identificadas corresponden a las mayoritarias de la fracción extracelular de la bacteria crecida en azufre.

5.3.1 Proteínas de transporte y unión

La función proteínas de transporte y unión fue el grupo de proteínas más representado en esta secuenciación de las manchas más abundantes en un gel bidimensional de la fracción extracelular, en donde el AFE_2981 (mancha #3) apareció como la proteína más abundante de esta fracción, representando más del 35 % del total. Esta proteína contiene un dominio conservado presente en una superfamilia de proteínas periplasmáticas de unión (PBP), las cuales se han descrito como participantes en sistemas de transporte de sustratos como los aminoácidos, los péptidos, los azúcares y los iones inorgánicos, muchas veces asociados a la membrana (Marchler-Bauer *y col*, 2007). Efectuando un BLASTp contra la base de datos de proteínas en el sitio de NCBI, los hits más significativos corresponden a proteínas que unen sulfato y a un transportador que une molibdato.

Otra proteína abundante de esta fracción con casi el 6 % del total correspondió al AFE_1586 (mancha #13), que al igual que el AFE_2981 posee este dominio conservado PBP. Completando la información anterior, está descrito que las PBPs tienen dos funciones principales, que son unir el sustrato e interactuar con un complejo asociado a

la membrana. El hit más significativo obtenido al comparar esta proteína mediante BLASTp fue una proteína extracelular de unión a soluto en la bacteria Gram-negativa *Polaromonas spp.*

La menos abundante de este grupo de proteínas fue el AFE_1151 (mancha #4), una proteína de unión y transporte de fosfato denominada PstS1, la cual formaría parte de un aparente regulón Pho (Vera y col, 2003). En la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis* también se encontró mediante análisis proteómicos que esta proteína no sólo estaba altamente inducida en carencia de fosfato, sino que estaba presente en el medio extracelular de la bacteria (Antelmann y col, 2000).

5.3.2 Plegamiento de proteínas

Se ha descrito en varios reportes de proteomas extracelulares la presencia de factores de plegamiento de proteínas como las chaperonas, proteasas y proteínas catalizadoras del plegamiento, las cuales se agruparon en el rol de destino de proteínas de acuerdo a la anotación del TIGR. En las proteínas más abundantes secuenciadas de la fracción extracelular de *A. ferrooxidans* encontramos una PPIasa (peptidil-prolil isomerasa) correspondiente al AFE_2516 (mancha #5), la cual facilita la isomerización *cis-trans* de residuos de prolina facilitando el plegamiento de las proteínas (Shiener-Fischer y col, 2001). Es interesante destacar que esta proteína pareciera tener algún tipo de modificación post-traducciona puesto que en un gel bidimensional aparece migrando en distintos puntos isoeléctricos, lo cual fue confirmado secuenciando las dos manchas más abundantes aledañas al lugar donde se obtuvo la mancha original (manchas #5_a y

#5_b). Está reportado que una PPIasa es secretada en la bacteria Gram-negativa *Helicobacter pylori*, la cual tendría relación con la activación de macrófagos en las células epiteliales gástricas (Kim y col, 2002). De igual manera se encontró una PPIasa en la fracción extracelular de la bacteria Gram-negativa patógena de plantas *Xylella fastidiosa* (Smolka y col, 2003).

Otra proteína encontrada en la fracción extracelular perteneciente a este grupo fue el AFE_2495 (mancha #10) correspondiente a la GroES, una chaperona citoplasmática que colabora con GroEL en el correcto ensamblaje de las proteínas. Estas proteínas, junto con otras chaperonas, han sido encontradas en muchos proteomas extracelulares en otras bacterias, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual pueden abandonar el citoplasma y la función que pudieran desempeñar en dicho espacio (Antelmann y col, 2001; Kim y col, 2002; Watt y col, 2005)

5.3.3 Envoltura celular

Dos de las proteínas más abundantes de la fracción extracelular se agruparon como pertenecientes al grupo de proteínas relacionadas a la biogénesis de la envoltura celular. La más abundante de éstas, representando más del 5 % del total, correspondió al AFE_2996 (mancha #1) identificada por Buonfiglio y col (1999) como una proteína de membrana externa que se induce en azufre, pero que recientemente ha sido descrita como una tetrionato hidrolasa (Kanao y col, 2007). Otros hits según un BLASTp contra la base de datos del sitio NCBI correspondieron a una tetrionato hidrolasa de *A. caldus*, una quinoproteína deshidrogenasa de la arquea *Picrophilus torridus* y una

proteína de la superficie celular en la arquea alcalófila *Natronomonas pharaonis*. Esta proteína contiene un dominio conservado PQQ_DH que corresponde a grupos de deshidrogenasas que usan como cofactor a quinolinas quinonas como las etanol, las metano y las glucosa deshidrogenasas.

La otra proteína que pertenecería a este grupo fue el AFE_3018 (mancha #16), una chaperona putativa del pili asociada al ensamblaje de éste. Este AFE fue catalogado como una proteína de la superficie de la bacteria según la anotación del TIGR y como una chaperona involucrada en la biogénesis del pili según el Gene Ontology.

5.3.4 Proteínas de función desconocida

En la fracción extracelular se identificaron tres proteínas abundantes que según el TIGR son de función aún desconocida. La más abundante de éstas fue el AFE_2982 (manchas #6 y #8), una proteína que presenta señal de secreción de tipo TAT, cuyos únicos hits empleando la herramienta BLASTp correspondieron a proteínas hipotéticas en diferentes microorganismos sin dominios conservados reconocidos. Sin embargo, a algunos de estos hits se les identificó un dominio DUF, el cual es un dominio conservado pero con función desconocida (Marchler-Bauer *et al*, 2007), cuya estructura es similar a la de las deshidrogenasas, las amidohidrolasas y las oxidoreductasas. Sin embargo, análisis estructurales confirmaron que no pertenece a estas familias. Es interesante que esta proteína apareciera en dos de las manchas más abundantes en el gel bidimensional, pudiendo ser que la proteína de menor peso molecular y la más abundante (6,7 % del total) corresponde a una variante con modificaciones post

traduccionales y que pudiera ser la proteína activa, o bien, que sea parte de una degradación por proteasas.

La otra proteína desconocida, y una de las menos abundantes de este grupo de proteínas secuenciadas fue el AFE_3006 (mancha #2), que presenta un dominio conservado de una superfamilia de proteínas LysM que se ha encontrado en una variedad de enzimas que participan en la degradación de la pared celular y pueden tener sitios de unión al peptidoglicano. Presentó alta identidad de secuencia con algunas proteínas hipotéticas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las restantes proteínas correspondieron al AFE_3186 y al AFE_0157. El primero (mancha #9) corresponde a la rusticianina, una proteína muy abundante del periplasma que participa en la oxidación del ion ferroso. No obstante, no sabemos qué función puede cumplir cuando la bacteria crece en azufre elemental ni en el espacio extracelular. El segundo AFE es una proteína hipotética a la cual no se le detectaron dominios conservados y apareció en los resultados obtenidos al secuenciar la mancha #5, por lo que podemos suponer que ambas proteínas co-migraron en el gel bidimensional.

El perfil de las proteínas más abundantes de la fracción extracelular fue diferente comparado con una preparación de proteínas periplasmáticas de la bacteria crecida en el mismo sustrato energético (Valenzuela, 2007). Las manchas más intensas identificadas en el periplasma no coincidieron con lo observado en las proteínas recuperadas desde el espacio extracelular, y en algunos casos proteínas abundantes del periplasma no fueron detectadas en la fracción extracelular. Esto apoya la idea de que la presencia de estas

proteínas en el espacio extracelular puede explicarse por mecanismos de secreción y no solamente por la lisis celular.

5.4 Identificación de la fracción extracelular completa de *A. ferrooxidans* crecido en azufre

La identificación a gran escala de las proteínas extracelulares se logró extrayendo y secuenciando todas las bandas presentes en un gel monodimensional de proteínas del sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* precipitadas empleando el sistema PRMM. Usando espectrometría de masas LTQ-FT se identificaron en este extracto 177 proteínas, las cuales conforman el proteoma extracelular completo de *A. ferrooxidans* crecido en azufre. De éstas, el 52 % presentó posible señal de secreción, mientras que el restante 48 % no se le identificó algún tipo de señal de acuerdo a las herramientas de predicción utilizadas en este estudio, pudiendo estas proteínas abandonar la célula por otros sistemas de secreción que no involucran la translocasa Sec, otras que sean proteínas asociadas a membrana que se liberan por recambio, proteínas liberadas por digestión parcial de proteasas, por simple liberación desde las membranas, o bien, por la lisis celular (Antelmann *y col*, 2001; Watt *y col*, 2005). Si bien 104 de estas proteínas ya habían sido encontradas e identificadas en nuestro laboratorio a partir de preparaciones de periplasma de la bacteria crecida en el mismo sustrato (Chi *y col*, 2007), es posible que un grupo de ellas sean precursores de proteínas secretadas y que por tanto están en tránsito hacia el espacio extracelular.

Junto a esto, identificamos 73 proteínas que hasta ahora no habían sido asociadas a pertenecer en *A. ferrooxidans* a ningún espacio subcelular en particular. De estas 73 proteínas, 33 de ellas presentaron señal de secreción de acuerdo a SubCel 1.0, en tanto que para las 40 restantes no se les identificó señal de secreción, pudiendo estas proteínas abandonar el citoplasma mediante otros sistemas de secreción no asociados a las translocasas Sec o Tat, por alguna vía aún no identificada, o bien por lisis celular.

El 45 % de las proteínas identificadas correspondieron a proteínas relacionadas con la envoltura celular, el destino de proteínas, el metabolismo energético y proteínas de transporte y unión, mientras que un 8 % correspondió a proteínas con función desconocida, siendo estas las categorías funcionales más representadas en este proteoma.

Destacamos que un 15 % de las proteínas se agrupan en el rol de síntesis de proteínas, siendo todas estas proteínas ribosomales, las cuales en su mayoría no poseen señal de secreción de acuerdo a SubCel, a excepción de 2 que fueron detectadas mediante el algoritmo SecretomeP. Está descrito para muchos estudios de fracciones de proteínas periplasmáticas o extracelulares la presencia de proteínas ribosomales sin poder explicar convincentemente este fenómeno (Tjalsma *y col*, 2000; Antelmann *y col*, 2001; Kim *y col*, 2002; Tjalsma *y col*, 2004). Es importante considerar que 35 proteínas de esta fracción fueron consideradas como hipotéticas, muchas de las cuales presentaron posible señal de secreción, dejando abierta la interrogante sobre la función de este importante grupo de proteínas en dicho espacio.

Una vez analizados los puntos isoeléctricos y el peso molecular de las proteínas aquí identificadas pudimos ver un mayoritario porcentaje de proteínas con punto isoeléctrico básico (65 %), mientras que sólo un 35 % de las proteínas tienen un punto isoeléctrico menor a 7,0. Se ha demostrado que la mayor parte de las proteínas básicas se encuentran fuera del citoplasma en *A. ferrooxidans*, puesto que los puntos isoeléctricos de las proteínas citoplasmáticas son muy similares comparados con las proteínas citoplasmáticas de bacterias neutrófilas. Puede ser que el alto número de proteínas básicas en las fracción extracelular de *A. ferrooxidans* (17 % de proteínas con pI sobre 10,0) responda a un mecanismo de adaptación de esta bacteria acidófila, lo cual puede explicar en parte la resistencia al ácido presente en el ambiente (Chi y col, 2007).

Finalmente, y sólo considerando las 73 proteínas encontradas en la fracción extracelular que no han sido asociadas a pertenecer en *A. ferrooxidans* a ningún espacio subcelular en particular, se pudo apreciar que la mayoría de las proteínas con señal de secreción ahí encontradas presentan puntos isoeléctricos básicos y peso molecular bajo 50 kDa. La mayor parte de estas proteínas se agruparon como hipotéticas (20 %), mientras que el resto de las proteínas de este subgrupo se agruparon en funciones tales como el metabolismo energético, la envoltura celular, los procesos celulares y proteínas de función desconocida.

5.5 Perspectivas

Entre las perspectivas que ofrecen los resultados obtenidos durante este trabajo destaca en primer término evaluar la funcionalidad de las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* en la interacción de la bacteria con el mineral, así como lograr una mayor caracterización de las proteínas aquí identificadas. Por otro lado será de mucha utilidad identificar y caracterizar las proteínas extracelulares de *A. ferrooxidans* crecido en otro sustrato energético, como el ion ferroso, la pirita, la calcopirita, etc. Otra posible aplicación de este método de trabajo puede ser la identificación y caracterización de las proteínas extracelulares de otros microorganismos que participan en el proceso de biolixiviación.

CONCLUSIONES

1. Los análisis bioinformáticos mostraron que los sistemas de secreción de tipo I, II, IV y V, las vías Usher y la no-clásica estarían presentes en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, los cuales podrían participar en la secreción de las proteínas encontradas en la fracción extracelular de la bacteria.
2. La mayoría de las proteínas identificadas en la fracción extracelular presentaron punto isoeléctrico básico, y si éstas realizan alguna función en dicho espacio debiesen resistir las condiciones ácidas del medio, sugiriendo entonces una adaptación de la bacteria al ambiente ácido.

REFERENCIAS

- Amaro A, Chamorro D, Seeger M, Arredondo R, Peirano I, Jerez CA.** (1991). Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 173:910-915.
- Amaro AM, Seeger M, Jerez CA.** (1992). Phosphate starvation affects the synthesis of outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Lett. 98:29-33.
- Amaro AM, Seeger M, Arredondo R, Moreno M, Jerez CA.** (1993). The growth conditions affect *Thiobacillus ferrooxidans* attachment to solids. In: Torma AE, Apel ML, Brierley CL (Eds.), Biohydrometallurgical Technologies II. TMS, Warrendale, 577-585.
- Antelmann H, Scharf C, Hecker M.** (2000). Phosphate Starvation-Inducible Proteins of *Bacillus subtilis*: Proteomics and Transcriptional Analysis. J. Bacteriol. 182:4478-4490.
- Antelmann H, Tjalsma H, Voigt B, Ohlmeier S, Bron S, van Dijk JM, Hecker M.** (2001). A proteomic view on genome-based signal peptide predictions. Genome Res. 11:1484-1502.
- Arredondo R, Toledo H, Peirano I, Chamorro D, Jerez CA.** (1988). Studies of the stress response in chemolithotrophic acidophilic bacteria. Biochem. Int. 17:989-999.
- Arredondo R, García A, Jerez CA.** (1994). The partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its attachment to solids. Appl. Environ. Microbiol. 60:2846-2851.
- Barreto M, Quatrini R, Bueno S, Arriagada C, Valdes J, Silver S, Jedlicki E, Holmes D.** (2003). Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. Hydrometallurgy. 71:97-105.
- Bendtsen JD, Kiemer L, Fausbøll A, Brunak S.** (2005a). Non-classical protein secretion in bacteria. BMC Microbiology. 5:58.
- Bendtsen JD, Binnewies TT, Hallin PF, Sicheritz-Pontén T, Ussery D.** (2005b). Genome Update: prediction of secreted proteins in 225 bacterial proteomes. Microbiology. 151:1725-1727.
- Brierley JA.** (1978). Thermophilic iron-oxidizing bacteria found in copper leaching dumps. Appl. Environ. Microbiol. 36:523-525.
- Buonfiglio V, Polidoro M, Soyer F, Valenti P, Shively J.** (1999). A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Biotechnol. 72:85-93.
- Caldwell RB, Lattemann CT.** (2004). Simple and reliable method to precipitate proteins from bacterial culture supernatant. Appl. Environ. Microbiol. 70:610-612.

- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG.** (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 25:1327-33.
- Ceskova P, Mandl M, Helanova S, Kasparovska J.** (2001). Kinetics studies on elemental sulfur oxidation by *Acidithiobacillus ferrooxidans*: sulfur limitation and activity of free and adsorbed bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* 78:24-30.
- Chi A, Valenzuela L, Beard S, Mackey A, Shabanowitz J, Hunt D, Jerez CA.** (2007). Periplasmic Proteins of the Extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mol. Cell. Proteomics*. 6:2239-2251.
- Chou KC, Shen HB.** (2006). Large-scale predictions of Gram-negative bacterial protein subcellular locations. *J. Proteome Res.* 5:3420-3428.
- Claros MG, Brunak S, von Heijne G.** (1997). Prediction of N-terminal sorting signals. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:394-398.
- Comisión Chilena del Cobre, COCHILCO.** (2008). Informe de Inversión en la Minería Chilena del Cobre y del Oro. www.cochilco.cl
- Devasia P, Natarajan KA, Sathyanarayana DN, Rao GR.** (1993). Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4051-4055.
- Domon B, Aebersold R.** (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 312:212-217.
- Ecomonou A, Christie P, Fernandez R, Palmer T, Plano G, Pugsley A.** (2006). Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 62:308-319.
- Espejo RT, Romero P.** (1987). Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on elemental sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1907-1912.
- Fekkes P, Driessen AJ.** (1999). Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:161-173.
- Filloux A, Hachani A, Bleves S.** (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*. 154:1570-1583.
- Gardy JL, Spencer C, Wang K, Ester M, Tusnady GE, Simon I, Hua S, deFays K, Lambert C, Nakai K, Brinkman FS.** (2003). PSORT-B: improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic Acids Res.* 31:3613-3617.
- Gehrke T, Telegdi J, Thierry D, Sand W.** (1998). Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2743-2747.

- Henderson I, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez R, Ala'Aldeen D.** (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:692-744.
- Kim N, Weeks D, Shin JM, Scott D, Young M, Sachs G.** (2002). Proteins released by *Helicobacter pylori* in vitro. *J. Bacteriol.* 184:6155-6162.
- Käll L, Krogh A, Sonnhammer EL.** (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* 338:1027-1036.
- Kanao T, Kamimura K, Sugio T.** (2007). Identification of a gene encoding a tetrathionate hydrolase in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* 132:16-22.
- Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL.** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305:567-580.
- Kostakioti M, Newman C, Thanassi D, Stathopoulos C.** (2005) Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* 187:4306-4314.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Marchler-Bauer A, Anderson JB, Derbyshire MK, DeWeese-Scott C, Gonzales NR, Gwadz M, Hao L, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Krylov D, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Lu S, Marchler GH, Mullokandov M, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH.** (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 35:237-240
- Myerson AS, Kline P.** (1983). The adsorption of *Thiobacillus ferrooxidans* on solid particles. *Biotechnol. Bioeng.* 25:1669-1676.
- Nakashima H, Nishikawa K.** (1994). Discrimination of intracellular and extracellular proteins using amino acid composition and residue-pair frequencies. *J. Mol. Biol.* 238: 54-61.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W.** (1988). Improved staining of proteins in polyacrilamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9:255-262.
- O'Farrell PH.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021.
- O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH.** (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell.* 12:1133-1141.
- Ohmura N, Kitamura K, Saiki H.** (1993). Selective adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to pyrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4044-4050.
- Ohmura N, Tsugita K, Koizumi JI, Saiki H.** (1996). Sulfur-binding protein of flagella of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 178:5776-5780.

- Pagliai F.** (2007). Evaluación de tres diferentes métodos para la obtención de las proteínas extracelulares de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. Seminario de Título. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Preston G, Studholme D, Caldelari I.** (2005). Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:331-360.
- Pronk JT, Meulenberg R, Hazeu Z, Bos P, Kuenen JG.** (1990). Oxidation of inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:293-306.
- Pronk JT, de Bruyn JC, Bos P, Kuenen JG.** (1992). Anaerobic growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2227-2230.
- Pugsley A.** (1978). The Complete General Secretory Pathway in Gram-negative Bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
- Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P.** (1988). Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis.* 9:288-291.
- Rawlings DE, Kusano T.** (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58:39-55.
- Rawlings DE.** (2002). Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 6:65-91.
- Rohwerder T, Sand W.** (2003). The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology.* 149:1699-1709.
- Schiene-Fischer C, Yu C.** (2001). Receptor accessory folding helper enzymes: the functional role of peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases. *FEBS Lett.* 495:1-6.
- Schneider G.** (1999). How many potentially secreted proteins are contained in a bacterial genome? *Gene.* 237:113-121.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M.** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrilamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.
- Smolka M, Martins D, Winck F, Santoro C, Castellari R, Ferrari F, Brum I, Galembeck E, Della Coletta Filho H, Machado M, Maragoni S, Novello J.** (2003). Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. *Proteomics.* 3:224-237.
- Solari JA, Huerta G, Escobar B, Vargas T, Badilla-Ohlbaum R, Rubio J.** (1992). Interfacial phenomena affecting the adhesion of *Thiobacillus ferrooxidans* to sulfide minerals surfaces. *Colloids Surf.* 69:159-166.

Tettelin H, Geer K, Vamathevan J, Riggs F, Malek J, Levins M, Ayodeji M, Shatsman S, Tsegaye G, McGann S, Dodson RJ, Blake R, Fraser CM. (2002). Complete genome sequence of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain ATCC 23270. DOE Genome Contractor-Grantee Workshop IX, Oakland, CA, USA.

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

Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun P, Darmon E, Dorenbos R, Buboiss JY, Weesters H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijk JM. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:207-233.

Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanowitz J, Hunt D, Jerez CA. (2006). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotech. Adv.* 24:197-211.

Valenzuela L. (2007). La proteómica como herramienta para el estudio de microorganismos utilizados en biominería: Caracterización del sistema de oxidación de tiosulfato en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Doctorado. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Vera M, Guiliani N, Jerez CA. (2003). Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* 71:125-132.

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

Watling HR. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides – A review. *Hydrometallurgy.* 84:81-108.

Tabla 5. Lista de las proteínas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 con posible señal de secreción de acuerdo a SubCel 1.0

#	Categoría	Nombre de la proteína	Categoría funcional
1	SignalP	AFE_2631 acetylornithine aminotransferase (argD)	Biosíntesis de aminoácidos
2	TMHMM	AFE_2404 protoheme IX farnesyltransferase (cyoE-1)	Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos
3	TMHMM	AFE_3189 protoheme IX farnesyltransferase (cyoE-2)	Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos
4	TMHMM	AFE_2448 4-hydroxybenzoate polyprenyl transferase (ubiA)	Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos
5	TMHMM	AFE_2723 2-polyprenylphenol 6-hydroxylase (ubiB)	Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos
6	SecretomeP	AFE_1575 iron-sulfur cluster assembly accessory protein	Biosíntesis de cofactores y grupos prostéticos
7	SecretomeP	AFE_0875 penicillin-binding protein 1A, putative	Envoltura celular
8	SignalP	AFE_0186 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	Envoltura celular
9	SignalP	AFE_0535 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	Envoltura celular
10	SignalP	AFE_1132 D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase (dacB)	Envoltura celular
11	SignalP	AFE_2105 murein transglycosylase, putative	Envoltura celular
12	SignalP	AFE_2815 UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--2,6-diaminopimelate ligase (murE)	Envoltura celular
13	SignalP	AFE_2394 UDP-N-acetylmuramate/L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate ligase (mpl)	Envoltura celular
14	TMHMM	AFE_0536 rod shape-determining protein RodA (rodA)	Envoltura celular
15	TMHMM	AFE_0538 rod shape-determining protein MreD, putative	Envoltura celular
16	TMHMM	AFE_0844 penicillin-binding protein 1C, putative	Envoltura celular
17	TMHMM	AFE_2616 membrane-bound lytic murein transglycosylase D (mltD)	Envoltura celular
18	TMHMM	AFE_2817 phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase (mra Y)	Envoltura celular
19	TMHMM	AFE_2819 cell division protein FtsW (ftsW)	Envoltura celular
20	TMHMM	AFE_2820 UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase (murG)	Envoltura celular
21	SignalP	AFE_2087 periplasmic glucans biosynthesis protein, MdoG	Envoltura celular
22	SignalP	AFE_2791 3-deoxy-D-manno-octulosonic-acid transferase (kdtA)	Envoltura celular
23	SignalP	AFE_2884 phosphoheptose isomerase/cytidylyltransferase	Envoltura celular
24	TatP	AFE_2752 dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase family protein	Envoltura celular
25	TMHMM	AFE_0095 capsular polysaccharide biosynthesis protein, putative	Envoltura celular
26	TMHMM	AFE_0134 glycosyl transferase, group 1	Envoltura celular
27	TMHMM	AFE_0147 capsule polysaccharide exporter, inner-membrane protein CtrC	Envoltura celular
28	TMHMM	AFE_0148 capsule polysaccharide export inner-membrane protein	Envoltura celular
29	TMHMM	AFE_0184 dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase family protein	Envoltura celular
30	TMHMM	AFE_0212 O-antigen polymerase family protein	Envoltura celular
31	TMHMM	AFE_0974 glycosyl transferase, group 2 family protein	Envoltura celular
32	TMHMM	AFE_1309 glycosyl transferase	Envoltura celular
33	TMHMM	AFE_1711 undecaprenyl-phosphate galactosephosphotransferase, putative	Envoltura celular
34	TMHMM	AFE_1737 polysaccharide biosynthesis protein	Envoltura celular
35	TMHMM	AFE_1741 tyrosine-protein kinase, putative	Envoltura celular
36	TMHMM	AFE_2085 periplasmic glucans biosynthesis protein MdoH	Envoltura celular
37	TMHMM	AFE_2762 glycosyl transferase, group 2 family protein	Envoltura celular
38	TMHMM	AFE_2796 O-antigen polymerase family protein	Envoltura celular
39	TMHMM	AFE_2797 dolichyl-phosphate-mannose-protein mannosyltransferase family protein	Envoltura celular
40	TMHMM	AFE_2800 glycosyl transferase, group 2 family protein	Envoltura celular
41	TMHMM	AFE_2948 polysaccharide biosynthesis protein	Envoltura celular
42	TMHMM	AFE_2950 chain length determinant family protein	Envoltura celular
43	TMHMM	AFE_2951 undecaprenyl-phosphate galactosephosphotransferase	Envoltura celular

44	Fimbria	AFE_0111 integral membrane protein, MarC family	Envoltura celular
45	LipoP	AFE_0158 LipoProtein, putative	Envoltura celular
46	LipoP	AFE_0189 rare LipoProtein A, putative	Envoltura celular
47	LipoP	AFE_0190 LipoProtein, putative	Envoltura celular
48	LipoP	AFE_0191 LipoProtein, putative	Envoltura celular
49	LipoP	AFE_0297 LipoProtein, putative	Envoltura celular
50	LipoP	AFE_0406 LipoProtein, putative	Envoltura celular
51	LipoP	AFE_0420 OmpA family protein	Envoltura celular
52	LipoP	AFE_0611 LipoProtein, putative	Envoltura celular
53	LipoP	AFE_0783 outer membrane LipoProtein Slp, putative	Envoltura celular
54	LipoP	AFE_0833 LipoProtein, putative	Envoltura celular
55	LipoP	AFE_0850 LipoProtein, putative	Envoltura celular
56	LipoP	AFE_0982 vacJ LipoProtein	Envoltura celular
57	LipoP	AFE_1267 rare LipoProtein A, putative	Envoltura celular
58	LipoP	AFE_1444 LipoProtein, putative	Envoltura celular
59	LipoP	AFE_1652 LipoProtein, putative	Envoltura celular
60	LipoP	AFE_1847 LipoProtein, putative	Envoltura celular
61	LipoP	AFE_1918 LipoProtein, putative	Envoltura celular
62	LipoP	AFE_1998 LipoProtein, putative	Envoltura celular
63	LipoP	AFE_2032 membrane protein, putative	Envoltura celular
64	LipoP	AFE_2445 LipoProtein, putative	Envoltura celular
65	LipoP	AFE_2579 rare LipoProtein B, putative	Envoltura celular
66	LipoP	AFE_2589 LipoProtein, putative	Envoltura celular
67	LipoP	AFE_2748 LipoProtein, SmpA_OmlA family	Envoltura celular
68	LipoP	AFE_2882 LipoProtein, putative	Envoltura celular
69	LipoP	AFE_2953 peptidoglycan-associated LipoProtein, putative	Envoltura celular
70	LipoP	AFE_3055 LipoProtein, putative	Envoltura celular
71	LipoP	AFE_3072 LipoProtein, putative	Envoltura celular
72	LipoP	AFE_3117 LipoProtein, putative	Envoltura celular
73	SignalP	AFE_0560 outer membrane protein, OMPP1/FadL/TodX family	Envoltura celular
74	SignalP	AFE_0883 methyltransferase, FkbM family	Envoltura celular
75	SignalP	AFE_1631 outer membrane protein, OmpH family	Envoltura celular
76	SignalP	AFE_1632 outer membrane protein, OMP85 family	Envoltura celular
77	SignalP	AFE_2654 outer membrane protein transport protein, OMPP1/FadL/TodX family	Envoltura celular
78	SignalP	AFE_2722 OmpA family protein	Envoltura celular
79	SignalP	AFE_2996 outer membrane protein	Envoltura celular
80	TatP	AFE_1257 LipoProtein, NLP/P60 family	Envoltura celular
81	SecretomeP	AFE_0745 LipoProtein, putative	Envoltura celular
82	SignalP	AFE_0962 LipoProtein, putative	Envoltura celular
83	TMHMM	AFE_0463 membrane protein, putative	Envoltura celular
84	TMHMM	AFE_0025 membrane protein, putative	Envoltura celular
85	TMHMM	AFE_0179 membrane protein, putative	Envoltura celular
86	TMHMM	AFE_0264 membrane protein, putative	Envoltura celular
87	TMHMM	AFE_0282 membrane protein, putative	Envoltura celular
88	TMHMM	AFE_0333 membrane protein	Envoltura celular
89	TMHMM	AFE_0388 membrane protein, putative	Envoltura celular
90	TMHMM	AFE_0397 membrane protein, putative	Envoltura celular
91	TMHMM	AFE_0574 membrane protein, DedA family	Envoltura celular
92	TMHMM	AFE_0750 membrane protein, putative	Envoltura celular
93	TMHMM	AFE_0770 membrane protein, putative	Envoltura celular
94	TMHMM	AFE_0840 membrane protein, putative	Envoltura celular
95	TMHMM	AFE_0977 membrane protein, putative	Envoltura celular
96	TMHMM	AFE_0978 membrane protein, putative	Envoltura celular
97	TMHMM	AFE_1042 membrane protein, putative	Envoltura celular

98	TMHMM	AFE_1053 membrane protein, putative	Envoltura celular
99	TMHMM	AFE_1145 membrane protein, putative	Envoltura celular
100	TMHMM	AFE_1231 membrane protein, putative	Envoltura celular
101	TMHMM	AFE_1262 membrane protein, putative	Envoltura celular
102	TMHMM	AFE_1287 membrane protein, putative	Envoltura celular
103	TMHMM	AFE_1321 membrane protein, putative	Envoltura celular
104	TMHMM	AFE_1450 membrane protein, putative	Envoltura celular
105	TMHMM	AFE_1530 membrane protein, putative	Envoltura celular
106	TMHMM	AFE_1536 membrane protein, putative	Envoltura celular
107	TMHMM	AFE_1641 membrane protein, DedA family	Envoltura celular
108	TMHMM	AFE_1731 membrane protein, putative	Envoltura celular
109	TMHMM	AFE_1911 membrane protein, DedA family	Envoltura celular
110	TMHMM	AFE_2059 membrane protein, putative	Envoltura celular
111	TMHMM	AFE_2083 membrane protein, putative	Envoltura celular
112	TMHMM	AFE_2237 membrane protein, putative	Envoltura celular
113	TMHMM	AFE_2242 membrane protein, putative	Envoltura celular
114	TMHMM	AFE_2276 membrane protein, putative	Envoltura celular
115	TMHMM	AFE_2331 membrane protein, putative	Envoltura celular
116	TMHMM	AFE_2379 membrane protein, putative	Envoltura celular
117	TMHMM	AFE_2461 membrane protein, putative	Envoltura celular
118	TMHMM	AFE_2467 membrane protein, putative	Envoltura celular
119	TMHMM	AFE_2479 integral membrane protein MviN	Envoltura celular
120	TMHMM	AFE_2581 membrane protein, putative	Envoltura celular
121	TMHMM	AFE_2774 membrane protein, putative	Envoltura celular
122	TMHMM	AFE_2778 membrane protein, putative	Envoltura celular
123	TMHMM	AFE_2873 integral membrane protein	Envoltura celular
124	TMHMM	AFE_2894 membrane protein, putative	Envoltura celular
125	TMHMM	AFE_2900 membrane protein, putative	Envoltura celular
126	TMHMM	AFE_2944 membrane protein, putative	Envoltura celular
127	TMHMM	AFE_2970 integral membrane protein, MarC family	Envoltura celular
128	TMHMM	AFE_2971 membrane protein, putative	Envoltura celular
129	TMHMM	AFE_2992 inner membrane protein, 60 kDa	Envoltura celular
130	TMHMM	AFE_3049 membrane protein, putative	Envoltura celular
131	TMHMM	AFE_3167 membrane protein, putative	Envoltura celular
132	TMHMM	AFE_3188 membrane protein, putative	Envoltura celular
133	TMHMM	AFE_3212 membrane protein, putative	Envoltura celular
134	Fimbria	AFE_2078 type IV pilin, putative	Envoltura celular
135	LipoP	AFE_2304 type 4 fimbrial biogenesis protein PilP, putative	Envoltura celular
136	SecretomeP	AFE_1952 pilus assembly protein TraW, putative	Envoltura celular
137	SecretomeP	AFE_2076 pilin signal sequence domain protein	Envoltura celular
138	SecretomeP	AFE_2077 type IV pilin, putative	Envoltura celular
139	SignalP	AFE_1980 pilus assembly protein TraH, putative	Envoltura celular
140	SignalP	AFE_1981 pilus assembly protein TraF, putative	Envoltura celular
141	SignalP	AFE_2080 type IV pilin biogenesis protein, putative	Envoltura celular
142	SignalP	AFE_2305 fimbrial assembly protein PilQ, putative	Envoltura celular
143	SignalP	AFE_2621 pilin, putative	Envoltura celular
144	SignalP	AFE_3017 outer membrane usher protein, putative	Envoltura celular
145	SignalP	AFE_3018 pilus chaperone protein, putative	Envoltura celular
146	TMHMM	AFE_0404 tight adherence protein TadB, putative	Envoltura celular
147	TMHMM	AFE_0405 tight adherence protein TadC	Envoltura celular
148	TMHMM	AFE_2074 type IV pilin biogenesis peptidase, putative	Envoltura celular
149	TMHMM	AFE_2075 type IV pilus biogenesis protein PilC	Envoltura celular
150	TMHMM	AFE_2840 type IV pilus prepilin peptidase PilD	Envoltura celular
151	SecretomeP	AFE_2836 stringent starvation protein B (sspB)	Procesos celulares
152	SignalP	AFE_0076 organic solvent tolerance protein, putative	Procesos celulares

153	SignalP	AFE_2443 PhoH-like protein	Procesos celulares
154	TMHMM	AFE_3073 large conductance mechanosensitive channel protein (mscL)	Procesos celulares
155	SignalP	AFE_0156 maf protein (maf-1)	Procesos celulares
156	SignalP	AFE_2813 cell division protein FtsL (ftsL)	Procesos celulares
157	TMHMM	AFE_0355 cell division protein FtsX, putative	Procesos celulares
158	TMHMM	AFE_0469 cell division protein FtsH (ftsH)	Procesos celulares
159	TMHMM	AFE_2191 septum formation initiator family protein	Procesos celulares
160	TMHMM	AFE_2373 intracellular septation protein A (ispZ)	Procesos celulares
161	LipoP	AFE_1965 conjugal transfer protein TraV, putative	Procesos celulares
162	LipoP	AFE_1967 TraK LipoProtein, putative	Procesos celulares
163	SecretomeP	AFE_1387 conjugal transfer-like protein	Procesos celulares
164	SecretomeP	AFE_1966 conjugal transfer protein, putative	Procesos celulares
165	SignalP	AFE_1389 conjugal transfer protein, putative	Procesos celulares
166	SignalP	AFE_1390 conjugal transfer protein	Procesos celulares
167	SignalP	AFE_1445 conjugal transfer protein TrbJ, putative	Procesos celulares
168	SignalP	AFE_1950 conjugal transfer protein TraN, putative	Procesos celulares
169	SignalP	AFE_1951 conjugal transfer protein TraU, putative	Procesos celulares
170	SignalP	AFE_1956 conjugation signal peptidase TraF, putative	Procesos celulares
171	TMHMM	AFE_1354 conjugal transfer protein TraB, putative	Procesos celulares
172	TMHMM	AFE_1443 conjugal transfer protein TrbL, putative	Procesos celulares
173	TMHMM	AFE_1964 conjugal transfer protein TraA, putative	Procesos celulares
174	TMHMM	AFE_1979 pilus assembly protein TraG, putative	Procesos celulares
175	SignalP	AFE_2865 toluene tolerance protein, putative	Procesos celulares
176	TMHMM	AFE_0250 arsenical pump membrane protein (arsB)	Procesos celulares
177	TMHMM	AFE_0454 copper resistance protein, putative	Procesos celulares
178	TMHMM	AFE_1004 drug resistance transporter, EmrB/QacA family	Procesos celulares
179	TMHMM	AFE_1288 drug resistance transporter, EmrB/QacA family	Procesos celulares
180	TMHMM	AFE_2179 drug resistance transporter, EmrB/QacA family	Procesos celulares
181	LipoP	AFE_2607 competence LipoProtein ComL, putative	Procesos celulares
182	SignalP	AFE_0015 competence protein ComEA helix-hairpin-helix repeat protein	Procesos celulares
183	TMHMM	AFE_2553 DNA internalization-related competence protein ComEC/Rec2	Procesos celulares
184	SecretomeP	AFE_0421 haemagglutinin family protein	Procesos celulares
185	TMHMM	AFE_3016 spore coat protein	Procesos celulares
186	TMHMM	AFE_3019 spore coat protein	Procesos celulares
187	SignalP	AFE_2958 TolA protein	Procesos celulares
188	TMHMM	AFE_0306 multidrug resistance protein, SMR family	Procesos celulares
189	TMHMM	AFE_0743 channel protein, hemolysin III family	Procesos celulares
190	TMHMM	AFE_0752 multidrug resistance protein	Procesos celulares
191	TMHMM	AFE_1115 fosmidomycin resistance protein, putative	Procesos celulares
192	TMHMM	AFE_2402 undecaprenol kinase, putative	Procesos celulares
193	TMHMM	AFE_2960 TolQ protein	Procesos celulares
194	SignalP	AFE_0225 choloylglycine hydrolase, putative	Metabolismo intermediario central
195	SignalP	AFE_2979 sulfur_pyrite_thiosulfate_sulfide-induced protein	Metabolismo intermediario central
196	TatP	AFE_0920 sulfur reductase, molybdopterin subunit (sreA)	Metabolismo intermediario central
197	TMHMM	AFE_0918 sulfur reductase, membrane subunit, putative	Metabolismo intermediario central
198	SecretomeP	AFE_0334 transposase, degenerate	Marco de lectura interrumpido
199	SecretomeP	AFE_2166 transposition helper protein, truncation	Marco de lectura interrumpido
200	SignalP	AFE_0321 transposase, degenerate	Marco de lectura interrumpido
201	SignalP	AFE_2163 oxidoreductase, putative, truncation	Marco de lectura interrumpido
202	SignalP	AFE_1016 endonuclease (nuc)	Metabolismo de DNA
203	SecretomeP	AFE_1347 DNA topoisomerase III (topB)	Metabolismo de DNA
204	SecretomeP	AFE_0226 uracil-DNA glycosylase family 4 protein	Metabolismo de DNA
205	TMHMM	AFE_0339 restriction endonuclease, putative	Metabolismo de DNA
206	SecretomeP	AFE_0555 glycine cleavage system H protein, putative	Metabolismo energético

207	TMHMM	AFE_3123 ATP synthase F0, A subunit (atpB)	Metabolismo energético
208	TMHMM	AFE_3124 ATP synthase F0, C subunit (atpE)	Metabolismo energético
209	SignalP	AFE_0927 polysaccharide deacetylase family protein	Metabolismo energético
210	SecretomeP	AFE_0058 ribulose biphosphate carboxylase, small subunit (cbbS-1)	Metabolismo energético
211	SecretomeP	AFE_0006 ubiquinol--cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (petA-1)	Metabolismo energético
212	SecretomeP	AFE_0373 iron oxidase (iro)	Metabolismo energético
213	SecretomeP	AFE_1130 cytochrome c family protein	Metabolismo energético
214	SecretomeP	AFE_2339 hydrogenase-2, small subunit (hybA)	Metabolismo energético
215	SignalP	AFE_0008 cytochrome c4 (cycA-1)	Metabolismo energético
216	SignalP	AFE_0376 ubiquinol--cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit (petA-2)	Metabolismo energético
217	SignalP	AFE_0378 cytochrome c4 (cycA-2)	Metabolismo energético
218	SignalP	AFE_0652 cytochrome c family protein	Metabolismo energético
219	SignalP	AFE_1655 cytochrome c552, putative	Metabolismo energético
220	SignalP	AFE_1656 cytochrome c	Metabolismo energético
221	SignalP	AFE_3179 cytochrome c (cyc2)	Metabolismo energético
222	SignalP	AFE_3180 cytochrome c552 (cyc1)	Metabolismo energético
223	SignalP	AFE_3186 rusticyanin (rus)	Metabolismo energético
224	TatP	AFE_3050 [Ni/Fe] hydrogenase, small subunit	Metabolismo energético
225	TMHMM	AFE_0002 cytochrome c-type biogenesis protein ResC, putative	Metabolismo energético
226	TMHMM	AFE_0003 cytochrome c-type biogenesis protein ResB, putative	Metabolismo energético
227	TMHMM	AFE_0004 ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome c1 subunit (petC-1)	Metabolismo energético
228	TMHMM	AFE_0005 ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b subunit (petB-1)	Metabolismo energético
229	TMHMM	AFE_0374 ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome c1 subunit (petC-2)	Metabolismo energético
230	TMHMM	AFE_0375 ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b subunit (petB-2)	Metabolismo energético
231	TMHMM	AFE_0474 NADH-quinone oxidoreductase, A subunit (nuoA)	Metabolismo energético
232	TMHMM	AFE_0481 NADH-quinone oxidoreductase, H subunit (nuoH)	Metabolismo energético
233	TMHMM	AFE_0483 NADH-quinone oxidoreductase, J subunit (nuoJ)	Metabolismo energético
234	TMHMM	AFE_0484 NADH-quinone oxidoreductase, K subunit (nuoK)	Metabolismo energético
235	TMHMM	AFE_0485 NADH-quinone oxidoreductase, L subunit (nuoL)	Metabolismo energético
236	TMHMM	AFE_0486 NADH-quinone oxidoreductase, M subunit (nuoM)	Metabolismo energético
237	TMHMM	AFE_0487 NADH-quinone oxidoreductase, N subunit (nuoN)	Metabolismo energético
238	TMHMM	AFE_0673 [Ni/Fe] hydrogenase, b-type cytochrome subunit, putative	Metabolismo energético
239	TMHMM	AFE_0772 cytochrome b561 family protein	Metabolismo energético
240	TMHMM	AFE_0945 hydrogenase-4, F subunit, putative	Metabolismo energético
241	TMHMM	AFE_0946 hydrogenase-4, E subunit, putative	Metabolismo energético
242	TMHMM	AFE_0947 hydrogenase-4, C subunit, putative	Metabolismo energético
243	TMHMM	AFE_0948 hydrogenase-4, B subunit, putative	Metabolismo energético
244	TMHMM	AFE_1423 NADH dehydrogenase, putative	Metabolismo energético
245	TMHMM	AFE_2092 cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I (cydA)	Metabolismo energético
246	TMHMM	AFE_2093 cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II (cydB)	Metabolismo energético
247	TMHMM	AFE_2405 cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit IV (cyoD)	Metabolismo energético
248	TMHMM	AFE_2406 cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit III (cyoC)	Metabolismo energético
249	TMHMM	AFE_2407 cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit I (cyoB)	Metabolismo energético
250	TMHMM	AFE_2408 cytochrome o ubiquinol oxidase, subunit II (cyoA)	Metabolismo energético
251	TMHMM	AFE_2493 thiol/disulfide interchange protein DsbD	Metabolismo energético
252	TMHMM	AFE_3182 cytochrome c oxidase, aa3-type, subunit II (coxB)	Metabolismo energético
253	TMHMM	AFE_3183 cytochrome c oxidase, aa3-type, subunit I (coxA)	Metabolismo energético
254	TMHMM	AFE_3184 cytochrome c oxidase, aa3-type, subunit III (coxC)	Metabolismo energético
255	SecretomeP	AFE_1274 2-oxo acid dehydrogenase, acyltransferase, putative	Metabolismo energético
256	TMHMM	AFE_1272 dehydrogenase complex, E1 component, alpha subunit, putative	Metabolismo energético
257	TMHMM	AFE_3081 transketolase (tkt-2)	Metabolismo energético

258	SignalP	AFE_2614 aconitate hydratase, putative	Metabolismo energético
259	TMHMM	AFE_1128 fatty acid desaturase	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
260	TMHMM	AFE_1187 CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase, putative	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
261	TMHMM	AFE_1635 phosphatidate cytidilyltransferase (edsA)	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
262	TMHMM	AFE_2187 CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate 3-phosphatidyltransferase (pgsA)	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
263	TMHMM	AFE_2291 CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase (pssA)	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
264	TMHMM	AFE_2313 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
265	TMHMM	AFE_2673 diacylglycerol kinase (dgkA)	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
266	TMHMM	AFE_2117 phosphatidylglycerophosphatase A (pgpA)	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
267	TMHMM	AFE_0971 squalene-hopene cyclase (she)	Metabolismo de acidos grasos y fosfolipidos
268	SecretomeP	AFE_0845 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
269	SecretomeP	AFE_1330 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
270	SecretomeP	AFE_1406 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
271	SecretomeP	AFE_1789 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
272	SecretomeP	AFE_1972 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
273	SecretomeP	AFE_2386 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
274	SecretomeP	AFE_2535 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
275	SignalP	AFE_0019 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
276	SignalP	AFE_0083 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
277	SignalP	AFE_0116 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
278	SignalP	AFE_0117 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
279	SignalP	AFE_0136 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
280	SignalP	AFE_0173 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
281	SignalP	AFE_0278 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
282	SignalP	AFE_0398 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
283	SignalP	AFE_0400 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
284	SignalP	AFE_0528 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
285	SignalP	AFE_0589 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
286	SignalP	AFE_0795 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
287	SignalP	AFE_0824 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
288	SignalP	AFE_0841 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
289	SignalP	AFE_0936 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
290	SignalP	AFE_0981 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
291	SignalP	AFE_1040 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
292	SignalP	AFE_1101 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
293	SignalP	AFE_1140 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
294	SignalP	AFE_1323 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
295	SignalP	AFE_1587 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
296	SignalP	AFE_2208 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
297	SignalP	AFE_2236 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
298	SignalP	AFE_2241 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
299	SignalP	AFE_2390 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
300	SignalP	AFE_2510 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
301	SignalP	AFE_2570 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
302	SignalP	AFE_2888 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
303	SignalP	AFE_2895 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
304	SignalP	AFE_2925 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
305	SignalP	AFE_2954 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
306	SignalP	AFE_3181 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
307	TMHMM	AFE_0032 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
308	TMHMM	AFE_0215 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
309	TMHMM	AFE_0217 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
310	TMHMM	AFE_0232 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas
311	TMHMM	AFE_0265 conserved hypothetical protein	Proteinas hipotéticas

312	TMHMM	AFE_0273 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
313	TMHMM	AFE_0531 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
314	TMHMM	AFE_0546 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
315	TMHMM	AFE_0738 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
316	TMHMM	AFE_0881 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
317	TMHMM	AFE_0884 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
318	TMHMM	AFE_1127 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
319	TMHMM	AFE_1158 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
320	TMHMM	AFE_1441 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
321	TMHMM	AFE_1495 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
322	TMHMM	AFE_1535 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
323	TMHMM	AFE_1600 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
324	TMHMM	AFE_2098 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
325	TMHMM	AFE_2127 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
326	TMHMM	AFE_2554 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
327	TMHMM	AFE_2591 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
328	TMHMM	AFE_2724 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
329	TMHMM	AFE_2874 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
330	TMHMM	AFE_2879 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
331	TMHMM	AFE_2886 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
332	TMHMM	AFE_2905 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
333	TMHMM	AFE_3122 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
334	TMHMM	AFE_3217 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
335	TMHMM	AFE_0188 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
336	TMHMM	AFE_1748 conserved hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
337	SecretomeP	AFE_1023 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
338	SecretomeP	AFE_1908 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
339	SecretomeP	AFE_2726 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
340	SignalP	AFE_0872 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
341	SignalP	AFE_1060 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
342	SignalP	AFE_1061 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
343	SignalP	AFE_1943 conserved domain protein, putative	Proteínas hipotéticas
344	SignalP	AFE_2507 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
345	SignalP	AFE_2725 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
346	SignalP	AFE_2908 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
347	SignalP	AFE_2910 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
348	TMHMM	AFE_1938 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
349	TMHMM	AFE_2094 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
350	TMHMM	AFE_2611 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
351	TMHMM	AFE_1930 conserved domain protein	Proteínas hipotéticas
352	LipoP	AFE_2398 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
353	SecretomeP	AFE_0129 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
354	SecretomeP	AFE_0153 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
355	SecretomeP	AFE_0167 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
356	SecretomeP	AFE_0221 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
357	SecretomeP	AFE_0231 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
358	SecretomeP	AFE_0242 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
359	SecretomeP	AFE_0271 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
360	SecretomeP	AFE_0393 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
361	SecretomeP	AFE_0504 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
362	SecretomeP	AFE_0534 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
363	SecretomeP	AFE_0616 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
364	SecretomeP	AFE_0643 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
365	SecretomeP	AFE_0650 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
366	SecretomeP	AFE_0766 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas

367	SecretomeP	AFE_0789 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
368	SecretomeP	AFE_0805 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
369	SecretomeP	AFE_0859 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
370	SecretomeP	AFE_0894 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
371	SecretomeP	AFE_1189 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
372	SecretomeP	AFE_1225 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
373	SecretomeP	AFE_1250 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
374	SecretomeP	AFE_1300 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
375	SecretomeP	AFE_1363 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
376	SecretomeP	AFE_1459 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
377	SecretomeP	AFE_1466 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
378	SecretomeP	AFE_1498 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
379	SecretomeP	AFE_1505 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
380	SecretomeP	AFE_1527 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
381	SecretomeP	AFE_1774 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
382	SecretomeP	AFE_1788 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
383	SecretomeP	AFE_1834 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
384	SecretomeP	AFE_1857 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
385	SecretomeP	AFE_1868 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
386	SecretomeP	AFE_1936 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
387	SecretomeP	AFE_1945 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
388	SecretomeP	AFE_1957 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
389	SecretomeP	AFE_1963 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
390	SecretomeP	AFE_1971 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
391	SecretomeP	AFE_1983 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
392	SecretomeP	AFE_2040 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
393	SecretomeP	AFE_2045 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
394	SecretomeP	AFE_2051 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
395	SecretomeP	AFE_2079 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
396	SecretomeP	AFE_2115 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
397	SecretomeP	AFE_2176 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
398	SecretomeP	AFE_2221 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
399	SecretomeP	AFE_2721 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
400	SecretomeP	AFE_2889 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
401	SecretomeP	AFE_2912 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
402	SecretomeP	AFE_2972 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
403	SecretomeP	AFE_2994 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
404	SecretomeP	AFE_3057 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
405	SecretomeP	AFE_3060 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
406	SecretomeP	AFE_3142 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
407	SecretomeP	AFE_3153 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
408	SecretomeP	AFE_3213 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
409	SignalP	AFE_0038 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
410	SignalP	AFE_0082 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
411	SignalP	AFE_0157 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
412	SignalP	AFE_0195 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
413	SignalP	AFE_0214 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
414	SignalP	AFE_0277 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
415	SignalP	AFE_0292 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
416	SignalP	AFE_0294 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
417	SignalP	AFE_0323 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
418	SignalP	AFE_0324 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
419	SignalP	AFE_0325 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
420	SignalP	AFE_0328 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
421	SignalP	AFE_0407 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas

477	SignalP	AFE_2429 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
478	SignalP	AFE_2434 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
479	SignalP	AFE_2458 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
480	SignalP	AFE_2531 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
481	SignalP	AFE_2573 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
482	SignalP	AFE_2582 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
483	SignalP	AFE_2620 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
484	SignalP	AFE_2770 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
485	SignalP	AFE_2893 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
486	SignalP	AFE_2928 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
487	SignalP	AFE_3025 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
488	SignalP	AFE_3099 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
489	SignalP	AFE_3102 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
490	SignalP	AFE_3106 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
491	SignalP	AFE_3193 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
492	SignalP	AFE_3197 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
493	TatP	AFE_1043 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
494	TMHMM	AFE_0016 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
495	TMHMM	AFE_0017 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
496	TMHMM	AFE_0039 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
497	TMHMM	AFE_0151 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
498	TMHMM	AFE_0168 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
499	TMHMM	AFE_0238 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
500	TMHMM	AFE_0243 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
501	TMHMM	AFE_0286 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
502	TMHMM	AFE_0287 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
503	TMHMM	AFE_0371 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
504	TMHMM	AFE_0372 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
505	TMHMM	AFE_0392 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
506	TMHMM	AFE_0570 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
507	TMHMM	AFE_0591 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
508	TMHMM	AFE_0771 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
509	TMHMM	AFE_0863 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
510	TMHMM	AFE_0916 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
511	TMHMM	AFE_0932 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
512	TMHMM	AFE_0934 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
513	TMHMM	AFE_1152 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
514	TMHMM	AFE_1205 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
515	TMHMM	AFE_1221 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
516	TMHMM	AFE_1440 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
517	TMHMM	AFE_1442 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
518	TMHMM	AFE_1449 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
519	TMHMM	AFE_1453 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
520	TMHMM	AFE_1461 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
521	TMHMM	AFE_1462 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
522	TMHMM	AFE_1465 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
523	TMHMM	AFE_1689 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
524	TMHMM	AFE_1764 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
525	TMHMM	AFE_1827 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
526	TMHMM	AFE_1833 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
527	TMHMM	AFE_1845 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
528	TMHMM	AFE_1849 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
529	TMHMM	AFE_1887 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
530	TMHMM	AFE_1916 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
531	TMHMM	AFE_1939 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas

532	TMHMM	AFE_1940 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
533	TMHMM	AFE_1978 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
534	TMHMM	AFE_1987 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
535	TMHMM	AFE_1997 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
536	TMHMM	AFE_1999 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
537	TMHMM	AFE_2023 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
538	TMHMM	AFE_2033 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
539	TMHMM	AFE_2043 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
540	TMHMM	AFE_2102 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
541	TMHMM	AFE_2111 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
542	TMHMM	AFE_2167 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
543	TMHMM	AFE_2170 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
544	TMHMM	AFE_2228 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
545	TMHMM	AFE_2332 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
546	TMHMM	AFE_2542 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
547	TMHMM	AFE_2629 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
548	TMHMM	AFE_2671 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
549	TMHMM	AFE_2734 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
550	TMHMM	AFE_2857 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
551	TMHMM	AFE_2929 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
552	TMHMM	AFE_3112 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
553	TMHMM	AFE_3177 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
554	TMHMM	AFE_3199 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
555	TMHMM	AFE_3200 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
556	TMHMM	AFE_0460 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
557	TMHMM	AFE_1512 hypothetical protein	Proteínas hipotéticas
558	SecretomeP	AFE_0223 PemK family protein	Elementos móviles extracromosomales
559	SecretomeP	AFE_0710 ISAfe5, transposase orfB	Elementos móviles extracromosomales
560	SignalP	AFE_1942 transposon, resolvase	Elementos móviles extracromosomales
561	SignalP	AFE_2014 transposon, transposase	Elementos móviles extracromosomales
562	TMHMM	AFE_1878 Tn5468, transposition protein C (tnsC-1)	Elementos móviles extracromosomales
563	TMHMM	AFE_3135 Tn5468, transposition protein C (tnsC-2)	Elementos móviles extracromosomales
564	SignalP	AFE_0259 serine protease, DO/DeqQ family	Destinación de proteínas
565	SignalP	AFE_1199 hflC protein (hflC)	Destinación de proteínas
566	SignalP	AFE_1439 serine protease, DO/DeqQ family	Destinación de proteínas
567	SignalP	AFE_1685 serine protease, DO/DeqQ family	Destinación de proteínas
568	SignalP	AFE_2514 carboxy-terminal peptidase (ctpA)	Destinación de proteínas
569	TMHMM	AFE_1005 peptidase, M48 family	Destinación de proteínas
570	TMHMM	AFE_1200 hflK protein (hflK)	Destinación de proteínas
571	TMHMM	AFE_1297 membrane-associated zinc metalloprotease, putative	Destinación de proteínas
572	TMHMM	AFE_1633 membrane-associated zinc metalloprotease, putative	Destinación de proteínas
573	TMHMM	AFE_2024 membrane-associated zinc metalloprotease, putative	Destinación de proteínas
574	SecretomeP	AFE_0415 type I secretion outer membrane protein, putative	Destinación de proteínas
575	SignalP	AFE_0343 outer membrane LipoProtein LolB, putative	Destinación de proteínas
576	SignalP	AFE_0401 bacterial type II/III secretion system protein	Destinación de proteínas
577	SignalP	AFE_1872 outer membrane autotransporter, putative	Destinación de proteínas
578	SignalP	AFE_1873 outer membrane autotransporter TapA	Destinación de proteínas
579	SignalP	AFE_2463 type I secretion outer membrane protein, TolC family	Destinación de proteínas
580	SignalP	AFE_3201 twin-arginine translocation protein, TatA/E family	Destinación de proteínas
581	TMHMM	AFE_0412 type I secretion system ATPase	Destinación de proteínas
582	TMHMM	AFE_0413 type I secretion membrane fusion protein, HlyD family	Destinación de proteínas
583	TMHMM	AFE_0473 preprotein translocase, SecE subunit	Destinación de proteínas
584	TMHMM	AFE_1038 protein-export membrane protein SecD	Destinación de proteínas
585	TMHMM	AFE_1039 protein-export membrane protein SecF	Destinación de proteínas
586	TMHMM	AFE_1683 signal peptidase I (lepB)	Destinación de proteínas

587	TMHMM	AFE_2483 signal peptidase II (lspA)	Destinación de proteínas
588	TMHMM	AFE_2685 preprotein translocase, SecY subunit (secY)	Destinación de proteínas
589	TMHMM	AFE_2719 preprotein translocase, SecE subunit (secE)	Destinación de proteínas
590	TMHMM	AFE_0060 Sec-independent protein translocase TatC	Destinación de proteínas
591	TMHMM	AFE_0061 twin-arginine translocation protein TatB	Destinación de proteínas
592	SecretomeP	AFE_1106 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (ppiB)	Destinación de proteínas
593	SecretomeP	AFE_1214 thiol_disulfide interchange protein, putative	Destinación de proteínas
594	SignalP	AFE_1959 thiol_disulfide interchange protein, DsbA family	Destinación de proteínas
595	SignalP	AFE_2516 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type	Destinación de proteínas
596	TMHMM	AFE_1933 heat shock protein HtpX (htpX-1)	Destinación de proteínas
597	TMHMM	AFE_2754 disulfide bond formation protein B, putative	Destinación de proteínas
598	TMHMM	AFE_2781 heat shock protein HtpX (htpX-2)	Destinación de proteínas
599	TMHMM	AFE_0911 proLipoProtein diacylglycerol transferase (lgt)	Destinación de proteínas
600	TMHMM	AFE_2440 apoLipoProtein N-acyltransferase (outE)	Destinación de proteínas
601	SecretomeP	AFE_0035 ribosomal protein L13 (rplM)	Síntesis de proteínas
602	SecretomeP	AFE_0491 ribosomal protein L35 (rpmI)	Síntesis de proteínas
603	SecretomeP	AFE_2381 ribosomal protein L31 (rpmE)	Síntesis de proteínas
604	SecretomeP	AFE_2690 ribosomal protein L6 (rplF)	Síntesis de proteínas
605	SecretomeP	AFE_2717 ribosomal protein L11 (rplK)	Síntesis de proteínas
606	TMHMM	AFE_0466 ribonucleoside-diphosphate reductase, beta subunit (nrdB)	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos
607	TMHMM	AFE_2756 phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, catalytic subunit (purE)	Purinas, pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos
608	SecretomeP	AFE_1087 transcriptional regulator, putative	Funciones regulatorias
609	TMHMM	AFE_2828 transcriptional regulator	Funciones regulatorias
610	TMHMM	AFE_2987 transcriptional regulator, LysR family	Funciones regulatorias
611	TMHMM	AFE_0152 sensor histidine kinase	Funciones regulatorias
612	TMHMM	AFE_0781 sensor histidine kinase	Funciones regulatorias
613	TMHMM	AFE_0869 sensor histidine kinase KdpD (kdpD)	Funciones regulatorias
614	TMHMM	AFE_1063 sensor histidine kinase	Funciones regulatorias
615	TMHMM	AFE_1649 phosphate regulon sensor protein PhoR (phoR)	Funciones regulatorias
616	TMHMM	AFE_2588 sensor histidine kinase	Funciones regulatorias
617	TMHMM	AFE_2842 sensor protein PilS, putative	Funciones regulatorias
618	TMHMM	AFE_2919 sensor histidine kinase	Funciones regulatorias
619	TMHMM	AFE_2998 sensor histidine kinase	Funciones regulatorias
620	TMHMM	AFE_3001 nitrogen regulation protein NtrY, putative	Funciones regulatorias
621	TMHMM	AFE_3058 osmolarity sensor protein EnvZ, putative	Funciones regulatorias
622	TMHMM	AFE_3196 sensor histidine kinase	Funciones regulatorias
623	SecretomeP	AFE_0118 peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein	Proteínas de unión y transporte
624	SignalP	AFE_0123 peptide ABC transporter, periplasmic peptide-binding protein	Proteínas de unión y transporte
625	TMHMM	AFE_0119 peptide ABC transporter, permease protein	Proteínas de unión y transporte
626	TMHMM	AFE_0120 peptide ABC transporter, permease protein	Proteínas de unión y transporte
627	TMHMM	AFE_0446 amino acid permease family protein	Proteínas de unión y transporte
628	TMHMM	AFE_0645 amino acid permease family protein	Proteínas de unión y transporte
629	TMHMM	AFE_1303 amino acid permease family protein	Proteínas de unión y transporte
630	TMHMM	AFE_2321 amino acid permease family protein	Proteínas de unión y transporte
631	TMHMM	AFE_2598 amino acid permease family protein	Proteínas de unión y transporte
632	SignalP	AFE_1151 phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein (pstS-1)	Proteínas de unión y transporte
633	SignalP	AFE_1648 phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein (pstS-2)	Proteínas de unión y transporte
634	TMHMM	AFE_1149 phosphate ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
635	TMHMM	AFE_1150 phosphate ABC transporter, permease protein PstC (pstC-1)	Proteínas de unión y transporte
636	TMHMM	AFE_1646 phosphate ABC transporter, permease protein PstA (pstA)	Proteínas de unión y transporte
637	TMHMM	AFE_1647 phosphate ABC transporter, permease protein PstC (pstC-2)	Proteínas de unión y transporte
638	TMHMM	AFE_2225 voltage-gated chloride channel	Proteínas de unión y transporte
639	TMHMM	AFE_2226 voltage-gated chloride channel	Proteínas de unión y transporte

640	TMHMM	AFE_2742 sulfate transporter family protein	Proteínas de unión y transporte
641	TMHMM	AFE_3203 voltage-gated chloride channel	Proteínas de unión y transporte
642	SignalP	AFE_0580 carbohydrate-selective porin, OprB family	Proteínas de unión y transporte
643	SignalP	AFE_0848 carbohydrate-selective porin, OprB family	Proteínas de unión y transporte
644	TMHMM	AFE_0786 sugar transporter family protein	Proteínas de unión y transporte
645	TMHMM	AFE_1100 C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein	Proteínas de unión y transporte
646	TMHMM	AFE_1240 C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein, putative	Proteínas de unión y transporte
647	TMHMM	AFE_2983 C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport protein	Proteínas de unión y transporte
648	SignalP	AFE_1143 heavy metal efflux transporter, MFP subunit, putative	Proteínas de unión y transporte
649	SecretomeP	AFE_0108 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
650	SecretomeP	AFE_0112 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
651	SecretomeP	AFE_0416 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
652	SecretomeP	AFE_0797 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
653	SecretomeP	AFE_0823 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
654	SecretomeP	AFE_0830 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
655	SignalP	AFE_0174 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
656	SignalP	AFE_0674 heavy metal efflux system protein, putative	Proteínas de unión y transporte
657	SignalP	AFE_0796 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
658	SignalP	AFE_0800 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
659	SignalP	AFE_0806 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
660	SignalP	AFE_0810 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
661	SignalP	AFE_0864 K ⁺ -transporting ATPase, C subunit (kdpC-2)	Proteínas de unión y transporte
662	SignalP	AFE_1054 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
663	SignalP	AFE_1142 outer membrane heavy metal efflux protein, putative	Proteínas de unión y transporte
664	SignalP	AFE_1590 iron compound ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative	Proteínas de unión y transporte
665	SignalP	AFE_1591 molybdenum ABC transporter, periplasmic molybdate-binding protein, putative	Proteínas de unión y transporte
666	SignalP	AFE_1592 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
667	SignalP	AFE_1595 iron compound ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative	Proteínas de unión y transporte
668	SignalP	AFE_1597 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
669	SignalP	AFE_1601 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
670	SignalP	AFE_2270 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
671	SignalP	AFE_2277 TonB-dependent receptor, putative	Proteínas de unión y transporte
672	SignalP	AFE_2438 cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	Proteínas de unión y transporte
673	SignalP	AFE_2957 tol-pal system beta propeller repeat protein TolB	Proteínas de unión y transporte
674	SignalP	AFE_3103 TonB-dependent receptor	Proteínas de unión y transporte
675	TMHMM	AFE_0022 cation channel protein, putative	Proteínas de unión y transporte
676	TMHMM	AFE_0029 plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase, putative	Proteínas de unión y transporte
677	TMHMM	AFE_0107 MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Proteínas de unión y transporte
678	TMHMM	AFE_0165 cation transporting P-type ATPase	Proteínas de unión y transporte
679	TMHMM	AFE_0187 cation channel protein, putative	Proteínas de unión y transporte
680	TMHMM	AFE_0193 ammonium transporter (amt-1)	Proteínas de unión y transporte
681	TMHMM	AFE_0198 ammonium transporter (amt-2)	Proteínas de unión y transporte
682	TMHMM	AFE_0326 cation efflux system protein, putative	Proteínas de unión y transporte
683	TMHMM	AFE_0329 copper-translocating P-type ATPase	Proteínas de unión y transporte
684	TMHMM	AFE_0578 ferrous iron transport protein B (feoB)	Proteínas de unión y transporte
685	TMHMM	AFE_0622 mercuric resistance protein MerC	Proteínas de unión y transporte
686	TMHMM	AFE_0625 K ⁻ -transporting ATPase, A subunit (kdpA-1)	Proteínas de unión y transporte
687	TMHMM	AFE_0627 K ⁻ -transporting ATPase, A subunit (kdpA-2)	Proteínas de unión y transporte
688	TMHMM	AFE_0628 K ⁻ -transporting ATPase, B subunit (kdpB-1)	Proteínas de unión y transporte
689	TMHMM	AFE_0648 Na ⁺ /H ⁺ antiporter	Proteínas de unión y transporte
690	TMHMM	AFE_0678 cation efflux permease, putative	Proteínas de unión y transporte
691	TMHMM	AFE_0682 cation diffusion facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte

692	TMHMM	AFE_0773 magnesium-translocating P-type ATPase	Proteínas de unión y transporte
693	TMHMM	AFE_0794 TonB family protein	Proteínas de unión y transporte
694	TMHMM	AFE_0799 MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Proteínas de unión y transporte
695	TMHMM	AFE_0825 MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Proteínas de unión y transporte
696	TMHMM	AFE_0828 MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Proteínas de unión y transporte
697	TMHMM	AFE_0853 Na ₊ /H ⁺ antiporter, putative	Proteínas de unión y transporte
698	TMHMM	AFE_0865 K ⁺ -transporting ATPase, B subunit (kdpB-2)	Proteínas de unión y transporte
699	TMHMM	AFE_0866 K ⁺ -transporting ATPase, A subunit (kdpA-3)	Proteínas de unión y transporte
700	TMHMM	AFE_0892 Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaA	Proteínas de unión y transporte
701	TMHMM	AFE_1073 copper-translocating P-type ATPase	Proteínas de unión y transporte
702	TMHMM	AFE_1104 cation-transporting P-type ATPase, putative	Proteínas de unión y transporte
703	TMHMM	AFE_1124 potassium-efflux system protein	Proteínas de unión y transporte
704	TMHMM	AFE_1168 ammonium transporter family protein	Proteínas de unión y transporte
705	TMHMM	AFE_1332 potassium uptake protein (kup)	Proteínas de unión y transporte
706	TMHMM	AFE_1588 cation diffusion facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
707	TMHMM	AFE_1589 ABC transporter, permease protein, FecCD family	Proteínas de unión y transporte
708	TMHMM	AFE_1594 ABC transporter, permease protein, FecCD family	Proteínas de unión y transporte
709	TMHMM	AFE_1599 MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Proteínas de unión y transporte
710	TMHMM	AFE_1654 cation diffusion facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
711	TMHMM	AFE_2126 metal ion transporter, NRAMP family	Proteínas de unión y transporte
712	TMHMM	AFE_2222 plasma-membrane proton-efflux P-type ATPase	Proteínas de unión y transporte
713	TMHMM	AFE_2248 Na ⁺ /H ⁺ antiporter, putative	Proteínas de unión y transporte
714	TMHMM	AFE_2272 MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Proteínas de unión y transporte
715	TMHMM	AFE_2435 cation ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
716	TMHMM	AFE_2436 cation ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
717	TMHMM	AFE_2453 sodium calcium exchanger	Proteínas de unión y transporte
718	TMHMM	AFE_2552 MotA/TolQ/ExbB proton channel family protein	Proteínas de unión y transporte
719	TMHMM	AFE_2572 cation efflux family protein	Proteínas de unión y transporte
720	TMHMM	AFE_2920 metal ion transporter, NRAMP family	Proteínas de unión y transporte
721	TMHMM	AFE_3111 magnesium and cobalt transport protein, putative	Proteínas de unión y transporte
722	TMHMM	AFE_3113 magnesium and cobalt transport protein, putative	Proteínas de unión y transporte
723	TMHMM	AFE_3114 magnesium and cobalt transport protein, putative	Proteínas de unión y transporte
724	TMHMM	AFE_0663 copper-translocating P-type ATPase	Proteínas de unión y transporte
725	TMHMM	AFE_0671 heavy metal efflux pump, CzcA family	Proteínas de unión y transporte
726	TMHMM	AFE_2269 cytosine/purines/uracil/thiamine/allantoin permease family protein	Proteínas de unión y transporte
727	LipoP	AFE_2180 RND efflux system, drug efflux transporter, outer membrane LipoProtein	Proteínas de unión y transporte
728	LipoP	AFE_2985 RND efflux system, drug efflux transporter, outer membrane LipoProtein	Proteínas de unión y transporte
729	SignalP	AFE_1256 toluene tolerance protein, putative	Proteínas de unión y transporte
730	TMHMM	AFE_0913 drug resistance transporter, EmrB/QacA family	Proteínas de unión y transporte
731	TMHMM	AFE_0930 toxin secretion ABC transporter, ATP-binding protein, HlyB family	Proteínas de unión y transporte
732	TMHMM	AFE_2064 ABC transporter, ATP-binding protein, MsbA family	Proteínas de unión y transporte
733	TMHMM	AFE_2124 drug resistance transporter, EmrB/QacA family	Proteínas de unión y transporte
734	TMHMM	AFE_2556 LipoProtein releasing system transmembrane protein LolC	Proteínas de unión y transporte
735	TMHMM	AFE_2855 drug resistance transporter, putative, EmrB/QacA subfamily	Proteínas de unión y transporte
736	TMHMM	AFE_2867 toluene tolerance protein Ttg2B, putative	Proteínas de unión y transporte
737	TMHMM	AFE_2984 drug resistance transporter, EmrB/QacA family	Proteínas de unión y transporte
738	TMHMM	AFE_3098 ABC-2 type transporter, permease protein, NodJ family	Proteínas de unión y transporte
739	SignalP	AFE_0365 major outer membrane protein 40 (omp40)	Proteínas de unión y transporte
740	TMHMM	AFE_2872 MIP family channel protein	Proteínas de unión y transporte
741	SignalP	AFE_0629 K ⁺ -transporting ATPase, C subunit (kdpC-1)	Proteínas de unión y transporte
742	SignalP	AFE_2181 drug resistance transporter, putative	Proteínas de unión y transporte
743	TMHMM	AFE_1144 heavy metal efflux pump, CzcA family	Proteínas de unión y transporte

744	LipoP	AFE_0736 efflux transporter, RND family, MFP subunit	Proteínas de unión y transporte
745	LipoP	AFE_0993 efflux transporter, RND family, MFP subunit	Proteínas de unión y transporte
746	LipoP	AFE_1057 outer membrane efflux protein	Proteínas de unión y transporte
747	LipoP	AFE_3069 efflux transporter, RND family, MFP subunit	Proteínas de unión y transporte
748	SignalP	AFE_0247 secretion protein, HlyD family	Proteínas de unión y transporte
749	SignalP	AFE_0668 outer membrane efflux protein	Proteínas de unión y transporte
750	SignalP	AFE_0669 efflux transporter, RND family, MFP subunit	Proteínas de unión y transporte
751	SignalP	AFE_0735 outer membrane efflux protein	Proteínas de unión y transporte
752	SignalP	AFE_1049 outer membrane efflux protein	Proteínas de unión y transporte
753	SignalP	AFE_1050 efflux transporter, RND family, MFP subunit	Proteínas de unión y transporte
754	SignalP	AFE_1058 efflux transporter, RND family, MFP subunit	Proteínas de unión y transporte
755	SignalP	AFE_1478 secretion protein, HlyD family	Proteínas de unión y transporte
756	SignalP	AFE_1586 ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative	Proteínas de unión y transporte
757	SignalP	AFE_2771 secretion protein, HlyD family	Proteínas de unión y transporte
758	SignalP	AFE_2916 efflux transporter, RND family, MFP subunit	Proteínas de unión y transporte
759	SignalP	AFE_2917 RND efflux system, outer membrane LipoProtein, NodT family	Proteínas de unión y transporte
760	SignalP	AFE_2975 periplasmic solute-binding protein, putative	Proteínas de unión y transporte
761	SignalP	AFE_2981 periplasmic solute-binding protein, putative	Proteínas de unión y transporte
762	SignalP	AFE_3068 outer membrane efflux protein	Proteínas de unión y transporte
763	LipoP	AFE_1206 RND efflux system, outer membrane LipoProtein, NodT family	Proteínas de unión y transporte
764	TMHMM	AFE_0074 ABC-2 type transporter	Proteínas de unión y transporte
765	TMHMM	AFE_0125 ABC transporter, ATP-binding/permease protein	Proteínas de unión y transporte
766	TMHMM	AFE_0244 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
767	TMHMM	AFE_0245 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
768	TMHMM	AFE_0497 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
769	TMHMM	AFE_0737 transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Proteínas de unión y transporte
770	TMHMM	AFE_0768 major facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
771	TMHMM	AFE_0821 major facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
772	TMHMM	AFE_0907 ABC transporter, permease protein	Proteínas de unión y transporte
773	TMHMM	AFE_0989 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
774	TMHMM	AFE_0990 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
775	TMHMM	AFE_0992 transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Proteínas de unión y transporte
776	TMHMM	AFE_1051 transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Proteínas de unión y transporte
777	TMHMM	AFE_1059 transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Proteínas de unión y transporte
778	TMHMM	AFE_1121 transporter, putative	Proteínas de unión y transporte
779	TMHMM	AFE_1131 AmpG permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
780	TMHMM	AFE_1208 transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Proteínas de unión y transporte
781	TMHMM	AFE_1276 major facilitator family protein	Proteínas de unión y transporte
782	TMHMM	AFE_1301 mechanosensitive ion channel family protein	Proteínas de unión y transporte
783	TMHMM	AFE_1481 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
784	TMHMM	AFE_1482 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
785	TMHMM	AFE_1692 ABC transporter, CydDC cysteine exporter (CydDC-E) family, permease/ATP-binding protein CydC	Proteínas de unión y transporte
786	TMHMM	AFE_1693 ABC transporter, CydDC cysteine exporter (CydDC-E) family, permease/ATP-binding protein CydD	Proteínas de unión y transporte
787	TMHMM	AFE_2227 major facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
788	TMHMM	AFE_2385 ABC transporter, permease protein	Proteínas de unión y transporte
789	TMHMM	AFE_2391 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
790	TMHMM	AFE_2403 major facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
791	TMHMM	AFE_2422 ABC transporter, ATP-binding/permease protein	Proteínas de unión y transporte
792	TMHMM	AFE_2486 ABC transporter, ATP-binding/permease protein	Proteínas de unión y transporte
793	TMHMM	AFE_2923 ABC transporter, permease protein, putative	Proteínas de unión y transporte
794	TMHMM	AFE_3037 major facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
795	TMHMM	AFE_3071 transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Proteínas de unión y transporte

796	TMHMM	AFE_3190 major facilitator family transporter	Proteínas de unión y transporte
797	SignalP	AFE_0096 oxidoreductase, short-chain dehydrogenase/reductase family	Función desconocida
798	SignalP	AFE_0519 acyltransferase family protein	Función desconocida
799	SignalP	AFE_2184 pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Función desconocida
800	SignalP	AFE_2266 phosphorylase, putative	Función desconocida
801	SignalP	AFE_2835 transglycosylase, putative	Función desconocida
802	SignalP	AFE_2911 lipase/esterase, putative	Función desconocida
803	TatP	AFE_0801 phosphoesterase family protein	Función desconocida
804	TatP	AFE_0831 phosphoesterase family protein	Función desconocida
805	TMHMM	AFE_1428 hybrid cluster protein	Función desconocida
806	TMHMM	AFE_2927 DoxD family protein_pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	Función desconocida
807	TMHMM	AFE_2976 DoxD-like family protein	Función desconocida
808	TMHMM	AFE_2980 DoxD-like family protein	Función desconocida
809	LipoP	AFE_1147 dsbG domain protein	Función desconocida
810	LipoP	AFE_2469 ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family	Función desconocida
811	SecretomeP	AFE_0169 TonB-dependent receptor domain protein	Función desconocida
812	SecretomeP	AFE_0368 apaG protein	Función desconocida
813	SecretomeP	AFE_0530 ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	Función desconocida
814	SecretomeP	AFE_2329 NHL repeat protein	Función desconocida
815	SecretomeP	AFE_3109 WrbA family protein	Función desconocida
816	SignalP	AFE_0582 NLP/P60 family protein	Función desconocida
817	SignalP	AFE_0847 PQQ enzyme repeat domain protein	Función desconocida
818	SignalP	AFE_0851 dsbG domain protein	Función desconocida
819	SignalP	AFE_0926 GTP-binding protein	Función desconocida
820	SignalP	AFE_1111 PQQ enzyme repeat protein	Función desconocida
821	SignalP	AFE_1154 PQQ enzyme repeat domain protein	Función desconocida
822	SignalP	AFE_1823 DNA topoisomerase domain protein	Función desconocida
823	SignalP	AFE_1962 thiol_disulfide interchange domain protein	Función desconocida
824	SignalP	AFE_2030 thiol_disulfide interchange domain protein	Función desconocida
825	SignalP	AFE_2513 M23/M37 peptidase domain protein	Función desconocida
826	SignalP	AFE_2576 YceI-like family protein	Función desconocida
827	SignalP	AFE_2650 ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein	Función desconocida
828	SignalP	AFE_2753 thiol/disulfide interchange domain protein	Función desconocida
829	SignalP	AFE_3006 LysM domain protein	Función desconocida
830	TatP	AFE_0846 Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	Función desconocida
831	TatP	AFE_1396 Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	Función desconocida
832	TatP	AFE_2974 Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	Función desconocida
833	TatP	AFE_2982 Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	Función desconocida
834	SignalP	AFE_1743 PAP2 family protein	Función desconocida
835	TMHMM	AFE_0183 crcB protein, putative	Función desconocida
836	TMHMM	AFE_0897 YjgP/YjgQ family protein	Función desconocida
837	TMHMM	AFE_0898 YjgP/YjgQ family protein	Función desconocida
838	TMHMM	AFE_1030 CvpA family protein	Función desconocida
839	TMHMM	AFE_1034 CBS domain protein	Función desconocida
840	TMHMM	AFE_1185 YihY family protein (yihY)	Función desconocida
841	TMHMM	AFE_2128 PAP2 family protein	Función desconocida
842	TMHMM	AFE_2501 PAP2 family protein	Función desconocida
843	TMHMM	AFE_2672 PAP2 family protein	Función desconocida
844	TMHMM	AFE_2767 YGGT family protein	Función desconocida
845	TMHMM	AFE_2833 MJ0042 family finger-like domain protein	Función desconocida