

UCH-FC
DOC-F
V 152
C. 1

La proteómica como herramienta para el estudio de
microorganismos utilizados en biominería:
CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE OXIDACIÓN
DE TIOSULFATO EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Microbiología



Facultad de Ciencias

por

Lisette Andrea Valenzuela González

Agosto del 2007

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

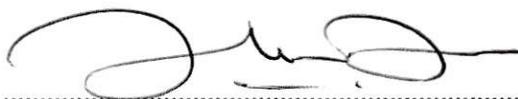
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

Lisette Andrea Valenzuela González

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día.

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

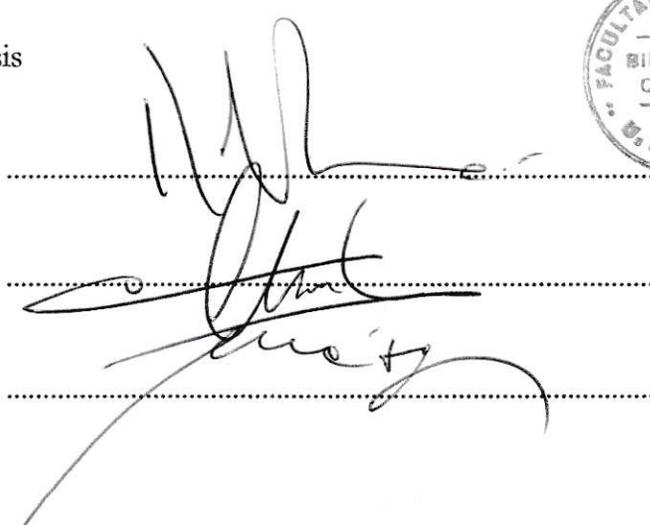


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Romilio Espejo
(Presidente)

Dr. Davor Cotorás

Dr. Claudio Vásquez





A mi esposo Jorge y mi hijo Miguel

y en especial a mis padres

AGRADECIMIENTOS



En primer lugar deseo agradecer la acogida que tuve en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por los miembros del comité del doctorado en Ciencias mención Microbiología, que aún sin conocerme, me dieron su apoyo y confiaron en mí. Además, los consejos, sugerencias e ideas que recibí de muchos de mis profesores, contribuyeron enormemente a mi formación académica y profesional.

Tanto mis estudios de postgrado como la realización de esta Tesis no hubieran sido posible, sin el financiamiento económico otorgado por el Gobierno de Chile a través de las becas CONICYT para el financiamiento de mis estudios y de mi proyecto de Tesis. También agradezco a la Fundación María Ghilardi Venegas que financió completamente los últimos dos años de mi estancia en este Programa de Doctorado.

Sin duda agradezco en particular el apoyo personal y académico brindado por mi tutor de Tesis, el Dr. Carlos Jerez, quien sin conocerme confió en mí y me recibió en su Laboratorio. Con su ejemplo me ha inculcado la pasión por el trabajo científico, la dedicación y la incansable búsqueda del perfeccionismo en cada una de las tareas encomendadas. Además, durante todos estos años, ha sabido comprender mi situación familiar brindándome el apoyo necesario para cumplir mis funciones de estudiante y de madre. También agradezco al Dr. Nicolás Guiliani por su amistad, y por los aportes y comentarios que realizó durante todo el desarrollo de mi Tesis.

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio, que me acompañaron durante estos años. En primer lugar a Pablo Ramírez quien me guió durante los primeros meses de estancia en el laboratorio, y a

Claudio Navarro por su invaluable ayuda y contribución a esta Tesis durante el análisis de los complejos proteicos. A Juan Araos por su generosidad y su ayuda siempre incondicional, y por supuesto a todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Francisco Chávez y Mario Vera, por su apoyo e innumerables consejos, y a Simón Beard por su ayuda en los análisis bioinformáticos, sus buenas ideas y comentarios.

Todo el trabajo y la dedicación entregada a esta Tesis la dedico a mi esposo Jorge, quien me brindó su amor, compañía y apoyo durante todos estos años, y a mi hijo Miguel, quien trajo la alegría y plenitud a mi vida. Un agradecimiento especial a mis padres quienes con mucho esfuerzo y amor me mostraron el valor de la educación y me apoyaron en todos los proyectos que he emprendido en mi vida. Además, a pesar de estar lejos, me ayudaron a cuidar mi bebé cuando tuve que reanudar mis estudios de postgrado, y en muchas otras ocasiones en que los he necesitado.

Finalmente, no puedo dejar de mencionar a mis amigos y compañeros de carrera que forman parte de mi vida y de mi familia en Santiago, y que han permitido hacer más placentera mi estancia en esta ciudad; y por supuesto el cariño y apoyo de toda mi familia, en especial de mis hermanos Gerson y Carolina, y la alegría y el amor que recibí incondicionalmente de mi abuelita Teresa.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico del azufre.....	7
Figura 2.	Árbol filogenético de procariontes oxidadores de azufre.....	10
Figura 3.	Modelo para la oxidación del tiosulfato en <i>Paracoccus panthotropus</i>	12
Figura 4.	Esquema de los genes/enzimas putativamente asociados a la oxidación de compuestos azufrados en <i>Thiobacillus denitrificans</i>	13
Figura 5.	Modelo de oxidación del tiosulfato en bacterias fotótrofas de las <i>Gammaproteobacterias</i> y quimiotrofas estrictas de las <i>Betaproteobacterias</i>	14
Figura 6.	Modelo para la oxidación del azufre en <i>Acidianus ambivalens</i> ..	16
Figura 7.	Mecanismos de solubilización de los sulfuros metálicos.....	19
Figura 8.	Modelo de oxidación del hierro (II) por <i>A. ferrooxidans</i>	25
Figura 9.	Modelo para la oxidación del azufre por <i>A. ferrooxidans</i>	28
Figura 10.	Estrategia empleada para la producción de anticuerpos policlonales anti-P21 de <i>A. ferrooxidans</i>	40
Figura 11.	Espectrograma de absorción para los compuestos ferricianuro de potasio y ferrocianuro de potasio.....	47
Figura 12.	Análisis de la expresión de la proteína P21 durante el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 en azufre.....	59
Figura 13.	Entrecruzamiento de la proteína P21 en extractos de proteínas totales de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en azufre.....	60
Figura 14.	Electroforesis en geles ácidos de extractos proteicos totales de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	63
Figura 15.	SDS-PAGE proveniente de una electroforesis nativa en geles ácidos de extractos proteicos totales de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	64
Figura 16.	Análisis genómico del gen <i>p21</i>	65



<i>Figura 17.</i>	Representación esquemática de la tiosulfato quinona oxidoreductasa (TQO) de <i>Acidianus ambivalens</i>	68
<i>Figura 18.</i>	Expresión de los genes <i>doxDA</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 mediante RT-PCR.....	70
<i>Figura 19.</i>	Análisis de cotranscripción de los genes <i>modA2</i> y <i>doxDA2</i> de <i>A. ferrooxidans</i> por RT-PCR.....	73
<i>Figura 20.</i>	Expresión diferencial de las proteínas expresadas por <i>A. ferrooxidans</i>	76
<i>Figura 21.</i>	2D-PAGE de proteínas totales de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.	78
<i>Figura 22.</i>	Análisis de la expresión de la proteína ModA2 en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	81
<i>Figura 23.</i>	Diagrama esquemático representando la organización de los genes que conforman el sistema de secreción tipo IV.....	88
<i>Figura 24.</i>	SDS-PAGE de las proteínas periplásmicas extraídas de cultivos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	90
<i>Figura 25.</i>	Proteínas periplásmicas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en tiosulfato clasificadas de acuerdo a la categoría funcional.....	92
<i>Figura 26.</i>	Distribución de las proteínas periplásmicas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en tiosulfato clasificadas de acuerdo a la señal de exportación.....	93
<i>Figura 27.</i>	Distribución de las proteínas periplásmicas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en tiosulfato, de acuerdo a su punto isoeléctrico.....	99
<i>Figura 28.</i>	Número de proteínas identificadas desde las muestras de periplasma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	100
<i>Figura 29.</i>	Separación de proteínas periplásmicas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 mediante 2D-PAGE.....	103
<i>Figura 30.</i>	Modelo para la oxidación del tiosulfato en <i>A. ferrooxidans</i>	115
<i>Figura 31.</i>	Representación esquemática de un sistema putativo de exportación de polisacárido en <i>A. ferrooxidans</i>	118



LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Compuestos inorgánicos de azufre de relevancia biológica.....	8
Tabla 2.	Proteínas asociadas a la proteína P21 de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	64
Tabla 3.	Actividad tiosulfato deshidrogenasa en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	67
Tabla 4.	Actividad tiosulfato deshidrogenasa en extractos proteicos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	69
Tabla 5.	Comparación de los niveles de expresión de los transcritos <i>doxDA1</i> y <i>doxDA2</i> cuantificados mediante PCR en tiempo real.	72
Tabla 6.	Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente durante el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en azufre o en ion ferroso.....	77
Tabla 7.	Proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> de las cuales se obtuvo un mayor número de péptidos de células crecidas en azufre y en tiosulfato, en comparación con los encontrados en células crecidas en ion ferroso.....	84
Tabla 8.	Proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> de las cuales se obtuvo un mayor número de péptidos de células crecidas en azufre, en comparación con los encontrados en células crecidas en ion ferroso.....	85
Tabla 9.	Proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> de las cuales se obtuvo un mayor número de péptidos de células crecidas en azufre, en comparación con los encontrados en células crecidas en tiosulfato.....	86
Tabla 10.	Proteínas con señal de exportación identificadas en extractos periplásmicos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, crecido en tiosulfato.....	94
Tabla 11.	Proteínas sin señal de exportación identificadas en extractos periplásmicos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270, crecido en tiosulfato.....	97
Tabla 12.	Análisis diferencial e identificación de las proteínas presentes en los extractos periplásmicos de <i>A. ferrooxidans</i> crecido en diferentes fuentes de energía.....	104
Tabla 13.	Proteínas identificadas en extractos periplásmicos de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en diferentes sustratos energéticos.....	125



LISTA DE ABREVIATURAS

- AFE:** Marco abierto de lectura en la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* (a partir de la base de datos del TIGR)
- AFO:** Marco abierto de lectura en la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* (a partir de la base de datos local)
- BN-PAGE:** “Blue native electrophoresis”: Electroforesis nativa en geles
- BSA:** Seroalbúmina bovina
- 2D-PAGE:** Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
- 2D-NEPHGE:** Electroforesis bidimensional en condiciones de no equilibrio
- CAPS:** Ácido 3-ciclohexilamino-1-propano
- CHAPS:** 3-[(3-cholamidopropil)-dimetilalmino] propansulfato
- DMSO:** Dimetil sulfóxido
- DO₆₀₀:** Densidad óptica a 600 nm
- DTT:** Ditiotreitól
- EDTA:** Ácido etilendiaminatetraacético
- ESI-QUAD-TOF:** Ionización por electro-spray con analizador de cuádruplo y tiempo de vuelo
- FT-ICR MS:** Espectrometría de masas con transformada de Fourier acoplada a ciclotrón de resonancia de iones (“Fourier transform ion cyclotron resonant mass spectrometry”)
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución (“High-performance liquid chromatography”)
- IEF:** Isoelectroenfoque
- IPTG:** Iso propil tio-β-galactósido
- LB:** Luria Bertani
- LCQ/MS:** Espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida

(“Liquid chromatography-quadrupole mass spectrometry”)

MS: Espectrometría de masas

NCBI: Centro Nacional de Información en Biotecnología (“National Center for Biotechnology Information”)

ORF: Marco abierto de lectura

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pI: punto isoeléctrico

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

RT-PCR: Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida.

TAE: Tris-acetato EDTA

TBS: Amortiguador Tris salino

TIGR: Instituto de Investigaciones Genómicas (“The Institute for Genomic Research”)

RESUMEN

Existe un gran interés en el desarrollo de tecnologías biológicas que permitan diseñar procesos productivos a nivel industrial que causen un menor impacto en el ambiente, y que a la vez tengan menores costos operacionales. Dentro de estas tecnologías biológicas se destaca la biolixiviación, que ha sido utilizada comercialmente en el tratamiento de minerales sulfurados de baja ley para la recuperación de metales como oro, uranio y cobre. Este proceso se refiere a la catálisis de la disolución de ciertos componentes mineralógicos a través de la acción directa o indirecta de bacterias quimiolitotróficas. El microorganismo involucrado más estudiado es el mesófilo acidófilo *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que posee la capacidad de catalizar la oxidación del ion ferroso y de compuestos de azufre reducidos (como azufre elemental, sulfuros, tiosulfato, etc.) utilizando oxígeno como aceptor de electrones y generando ácido sulfúrico como uno de los productos finales. Siendo la industria del cobre una de las principales actividades económicas en nuestro país, existe un gran interés por estudiar con profundidad las vías de oxidación de los compuestos azufrados por *A. ferrooxidans*, de tal manera de entender el proceso de biolixiviación y poder desarrollar en el futuro nuevas tecnologías que permitan optimizar el proceso.

Uno de los principales intermediarios en la oxidación de los compuestos azufrados en las bacterias es el tiosulfato. Hasta el momento se han postulado tres vías de oxidación de tiosulfato en los microorganismos. Algunas de estas vías son catalizadas por complejos multiproteicos presentes en el periplasma de las bacterias. La primera vía involucra la participación de la enzima tiosulfato azufre transferasa (TST) encargada de romper el tiosulfato generándose azufre y sulfito. En la segunda vía participaría la enzima tiosulfato deshidrogenasa (TD), la cual oxida el tiosulfato a tetrionato. Por otro lado, el tiosulfato puede ser oxidado completamente a sulfato mediante la acción de un complejo multiproteico ubicado en el periplasma conocido como “sistema Sox”. Las dos primeras vías de oxidación del tiosulfato son comunes de bacterias quimiolitotróficas acidófilas mientras que la tercera vía se encuentra principalmente en bacterias quimiolitotróficas neutrófilas. Previamente, en nuestro laboratorio se identificó una posible TST (P21) cuyos niveles de expresión se encontraron incrementados en células de *A. ferrooxidans* crecido en azufre respecto al crecimiento en ion ferroso, pero no se encontró una actividad enzimática en la proteína recombinante. Por otro lado, otros autores han demostrado que células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre poseen actividad TD, sin embargo no se conocen las proteínas responsables de esta actividad.

Durante esta Tesis se encontró que la proteína P21 estaría formando un complejo multiproteico junto con otras proteínas cuyos genes están codificados en la misma unidad transcripcional. Mediante análisis proteómicos detectamos que la mayoría de estas proteínas poseen niveles de expresión mayores en las células crecidas en compuestos de azufre reducido que en las células crecidas en ion ferroso. Dos de estas proteínas podrían estar directamente relacionadas con la oxidación de tiosulfato ya que corresponderían a una tetrionato hidrolasa y a una proteína de unión a sulfato o tiosulfato. Por otro lado, demostramos que la actividad TD está presente no sólo en las células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre, si no también en las células crecidas en tiosulfato y en ion ferroso, pero fue mayor en las células crecidas en tiosulfato. Además, la actividad TD se detectó en la fracción soluble, en la de membrana y en la fracción periplásmica de las células crecidas en tiosulfato. *A. ferrooxidans* posee dos genes que codifican para posibles TD de la familia de las tiosulfato quinona oxido reductasas, los cuales se encuentran en el contexto genómico de la P21. Nuestros análisis mediante PCR en tiempo real demostraron que el nivel de los respectivos transcritos fue mayor en las células crecidas en tiosulfato y pirita, respecto de las células crecidas en ion ferroso. Estas proteínas, llamadas DoxDA1 y DoxDA2, corresponderían a proteínas de membrana y por lo tanto, podrían estar dando cuenta de la actividad TD asociada a la fracción de membrana.

Con el fin de identificar otras proteínas relacionadas con la oxidación de compuestos reducidos de azufre en *A. ferrooxidans*, se realizó un análisis proteómico de los extractos proteicos totales y periplásmicos de esta bacteria. A partir de los extractos proteicos totales, identificamos una proteína de exportación de polisacárido capsular (WcbC), cuyos niveles de expresión se encontraron incrementados en las células crecidas en tiosulfato y azufre con respecto a los niveles detectados en las células crecidas en ion ferroso. Además identificamos, cuatro proteínas de la familia Trb, cuyos niveles de expresión se encontraron incrementados en células crecidas en azufre respecto a las células crecidas en tiosulfato o en ion ferroso. En otros microorganismos estas proteínas están involucradas en procesos de adherencia, conjugación o secreción. Por otro lado, encontramos otras proteínas con niveles de expresión mayores en las células crecidas en compuestos de azufre reducido, en comparación con ion ferroso, entre ellas, una posible tiosulfato deshidrogenasa (DoxDA1), la proteína hierro oxidasa (Iro o HiPIP) y tres proteínas de unión a sustrato que posiblemente participen en la unión de sulfato o tiosulfato.

Los análisis proteómicos a gran escala mediante espectrometría de masas FT-ICR MS de la fracción periplásmica de las células crecidas en tiosulfato, azufre e ion ferroso, permitió identificar 216 proteínas. De éstas, 130 se expresaron durante el crecimiento de la bacteria en tiosulfato. La mayor parte de estas proteínas tiene un punto isoeléctrico básico y poseen

una señal de exportación característica del sistema de secreción tipo II (Sec). Estas proteínas se clasificaron principalmente como proteínas de transporte y de unión, proteínas del metabolismo energético, precursores de proteínas de la envoltura celular, chaperonas periplásmicas y proteínas sin homólogos conocidos en las bases de datos. Mediante 2D-PAGE se identificaron las proteínas periplásmicas que se expresaron en mayor nivel y se realizó un análisis diferencial de la expresión de estas proteínas entre las células de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, tiosulfato e ion ferroso. Dentro de las proteínas con niveles de expresión mayores en las células crecidas en azufre y tiosulfato se encontraron: una proteína de transporte de esteroides, una proteína de membrana externa FadL/TodX, una posible proteína TolB, receptores dependientes de TolB y varias proteínas desconocidas.

En general, este trabajo constituye el primer estudio de proteómica a gran escala en un microorganismo utilizado en biominería y demuestra que la utilización de este tipo de herramientas biológicas es un aporte invaluable en el estudio de los microorganismos para los cuáles se disponen de escasas herramientas genéticas.

ABSTRACT

There is a great interest in the development of biological technologies that allow designing productive processes at industrial level which cause a small impact in the environment, and simultaneously have minor operational costs. Within these biological technologies the bioleaching process has been used commercially to treat sulfide minerals to recover metals such as gold, uranium and copper. During bioleaching the catalyzed dissolution of certain ore components takes place through the direct or indirect action of chemolithotrophic bacteria. The most studied microorganism is the mesophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*, which has the capacity to oxidize ferrous iron and reduced sulfur compounds such as elementary sulfur, metal sulfides, thiosulfate, etc., by using oxygen as the electron acceptor and generating sulfuric acid as one of ends products. Being the industry of copper one of the main economic activities in our country, there is a great interest to study in depth the pathways for sulfur compounds oxidation by *A. ferrooxidans*. This knowledge will help us to understand the process of bioleaching and to develop future new technologies that will allow the optimization of the process.

Thiosulfate is a key intermediary in the oxidation of sulfur compounds in bacteria. Currently, three routes for thiosulfate oxidation in

microorganisms have been postulated. Some of these pathways are catalyzed by multiprotein complexes in the periplasm of bacteria. The first pathway involves the participation of a thiosulfate sulfur transferase enzyme (TST) that cleaves thiosulfate in sulfur and sulfite. The second pathway involves a thiosulfate dehydrogenase enzyme (TD), which oxidizes thiosulfate to tetrathionate. Finally, thiosulfate may be oxidized completely to sulfate by a periplasmic multiprotein complex named "Sox system". The two first pathways for thiosulfate oxidation are characteristics of acidophilic chemolithotrophic bacteria and the third pathway is characteristic of neutrophilic chemolithotrophic bacteria. Previously, we identified a putative TST (P21), whose level of expression was higher in cells of *A. ferrooxidans* grown on sulfur compared with the level found on ferrous iron. However, we did not find enzymatic activity for this recombinant protein. On the other hand, it has been shown that cells of *A. ferrooxidans* grown on sulfur have TD activity, but the proteins responsible of this activity are unknown.

During this thesis work, we found that P21 protein would be forming a complex in the periplasm with proteins whose genes are codified in the same transcriptional unit were *p21* gene. Furthermore, by proteomic analysis we detected that most of these proteins had higher levels of expression on sulfur or thiosulfate grown cells than those grown on ferrous iron. Two of these proteins may be related to the oxidation of thiosulfate since they corresponded to a tetrathionate hydrolase and a sulphate/

thiosulfate binding protein. On the other hand, we found that TD activity was present in cells grown on sulfur, thiosulfate and ferrous iron, being the highest in cells grown on thiosulfate. This activity was detected in the soluble, membrane and peiplasmic fractions of cells of *A. ferrooxidans* grown on thiosulfate. The genome of *A. ferrooxidans* contains two putatives TD that belong to the thiosulfate quinone oxidoreductase family of proteins. Real time PCR of their respective transcripts showed that the level of these transcripts was higher in cells grown on thiosulfate and pyrite than on ferrous iron. These proteins, named DoxDA1 and DoxDA2, would be membrane proteins and therefore could be responsible of the TD activity associated to the membrane fraction.

In order to identify other proteins related to the oxidation of sulfur compounds in *A. ferrooxidans*, a proteomic analysis of the total and periplasmic protein extracts was carried out. By means proteomic analysis of total protein extracts, we identified a capsule polysaccharide export protein, WcbC, whose level of expression was higher in cells grown on sulfur and thiosulfate than on ferrous iron. We also identified four proteins of the Trb family, whose level of expression was higher in cells grown on sulfur than in cells grown on thiosulfate or ferrous iron. In other microorganisms these proteins are involved in adhesion, conjugation or secretion processes. Furthermore, we found others proteins whose level of expression were higher in cells grown on sulfur compounds than on iron, among them, a

thiosulfate dehydrogenase putative (DoxDA1), the protein Iron oxidase (Iro o HiPIP) and three substrate binding proteins, possibly sulfate or thiosulfate binding proteins.

By high throughput proteomic analysis (FT-ICR MS) of the periplasmic fraction we identified 216 proteins. Of these, 130 proteins were expressed in cells of *A. ferrooxidans* grown on thiosulfate. Most of them had basic isoelectric points and contained a signal peptide characteristic of the type II secretion system (Sec). These proteins were principally classified as transport and binding proteins, proteins of the energetic metabolism, cell envelope precursors, fate and folding proteins and unknown proteins. By 2D-PAGE, we identified the proteins with the highest levels of expression and a differential analysis of them was done. Among proteins with the higher level of expression in cells of *A. ferrooxidans* grown on sulfur and thiosulfate, we identified a sterol carrier protein, an outer membrane protein, FadL/TodX, a TolB putative protein, some TolB dependent receptors and some unknown proteins.

In general, this work constitutes the first high throughput proteomic analysis in a biomining microorganism, and demonstrates that utilization of this approach is an important biological approach for the study of microorganisms for which there are limited genetic tools.

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Función biológica del azufre y de compuestos derivados	
del azufre.....	6
1.2 Oxidación disimilatoria de compuestos de azufre reducidos	
por microorganismos.	9
1.3 Biolixiviación de minerales azufrados.....	17
1.4 La especie <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	22
1.4.1. Oxidación de hierro (II) por <i>A. ferrooxidans</i>	23
1.4.2. Oxidación de azufre elemental y de compuestos de	
azufre parcialmente oxidados por <i>A. ferrooxidans</i>	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1 Cepas y condiciones de cultivo	32
2.2 Técnicas de biología molecular	32
2.2.1. Extracción de DNA cromosómico.	32
2.2.2. Extracción del RNA total.	33
2.2.3. Transcripción inversa.	34
2.2.4. Partidores y reacciones de PCR.	35
2.2.5. Electroforesis del DNA y RNA en geles de agarosa.	35
2.2.6. PCR en tiempo real.	36
2.3 Técnicas de proteómica	37
2.3.1. Preparación de extractos proteicos totales de	
<i>A. ferrooxidans</i> para SDS-PAGE.	37

2.3.2.	Determinación cuantitativa de proteínas.....	37
2.3.3.	Electroforesis de proteínas en minigeles de poliacrilamida-SDS.....	38
2.3.4.	Expresión y purificación de la proteína P21 recombinante (P21r)	38
2.3.5.	Preparación de anticuerpos policlonales anti-P21	39
2.3.6.	Detección inmunológica de las proteínas mediante “Western- blotting”	40
2.3.7.	Entrecruzamiento químico.....	41
2.3.8.	Inmunoprecipitación.....	42
2.3.9.	Electroforesis nativa: “Blue Native Gel Electrophoresis” (BN-PAGE).....	43
2.3.10.	Electroforesis nativa en geles ácidos	45
2.3.11.	Medición de actividad tiosulfato deshidrogenasa	46
2.3.12.	Electroforesis bidimensional (2D-PAGE).....	48
	2.3.12.1. 2D-PAGE sin alcanzar el equilibrio (2D-NEPHGE).....	48
	2.3.12.2. 2D-PAGE convencional utilizando el sistema Protean..... IEF cell de BIORAD.....	49
	2.3.12.3. Selección de proteínas de los geles 2D y secuenciación..... por espectrometría de masas.....	50
2.3.13.	Preparación de los extractos de proteínas totales para el análisis directo mediante espectrometría de masas.	51

2.3.14.	Preparación de las fracciones periplásmicas.....	52
2.3.15.	Digestión en gel de las proteínas presentes en la fracción periplásmica de <i>A. ferrooxidans</i> , para el..... análisis mediante espectrometría de masas.	53
2.3.16.	Análisis de proteínas totales y de la fracción periplásmica de <i>A. ferrooxidans</i> mediante espectrometría de masas.	54
2.3.17.	Generación de la base de datos de proteínas de <i>A. ferrooxidans</i>	54
2.3.18.	Análisis bioinformático de las secuencias aminoácidas de las proteínas.	55
3.	RESULTADOS.....	57
3.1	Análisis de la posible participación de la proteína P21 en un complejo multiproteico.....	57
3.1.1.	Búsqueda de un complejo multiproteico mediante un ensayo de entrecruzamiento químico.	59
3.1.2.	Análisis proteómico del posible complejo formado por la proteína P21	61
3.1.3.	Análisis del complejo mediante electroforesis nativa en geles ácidos.	62
3.2	Análisis de la actividad tiosulfato deshidrogenasa en <i>A. ferrooxidans</i>	66

3.3	La proteómica como herramienta para el estudio	
	de microorganismos utilizados en biominería.	74
3.3.1.	Estudios proteómicos en <i>A. ferrooxidans</i>	
	ATCC 23270: análisis de proteínas totales de	
	<i>A. ferrooxidans</i> crecido en diferentes fuentes de	
	energía mediante 2D-PAGE.....	75
3.3.2.	Estudios proteómicos en <i>A. ferrooxidans</i>	
	ATCC 23270 mediante proteómica a gran escala	
	(“high troughput proteomic”).....	82
3.3.2.1.	Análisis de proteínas totales de <i>A. ferrooxidans</i>	82
3.3.2.2.	Análisis de proteínas periplásmicas de.....	
	<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	89
4.	DISCUSIÓN	106
4.1	Oxidación de tiosulfato por <i>A. ferrooxidans</i>	106
4.1.1.	Análisis de la participación de la proteína P21 en.....	
	un complejo multiproteico.	106
4.1.2.	Actividad tiosulfato deshidrogenasa en <i>A. ferrooxidans</i>	111
4.2	Estudios proteómicos en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	116
4.2.1.	Análisis de los extractos proteicos totales de	
	<i>A. ferrooxidans</i>	116
4.2.2.	Análisis de extractos de proteínas periplásmicas de	
	<i>A. ferrooxidans</i>	122

4.2.2.1. <i>Proteínas relacionadas con plegamiento</i>	126
4.2.2.2. <i>Biogénesis de la envoltura celular</i>	131
4.2.2.3. <i>Proteínas de membrana externa (OMPs)</i>	134
4.2.2.4. <i>Proteínas de transporte y unión</i>	136
4.2.2.5. <i>Metabolismo energético</i>	140
5. CONCLUSIONES	146
6. REFERENCIAS	149
7. PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE ESTA TESIS	163
8. ANEXOS	164

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Función biológica del azufre y de compuestos derivados del azufre.

El azufre es uno de los elementos más abundantes sobre la corteza terrestre. Químicamente es uno de los más complejos y bioquímicamente uno de los más importantes. Biológicamente, el azufre es abundante en todos los organismos, formando parte de compuestos orgánicos que cumplen roles catalíticos, estructurales o regulatorios. El azufre se encuentra en aminoácidos (Cys y Met), oligopéptidos (como el glutatión [GSH]), vitaminas y cofactores (biotina, tiamina, coenzima A, S-adenosil metiónina) y una variedad de productos secundarios. Los grupos tioles presentes en las Cys, mantienen la estructura de las proteínas que las contienen, formando generalmente enlaces disulfuros entre dos residuos de Cys. El grupo tiol de la Cys y GSH a menudo se encuentra involucrado en ciclos de óxido-reducción, por conversión de dos grupos tioles a un disulfuro. Este intercambio es versátil para el control redox y la mitigación del estrés oxidativo (Saito, 2004). Por el contrario, la función biológica de los compuestos inorgánicos de azufre es más restringida, y en general sirven como fuentes de azufre para la asimilación e incorporación de este elemento en compuestos orgánicos, o son empleados como aceptores o dadores de electrones durante el transporte disimilatorio de electrones.

Los procesos bioquímicos de óxido-reducción de compuestos de azufre constituyen el ciclo biológico del azufre (Figura 1). Mientras la reducción asimilatoria de sulfato es muy común en procariontes, plantas y hongos, la vía disimilatoria está restringida a bacterias y arqueas. En los hábitats naturales, ambas vías se encuentran generalmente interconectadas.

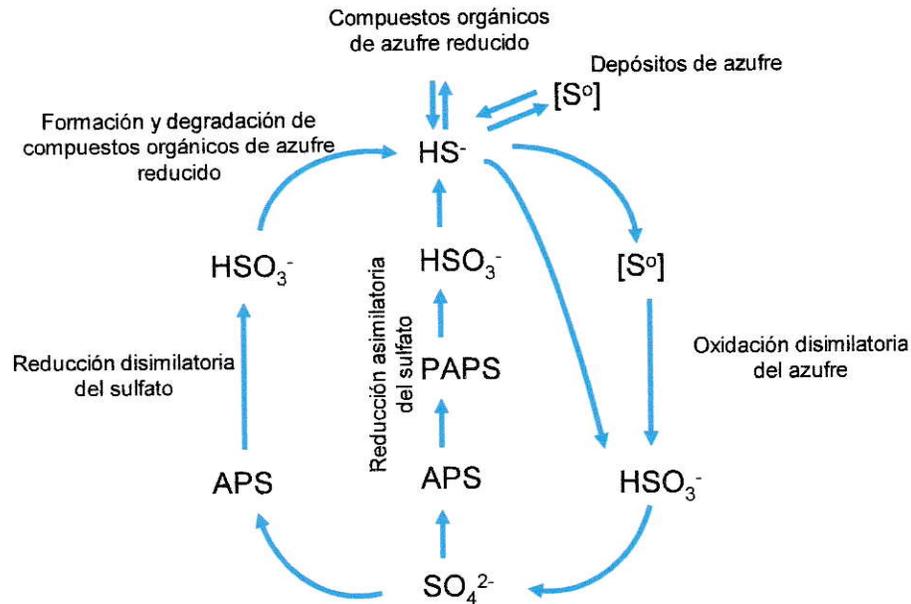


Figura 1. Ciclo biológico del azufre. $[S^0]$, compuestos en que el azufre tiene estado de oxidación cero, como azufre cíclico, politionatos, polisulfuros o polisulfanos; APS, adenosina-5'-fosfosulfato; PAPS, 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (Brüser y col., 2000).

Los sulfuros, polisulfuros, tiosulfato, politionatos, azufre elemental, bisulfito y sulfato son los principales compuestos inorgánicos de azufre que se encuentran en los ambientes naturales (Tabla 1). Ellos pueden ser usados por muchos organismos para propósitos asimilatorios y disimilatorios. Los compuestos de azufre de estados de oxidación intermedio pueden servir como dadores o aceptores de electrones en procesos de óxido-reducción. Sulfuro y sulfato son los productos finales de muchas de las reacciones, ya que corresponden a los compuestos de azufre inorgánico más reducido y oxidado, respectivamente.

Tabla 1. Compuestos inorgánicos de azufre de relevancia biológica (Brüser y col., 2000).

Compuesto	Fórmula química	Estado de oxidación del azufre
Sulfuro	HS^-	-2
Polisulfuros	$^-\text{S}(\text{Sn})\text{S}^-$	-1 (S Terminal)/ 0 (S interno)
Tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	-1 (S sulfano)/ +5 (S sulfona)
Politionatos	$^-\text{O}_3\text{S}(\text{Sn})\text{SO}_3^-$	0 (S interno)/ +5 (S sulfona)
Azufre elemental	anillos S_n	0
Bisulfito	HSO_3^-	+4
Sulfato	SO_4^{2-}	+6

En los procesos disimilatorios, el recambio de azufre es alto, y los productos finales son liberados al ambiente. Sin embargo, muchas veces el proceso no se completa, y se producen y liberan productos de estados de

oxidación intermedio. En cambio, en el proceso asimilatorio, el recambio de azufre es bajo y el azufre es incorporado principalmente a los compuestos orgánicos. Los compuestos inorgánicos de azufre no son producidos únicamente por procesos biológicos, sino también por procesos abióticos. Ambos procesos se encuentran interconectados y determinan la composición química de un ambiente natural.

1.2 Oxidación disimilatoria de compuestos de azufre reducidos por microorganismos.

La oxidación de compuestos reducidos de azufre es un proceso clave en el ciclo biogeoquímico del azufre. Muchas eubacterias y arqueas pueden llevar a cabo la oxidación disimilatoria de compuestos de azufre reducidos (sulfuros, tiosulfato, politionatos, azufre elemental y sulfito), las cuáles pueden ser filogenéticamente y metabólicamente muy diversas (Figura 2) (Lane y col., 1992; Brüser y col., 2000).

Los compuestos de azufre reducidos son empleados por algunos microorganismos quimiolitotróficos como dadores de electrones para la generación de energía en forma de ATP y producción de poder reductor como NADPH. La mayor parte de estos microorganismos crecen aeróbicamente utilizando oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Sin embargo, algunas especies (*Beggiatoa sp.*, *Thioploca sp.*, *Thiobacillus denitrificans*, *Thiomicrospira denitrificans*) oxidan H₂S anaeróbicamente acoplando la reducción de nitrato (Brock y col., 2006).

Entre los microorganismos quimiotrofos que oxidan azufre, los miembros de los géneros *Thiobacillus*, *Acidithiobacillus* y *Paracoccus* son los más estudiados, mientras que *Allochromatium vinosum* es el fotótrofo oxidador de azufre más estudiado.

La oxidación de sulfuro, azufre elemental y politionatos está ligada a la oxidación de tiosulfato y puede llevarse a cabo a través de las diferentes vías de oxidación de tiosulfato que han sido propuestas: 1) la vía del tetracionato (ej.: *Thiobacillus thioparus*, *Acidithiobacillus* spp. y *Acidiphilum* spp.), 2) la vía Sox o del complejo multienzimático (ej. *Paracoccus denitrificans*, *Starkeya novella*) y 3) la vía de la hidrólisis del tiosulfato a HS⁻ y sulfito (ej.: *Allochromatium vinosum*, *Thiobacillus denitrificans*, *Thiocapsa roseoperficina*) (Brüser y col., 2000).

En la vía del tetracionato de *Acidithiobacillus* spp. y *Acidiphilum* spp., el tiosulfato es oxidado en un solo paso a tetracionato por la enzima tiosulfato deshidrogenasa. El tetracionato generado es oxidado a sulfato y ácido sulfano-monosulfónico mediante la acción de una hidrolasa. Para la oxidación del azufre elemental y del sulfuro de hidrógeno se ha propuesto otro modelo que no incluye al tetracionato como intermediario (Rohwerder y Sand, 2003).

La vía del complejo multienzimático llamado “sistema Sox”, es común de α -proteobacterias autótrofas facultativas (Kelly y col., 1997). En estas bacterias el tiosulfato es oxidado a sulfato sin la generación de otros compuestos de azufre reducidos como intermediarios. La oxidación se lleva a

cabo en el periplasma por un complejo multiproteico. Los genes que codifican estas proteínas se conocen como genes *sox* (Friedrich y col., 2001). A la fecha se han identificado quince genes *sox*, de los cuáles siete codifican para las proteínas esenciales para la oxidación (*soxXYZABCD*). Estos genes fueron descritos por primera vez en *Paracoccus panthotropus* (Friedrich y col., 2005). Las actividades catalíticas de las proteínas Sox incluyen oxidación de sulfito, tiosulfato, azufre y sulfuro de hidrógeno acoplada a la reducción de citocromo c, sin la generación de intermediarios libres (Figura 3).

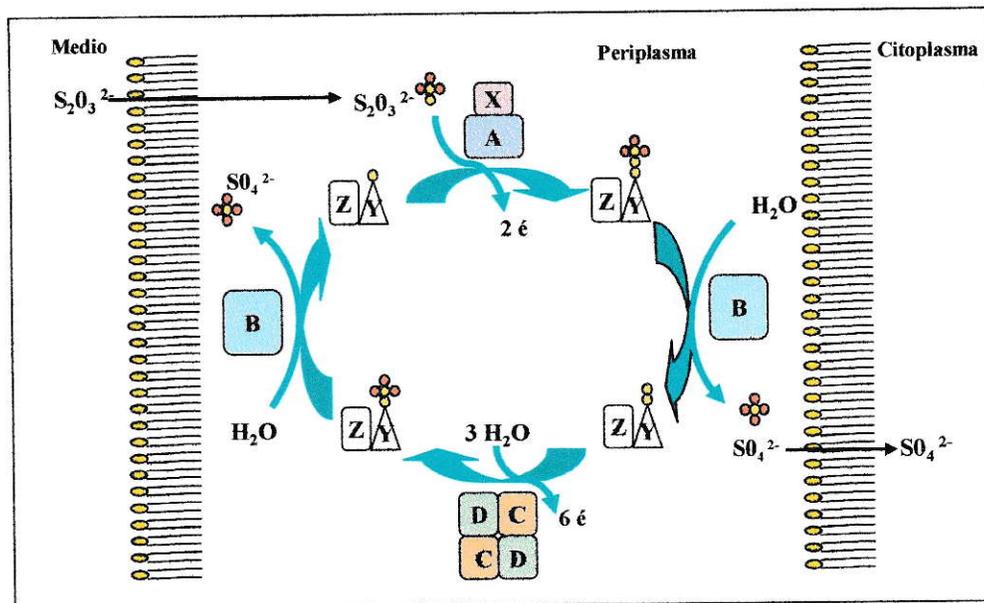


Figura 3. Modelo para la oxidación del tiosulfato en *Paracoccus panthotropus*. SoxAX cataliza la transferencia oxidativa y covalente del tiosulfato a la proteína SoxYZ. El sulfito es oxidado por la hidrolasa SoxB a sulfato y consecutivamente el azufre unido a la proteína SoxYZ es oxidado a sulfato por SoxC/D, el cual nuevamente es hidrolizado por SoxB generándose sulfato (Friedrich y col, 2001).

Las Beta y Gammaproteobacterias oxidadoras de azufre, así como *Chlorobiaceae* (ej. *Thiobacillus denitrificans*, *Allochromatium vinosum* y *Chlorobium tepidum*) poseen sólo algunos de los genes *sox* esenciales, y carecen de la azufre deshidrogenasa (Friedrich y col., 2005). Esto apunta a un mecanismo diferente de oxidación de tiosulfato (Figura 4).

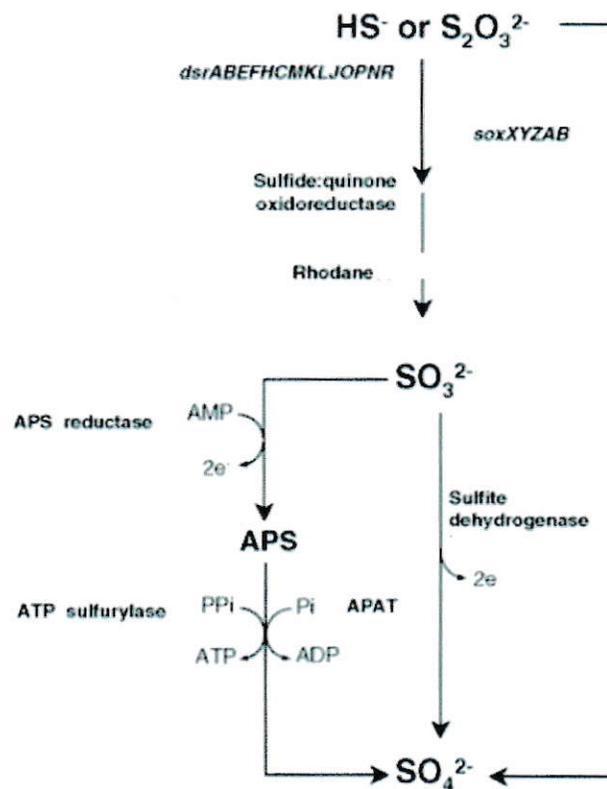


Figura 4. Esquema de los genes/enzimas putativamente asociados a la oxidación de compuestos azufrados en *Thiobacillus denitrificans*. La presencia de genes *sox* y *dsr* sugiere la participación de diferentes vías en la oxidación de tiosulfato y sulfuro a sulfato. Además, diferentes enzimas pueden estar involucradas en la oxidación de azufre en condiciones aeróbicas versus anaeróbicas (Beller y col., 2006).

En el caso de las *Gammaproteobacterias* fototrofas y en las *Betaproteobacterias* quimiotrofas estrictas, como *Allochromatium vinosum*, *Thiocapsa roseopersicina* y *Thiobacillus denitrificans*, se produce el rompimiento de la molécula de tiosulfato en el paso inicial del metabolismo oxidativo de este compuesto (Figura 5) debido a la acción de una proteína de la familia rodanasa, denominada tiosulfato azufre transferasa (Brune, 1989; Schedel y Trüper, 1980).

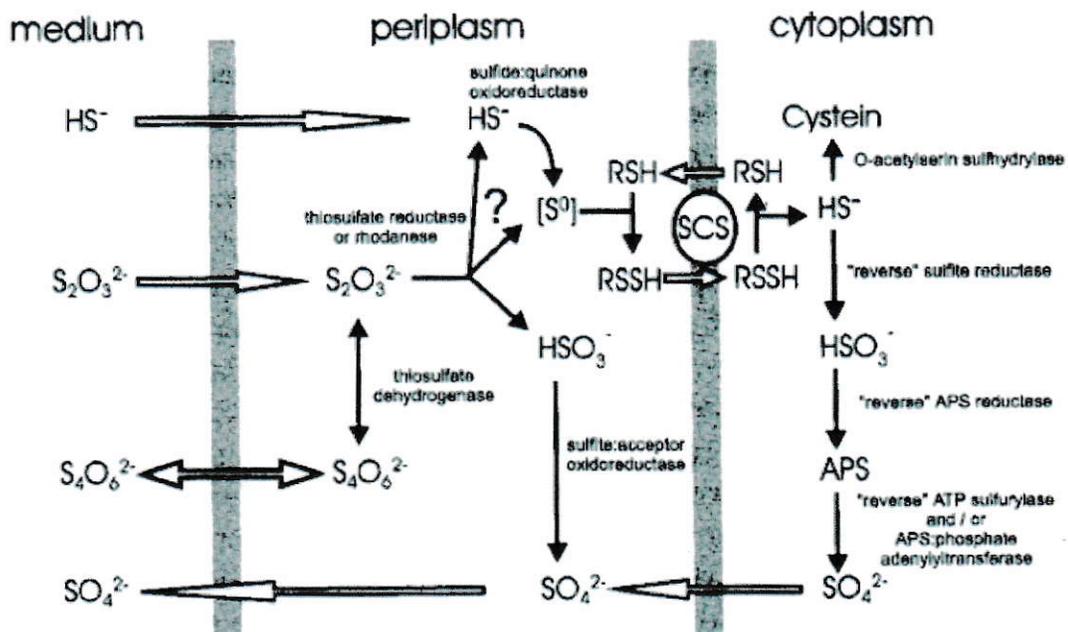


Figura 5. Modelo de oxidación del tiosulfato en *Gammaproteobacterias* fototrofas y *Betaproteobacterias* quimiotrofas estrictas. Flechas negras, indican reacciones químicas; flechas blancas, indican procesos de transporte; SCS, "sulfide carrier system" (Brüser y col., 2000).

Dahl y Trüper (1994) propusieron un esquema general para el metabolismo disimilatorio del azufre en bacterias fototrópicas el que incluye tres pasos esenciales: 1) oxidación de sulfuro o tiosulfato a azufre elemental, 2) oxidación de sulfuro o azufre elemental a sulfito y 3) formación de sulfato como producto final. Sin embargo, trabajos pioneros en *A. vinosum* identificaron una sulfito reductasa disimilatoria (DsrAB) involucrada en la oxidación anaeróbica de sulfuro y azufre (Dahl y Trüper, 1994; Pott y Dahl, 1998; Dahl y col., 2005). Esta enzima se conocía anteriormente debido a su participación en la reducción de sulfito a sulfuro en bacterias reductoras de sulfato. El operón completo que codifica para la sulfito reductasa disimilatoria contiene 15 genes, en que los genes *dsrAB* codifican para las subunidades A y B de una proteína DsrAB de estructura $\alpha_2\beta_2$ que opera en dirección inversa, catalizando la oxidación de sulfuro a sulfito.

La arquea oxidadora de azufre mejor estudiada es *Acidianus ambivalens*. Se ha demostrado que este microorganismo posee una azufre oxidoreductasa (SOR) y una tiosulfato quinona oxidoreductasa (TQO) (Sun y col., 2003; Müller y col., 2004; Urich, 2005). Esas enzimas catalizan la conversión de azufre a sulfito, tiosulfato o sulfuro de hidrógeno, y la oxidación de tiosulfato a tetrionato, respectivamente (Figura 6).

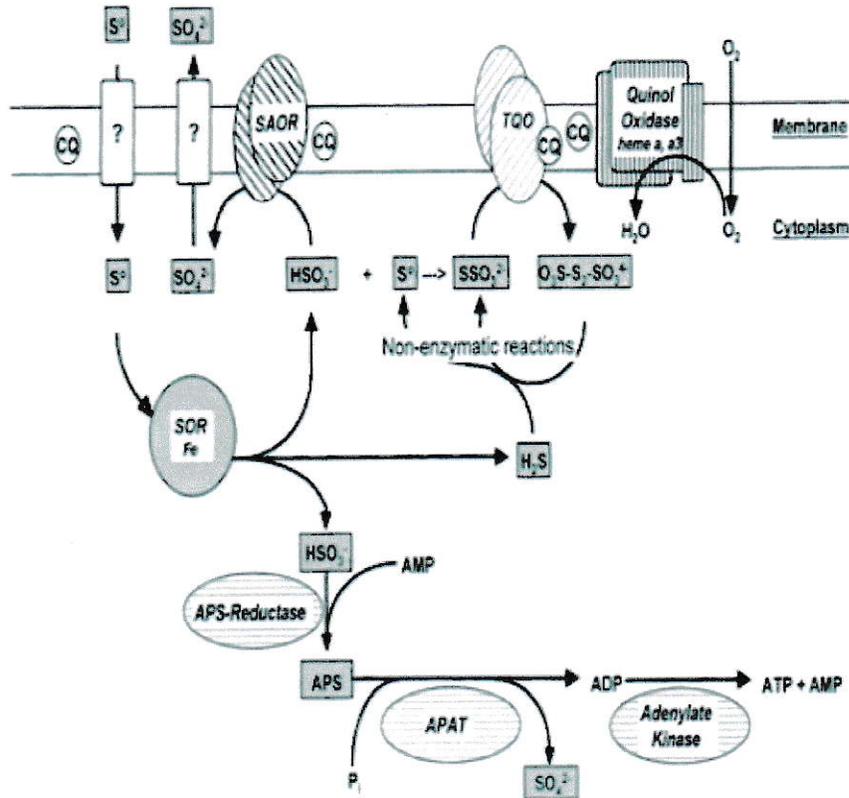


Figura 6. Modelo para la oxidación del azufre en *Acidianus ambivalens*. El azufre elemental es oxidado por una azufre oxidoreductasa (SOR) citoplásmica generándose tiosulfato, sulfito y sulfuro de hidrógeno. El tiosulfato es sustrato para la tiosulfato:quinona oxidoreductasa (TQO), y el sulfito es sustrato para una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SAOR). Las enzimas adenilsulfato (APS) reductasa y adenililsulfato: fosfato adeniltransferasa (APAT), involucradas en la generación de ATP desde sulfito mediante fosforilación a nivel de sustrato, también han sido identificadas (Kletzin y col., 2004).

1.3 Biolixiviación de minerales azufrados.

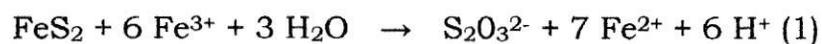
La solubilización de metales debido a la acción de microorganismos y la recuperación de los metales desde la solución se conoce como biolixiviación. En este proceso están involucrados microorganismos que oxidan azufre y/o ión ferroso, ya que ellos generan las condiciones de acidez y las especies químicas necesarias para que se lleve a cabo el proceso. Los microorganismos son utilizados con dos objetivos: 1) disolver el metal contenido en los sulfuros metálicos insolubles (u óxidos) o 2) como pretratamiento del mineral con el fin de abrir la estructura de éste y permitir la penetración de otros químicos con el fin de solubilizar el metal deseado. Un ejemplo del primer tipo de proceso es la conversión del cobre insoluble presente en los minerales tal como covelita (CuS) o calcosita (Cu_2S), a sulfato de cobre soluble. Un ejemplo del segundo, es la remoción de hierro, arsénico y azufre desde concentrados de arsenopirita que contienen oro, de tal forma que el oro que permanece en el mineral es más fácilmente extraído con el subsiguiente tratamiento con cianuro (Rawlings, 2005a).

En la actualidad, se conoce que el proceso de lixiviación es principalmente químico, en el cual los iones férrico y los protones son las especies químicas responsables de llevar a cabo este proceso. El rol de los microorganismos es generar estas especies químicas y crear el espacio en el cuál las reacciones se llevan a cabo. Los microorganismos forman un exopolímero (EPS) cuando se adhieren a la superficie de un mineral, pero no

cuando crecen como células planctónicas (Devasia y col., 1993). Es bajo estas condiciones, que las reacciones de biooxidación se llevan a cabo más rápida y eficientemente (Rohwerder y col., 2003; Sand y col., 1995).

Las reacciones involucradas en la disolución de minerales no son idénticas para todos los sulfuros metálicos, y la oxidación de ellos puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos (Schippers y Sand, 1999). Básicamente, se han propuesto dos mecanismos: 1) uno que involucra al **tiosulfato** como principal intermediario y 2) uno que involucra al **polisulfuro** como el intermediario principal. El primero se ha asociado a la oxidación de sulfuros metálicos como la pirita y molibdenita, y el segundo se ha asociado a la oxidación de otros sulfuros metálicos, tal como la escalerita, calcopirita o galena (Figura 7).

En el mecanismo del tiosulfato la solubilización se produce luego del ataque de los iones férricos al sulfuro metálico produciéndose tiosulfato como intermediario principal y sulfato como producto final de la reacción. Utilizando pirita como ejemplo, las reacciones involucradas son las siguientes:



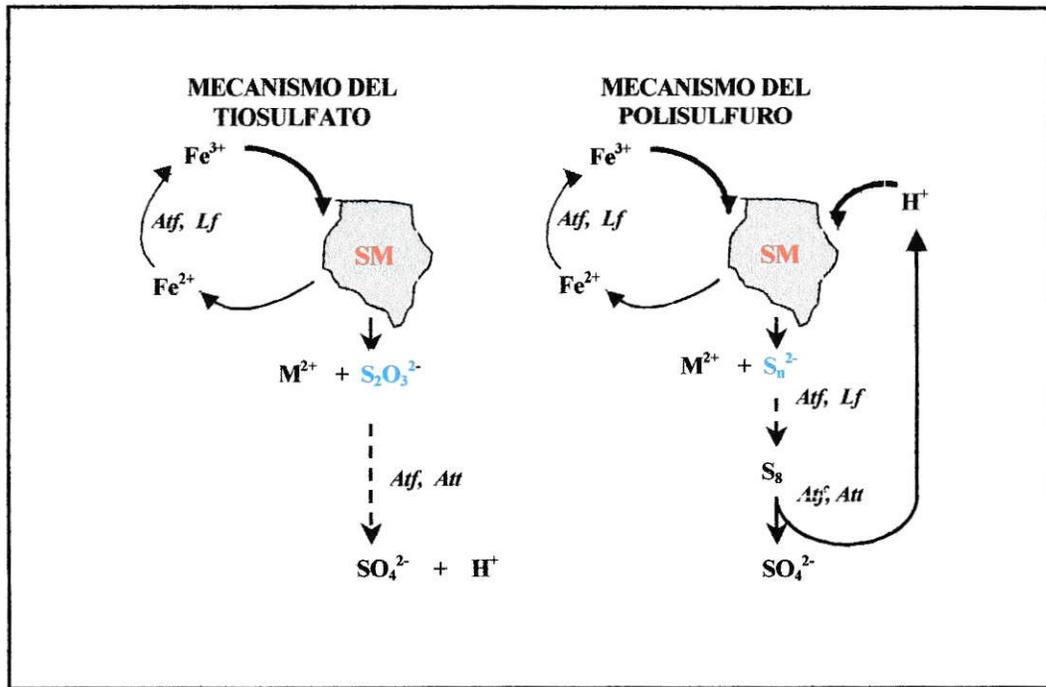
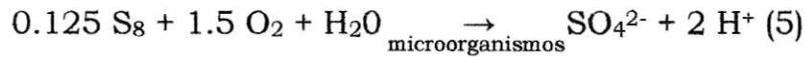
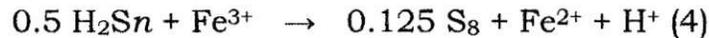
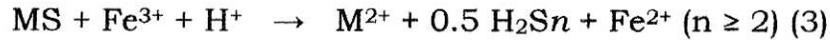


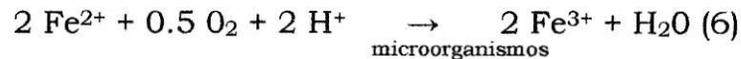
Figura 7. Mecanismos de solubilización de los sulfuros metálicos. *Atf*, *A. ferrooxidans*, *Lf*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Att*, *A. thiooxidans* (Schippers y Sand, 1999).

En el caso del mecanismo del polisulfuro la solubilización de los sulfuros metálicos se lleva a cabo por la acción combinada de iones férrico y de protones, generándose azufre elemental como intermediario principal (reacciones 3 y 4). Este azufre elemental es relativamente estable, pero puede ser oxidado a sulfato por microorganismos oxidadores de azufre como *A. thiooxidans*, *A. ferrooxidans* o *A. caldus* (reacción 5).



El ion ferroso producido en las reacciones (1) a (4) puede ser reoxidado a ion férrico por microorganismos quimiolitotróficos como *A. ferrooxidans* o bacterias del género *Leptospirillum* o *Sulfobacillus*.

Otra función de los microorganismos en la solubilización de los sulfuros metálicos es proveer de ácido sulfúrico (reacción 5) necesario para mantener el hierro en estado oxidado (reacción 6) para un ataque oxidativo sobre el mineral.



Los microorganismos acidófilos, quimiolitotróficos capaces de oxidar hierro y azufre son empleados exitosamente en procesos industriales de extracción de metales desde minerales que contienen cobre, oro y uranio (biominería). Estos microorganismos pueden ser tanto mesófilos como termófilos (Acevedo, 2000; Rawlings, 2002; Olson y col., 2003).

La biominería tiene algunas ventajas sobre los procesos tradicionales de minería. El proceso tiene un bajo costo de operación y, además, no se generan emisiones gaseosas peligrosas como el dióxido de azufre (Rawlings, 2002). Sin embargo, se generan grandes cantidades de efluentes ácidos, que

si no son apropiadamente controlados contaminan el ambiente con ácido y metales pesados (Rohwerder y col., 2003, Rawlings 2005 a,b). Existen numerosas publicaciones en las que se describen métodos de biolixiviación y su implementación en varios países (Torma, 1983; Brierley, 1982; Acevedo, 2000; Lindström y col., 1992, Rohwerder y col., 2003; Rawlings 2002, 2005 a,b; Olson y col., 2003). Este tipo de biotecnología es especialmente importante en Chile, ya que nuestro país es uno de los principales productores de cobre en el mundo, generándose alrededor de 400.000 toneladas de cobre al año mediante biominería.

Existe una gran variedad de microorganismos capaces de crecer en condiciones similares a las que se encuentran en las plantas de biolixiviación comercial (Rohwerder y col., 2003; Rawlings 2002; Olson y col., 2003; Hallberg y Johnson, 2001). Además, se han aislado varias especies diferentes de microorganismos desde los sitios de drenaje ácido de las minas (Baker y Banfield, 2003). Al respecto, las bacterias más estudiadas pertenecen al género *Acidithiobacillus* (Kelly y Wood, 2000). *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* son bacterias Gram-negativas mesófilas acidófilas y juntos al termófilo moderado *A. caldus*, pertenecen a las γ -proteobacterias (Hallberg y Johnson, 2001). También se han encontrado asociadas a las operaciones de biominería bacterias Gram-negativas del género *Leptospirillum* y algunos Gram-positivos que pertenecen a los géneros *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* y *Sulfobacillus* (Coram y Rawlings, 2002; Clark y Norris, 1996; Johnson y Roberto, 1997; Norris y col., 1996). Por otro lado, se ha descrito la presencia de arqueas

termofilicas capaces de oxidar azufre y hierro (II), las cuáles son principalmente de los géneros *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* y *Sulfirisphaera* (Fuchs y col., 1995; 1996; Kurosawa y col., 1998; Norris y col., 2000). Últimamente, se ha descrito la presencia de algunas arqueas mesofilicas capaces de oxidar hierro (II) como *Ferroplasma acidiphilium* (Golyshina y col., 2000) y *F. acidarmanus* (Edwards y col., 2000).

1.4 La especie *Acidithiobacillus ferrooxidans*

A. ferrooxidans es una bacteria Gram-negativa acidófila que participa activamente en la solubilización de cobre y de minerales que contienen oro en operaciones de biolixiviación. Es también uno de los principales microorganismos responsables de la acidificación de los efluentes en minas de cobre y carbón. Es una bacteria quimiolitotrófica que obtiene su energía oxidando hierro (II), azufre elemental o compuestos de azufre parcialmente oxidados, utilizando oxígeno molecular como aceptor final de electrones. Fija CO₂ mediante el ciclo de Calvin-Bassham-Benson y puede fijar nitrógeno en condiciones microaerofilicas. *A. ferrooxidans* también puede crecer utilizando hidrógeno molecular como fuente de energía, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En este último caso utiliza hierro (III) como aceptor final de electrones (Drobner y col., 1990; Ingledew, 1982; Ohmura y col., 1999).

A. ferrooxidans es considerado uno de los organismos modelo en los estudios metabólicos de bacterias utilizadas en biolixiviación. Fue la primera

especie aislada desde ambientes asociados a operaciones de biominería y ha sido el organismo más estudiado en comparación con otras bacterias biolixiviantes. Además, es el primer microorganismo utilizado en biolixiviación que posee su genoma completamente secuenciado.

1.4.1. Oxidación de hierro (II) por *A. ferrooxidans*.

El hierro (II) puede ser oxidado fácilmente a hierro (III) bajo ciertas condiciones y de esta manera puede servir como dador de electrones. Sin embargo, la pareja Fe^{2+}/Fe^{3+} tiene un potencial redox muy electropositivo (+770 mVolt a pH 2). Debido a esto, sólo la reducción de oxígeno molecular puede acoplarse a la oxidación de hierro (II) en presencia de protones, generándose agua (O_2/H_2O +820 mvolt a pH 7). Por lo tanto, la utilización de hierro (II) como dador de electrones puede ocurrir sólo en condiciones aeróbicas. En presencia de oxígeno el hierro (II) se oxida espontáneamente a hierro (III) a menos que el pH se mantenga muy ácido. De esta forma las bacterias acidófilas extremas como *A. ferrooxidans* pueden utilizar el hierro (II) como dador de electrones, lo cuál no es posible para las bacterias que crecen a pH neutro. Debido a que la diferencia entre los potenciales redox de ambas reacciones es muy baja y porque sólo se libera 1 mol de electrones por mol de hierro (II) oxidado, se necesitan grandes cantidades de hierro (II) para producir cantidades relativamente pequeñas de biomasa celular (Rawlings, 2005a).

Se ha propuesto que durante la oxidación de hierro (II) por *A. ferrooxidans* participa un citocromo *c* de membrana externa (Cyc2) que transfiere los electrones desde el hierro (II) a una proteína periplásmica llamada rusticianina, la cuál transfiere los electrones a un citocromo *c4* (Cyc1) y de aquí llegan finalmente a una citocromo oxidasa terminal (CoxBACD) donde el oxígeno es reducido a agua (Figura 8) (Quatrini y col., 2006). Todas estas proteínas se encuentran codificadas en el operón *rus* (Appia-Ayme y col., 1999). La detección de rusticianina ha sido ligada al crecimiento de *A. ferrooxidans* sobre hierro (II) y se ha demostrado que la expresión del operón *rus* fue 5-25 veces mayor en células crecidas en ión ferroso comparado con células crecidas en azufre (Yarzabal y col., 2004). En efecto, se ha calculado que sobre el 5 % del total de proteínas en la célula de *A. ferrooxidans* crecido en hierro (II) corresponde a Rusticianina (Cox y Boxer, 1978).

Se ha estimado que el 95 % del flujo de electrones proveniente de la oxidación del hierro (II) son utilizados para la generación de ATP. El 5 % restante se utiliza en la reducción del NADP⁺ a NADPH, el cuál es requerido para la fijación de CO₂ y para el metabolismo anabólico. Durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en hierro (II) como fuente de energía, la síntesis de NADPH se lleva a cabo mediante un transporte inverso de electrones en el cuál participa un citocromo *c4*, un complejo de citocromos *bc1* específico y una NADH-Q oxidoreductasa. Este citocromo *c4* y el

complejo de citocromos *bc1* están codificados en el operón *petI* (Elbehti y col., 2000; Levican y col., 2002)

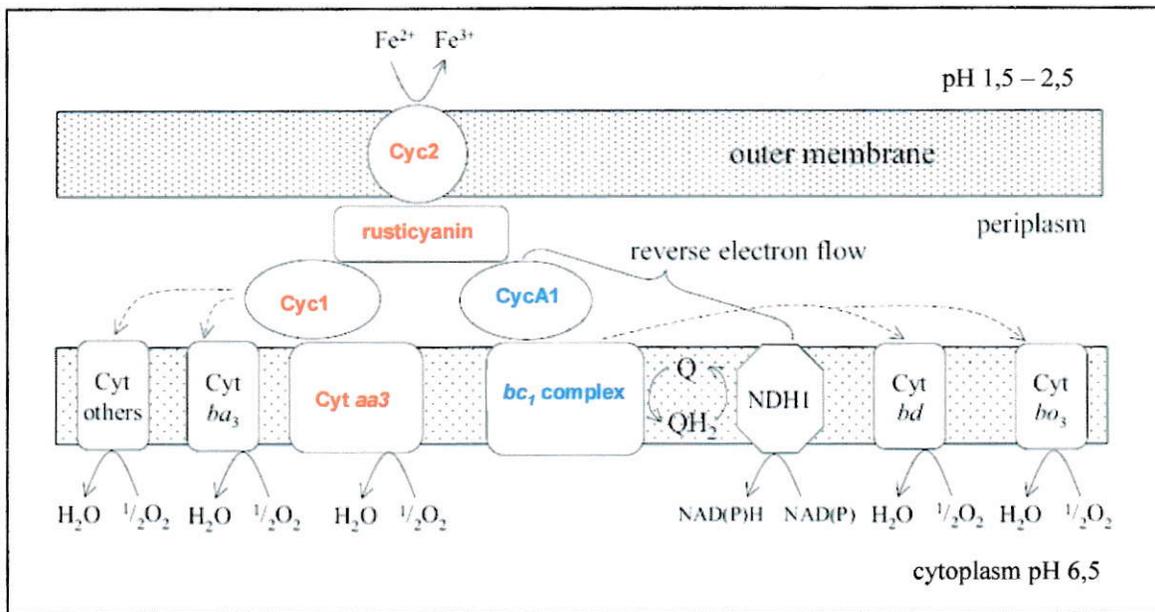


Figura 8. Modelo de oxidación del hierro (II) por *A. ferrooxidans*. Los electrones son transferidos desde un citocromo c de membrana externa (Cyc2) a la rusticyanina y conducidos por dos vías dependiendo de las necesidades de la bacteria: 1) para la generación de ATP a través de un citocromo c4 (Cyc1) y una oxidasa terminal (Cyt *aa3*, *ba3* u otra); 2) para la generación de poder reductor mediante el transporte inverso de electrones a través de un citocromo c4 (CycA2), un complejo *bc1* que opera en reversa, y una NADH-Q oxidoreductasa (NDH1). En rojo se indican las proteínas codificadas por el operón *rus* y en azul las codificadas por el operón *petI* (Rawlings, 2005a; Quatrini y col., 2006).

1.4.2. Oxidación de azufre elemental y de compuestos de azufre parcialmente oxidados por *A. ferrooxidans*.

El ácido responsable del bajo pH en el cual se encuentran los acidófilos extremos como *A. ferrooxidans*, es mayoritariamente ácido sulfúrico. Este ácido se genera producto de la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre. Durante la oxidación biológica de estos compuestos, el aceptor de electrones más favorable energéticamente es el oxígeno. La cantidad potencial de energía que está disponible cuando un átomo de azufre es oxidado a sulfato es mucho mayor que cuando se oxida ión ferroso (Pronk y col., 1990). Naturalmente los compuestos inorgánicos de azufre están disponibles sólo si los minerales azufrados se encuentran expuestos hacia la superficie. Por otro lado, una variedad de compuestos inorgánicos de azufre parcialmente oxidados son liberados como resultado de las reacciones químicas que se producen entre los minerales azufrados y el agua, el ión férrico y el oxígeno (Schippers y col., 1999).

Se han realizado muchos estudios para tratar de dilucidar el mecanismo de oxidación de compuestos inorgánicos de azufre por *A. ferrooxidans* (Wakai y col., 2004; Rohwerer y Sand, 2003; Schippers y col., 1999; Pronk y col., 1990), pero aun no se conocen todos los componentes involucrados. Rohwerder y Sand (2003) propusieron un modelo para la oxidación del azufre elemental y el sulfuro de hidrógeno. El azufre extracelular sería movilizado por los grupos tioles de una proteína de

membrana externa específica (la cual no ha sido identificada) y transportado al periplasma como un persulfuro (Figura 9). Este persulfuro podría ser oxidado a sulfito por una azufre dioxigenasa periplásmica (SDO). El sulfito puede ser oxidado a sulfato por una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SOR) y los electrones derivados de este proceso serían finalmente transferidos a una citocromo oxidasa terminal. El sulfuro libre o el sulfuro de hidrógeno son oxidados a azufre elemental en el periplasma por una sulfuro:quinona oxidoreductasa (SQR).

Durante la oxidación de azufre por *A. ferrooxidans* participa un segundo citocromo *bc1* (*bc1* [II]) que funcionaría normalmente recibiendo los electrones desde el grupo de quinonas y transfiriéndolos a un citocromo *c* asociado a membrana o una proteína hierro-azufre (HiPIP), los cuáles los transfieren a una oxidasa terminal donde tendría lugar la reducción de oxígeno (Quatrini y col., 2006). Aunque otras oxidasas pueden estar presentes se piensa que además del complejo *bc1* (II), una citocromo oxidasa *ba3* y una ubiquinol oxidasa del tipo *bd* serían los principales componentes de la cadena respiratoria involucrados en la oxidación del azufre. Existe evidencia de que las proteínas que componen el complejo *bc1* (II) y las oxidasas terminales *bd* y *ba3* se sobreexpresan cuando *A. ferrooxidans* crece en azufre como fuente de energía comparado al crecimiento en ión ferroso (Brassuer, 2004).

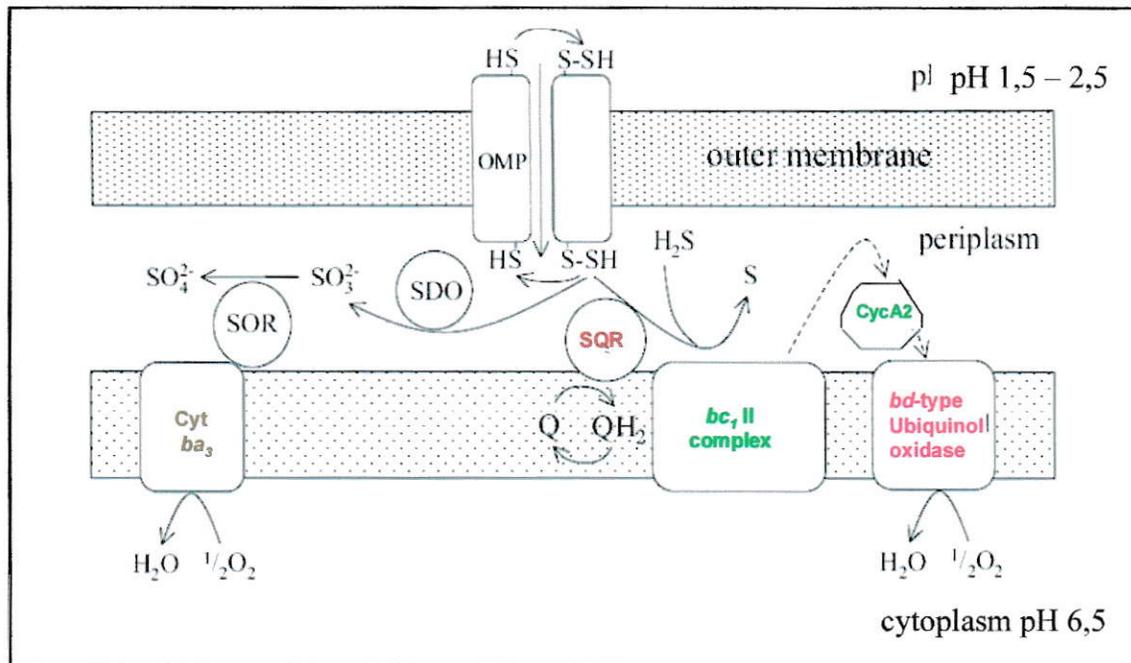


Figura 9. Modelo para la oxidación del azufre por *A. ferrooxidans*. El azufre sería transportado a través de los grupos tioles de una proteína de membrana externa hacia el periplasma y sería oxidado a sulfito por una azufre dioxigenasa (SDO). El sulfito se oxidaría luego a sulfato por la acción de una sulfito:aceptor oxidoreductasa (SOR). La enzima azufre oxidoreductasa (SQR) oxida el sulfuro utilizando las quinonas como aceptor de los electrones. Las proteínas antes mencionadas y las oxidasas terminales (*ba3* y *bd*) estarían codificadas en diferentes operones: café, proteínas codificadas en el operón *cyo*; verde, proteínas codificadas en el operón *petII* y fucsia, proteínas codificadas en el operón *cyd* (Rhowerder y Sand, 2003; Rawlings, 2005a; Quatrini y col., 2006)

Como se ha señalado anteriormente, durante la oxidación biológica de compuestos de azufre parcialmente oxidados se genera tiosulfato como principal intermediario. La oxidación de tiosulfato en *A. ferrooxidans* estaría dada principalmente por la acción de una tiosulfato deshidrogenasa (TD) que

oxida el tiosulfato a tetrionato y/o de una tiosulfato azufre transferasa (TST), que rompe el tiosulfato a HS⁻ y sulfito (Suzuki, 1999).

La enzima TD ha sido parcialmente purificada a partir de algunos microorganismos que oxidan azufre. Las TD producida por *Thiobacillus thioparus* y *A. thiooxidans* tienen una estructura monomérica (Lyric y Suzuki, 1970; Nakamura y col., 2001), en cambio la TD de *Thiobacillus* sp. W5 es un tetrámero que contiene dos subunidades (Visser y col., 1997). Los estudios de la TD de *A. thiooxidans* sugieren que la actividad TD estaría ubicada en el periplasma y que la enzima contiene un grupo HEM característico de citocromo *c*. De hecho se comunicó la existencia de citocromo *c* en una de las subunidades de la TD de *A. acidophilus* y de *Thiobacillus* sp. W5 (Meulenberg y col., 1993; Visser y col., 1997). La purificación parcial de una actividad enzimática TD en *A. ferrooxidans* reveló que la preparación contenía tres polipéptidos y que la actividad era óptima a pH 5 (Silver y Lundgren, 1968). Sin embargo, no se conoce la estructura de esta enzima, los genes que la codifican ni la relación que pudiera tener con otras proteínas involucradas en la oxidación de compuestos azufrados.

La actividad TST ha sido detectada en extractos crudos, células enteras (Gardner y Rawlings, 2000) y en una proteína parcialmente purificada a partir de *A. ferrooxidans* (Tabita y col., 1969). Esta enzima tiene ubicación citoplasmática, por lo que se piensa que no estaría involucrada en el metabolismo del tiosulfato, ya que existen varias evidencias que indican que el tiosulfato es oxidado en el periplasma. Recientemente, hemos descrito en

nuestro laboratorio una posible TST periplásmica (P21) que es inducida cuando la bacteria crece utilizando compuestos azufrados como sustrato. Sin embargo, no se encontró una actividad enzimática asociada a la proteína recombinante (Ramírez y col., 2002). Es probable que la enzima requiera algún cofactor o la interacción con otras proteínas en el periplasma para que sea activa.

La evidencia que se tiene hasta el momento apunta principalmente a que la oxidación del tiosulfato ocurre en el periplasma, que existen diferentes mecanismos de oxidación y que no todos se encuentran presentes en todas las bacterias quimiolitotróficas. Aunque el “sistema Sox” de oxidación de tiosulfato se encuentra en algunas especies de *Thiobacillus* como *T. novellus* y *T. thioparus* (Petri y col., 2001), búsquedas bioinformáticas sugieren hasta ahora que en *A. ferrooxidans* no se encuentra este sistema. Es posible que la proteína tiosulfato azufre transferasa (P21), esté desempeñando una función importante durante la oxidación de tiosulfato, pero se necesitan mayores estudios para confirmar que realmente es ésta la principal vía de oxidación de tiosulfato en *A. ferrooxidans*.

Recientemente, se describió una proteína con actividad TD en la arquea *A. ambivalens*. Esta enzima tiene la particularidad de utilizar una quinona como aceptor final de electrones en lugar de citocromo c, por lo que se le denominó tiosulfato:quinona oxidoreductasa (TQO). Ésta es la única proteína con actividad TD con secuencia conocida. *A. ferrooxidans* posee dos proteínas con similitud a TQO (Müller y col., 2004). Ambas proteínas están

codificadas por genes que se encuentran en el contexto de la proteína P21, lo que sugiere que también podrían cumplir un papel importante durante la oxidación del tiosulfato por *A. ferrooxidans*.

Por otro lado, es probable que existan otros componentes involucrados en la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre por *A. ferrooxidans* que aún no han sido identificados. Estudios previos de proteómica diferencial realizados en nuestro laboratorio, demostraron que algunas proteínas se expresaban en altos niveles cuando las células se crecían en azufre en comparación a las células crecidas en ión ferroso. De esta manera se identificó la proteína P21, mencionada anteriormente, y también una proteína con similitud a proteínas de unión de sulfato/tiosulfato/molibdato de 33 kDa (Ramírez, 2002).

Durante esta Tesis se identificaron las proteínas que podrían estar formando un complejo con la proteína P21, se estudió la actividad tiosulfato deshidrogenasa y se analizó la expresión diferencial de los genes que codifican para dos posibles TQO de *A. ferrooxidans*. Además, utilizando como herramienta la proteómica diferencial, se realizó un estudio a gran escala con el fin de identificar nuevos componentes que pudieran estar involucrados en el metabolismo disimilatorio del azufre y el tiosulfato por *A. ferrooxidans*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y condiciones de cultivo

Para todos los experimentos desarrollados en esta Tesis se utilizó la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Para el crecimiento en ión ferroso las bacterias se cultivaron a 30 °C en un medio a pH 1,5 que contenía (g/l): $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1; y $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$, 0,04 (Medio 9K) más $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 33,3; (Amaro y col., 1991). Los cultivos en azufre elemental se realizaron en medio 9 K más perlas de azufre al 5 % y pH 2,5 (Arredondo y col., 1994). Para el crecimiento en piritita, el azufre elemental del medio 9K se reemplazó por un concentrado de piritita 1 % (p/v). La piritita (67 % de pureza) fue proporcionada por el Dr. Fernando Acevedo. Los cultivos en tiosulfato se realizaron en el medio DSMZ 71 pH 4,6, con los siguientes componentes (g/l): KH_2PO_4 , 3; $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 y $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,25.

2.2 Técnicas de biología molecular

2.2.1. Extracción de DNA cromosómico.

Las células provenientes de 100 mL de cultivo crecido en tiosulfato se colectaron por centrifugación (6.000 x g durante 10 min) y se lavaron dos veces con agua ácida. Para la extracción de DNA cromosómico, se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del kit Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega). Éste se basa en un paso de lisis celular seguido de

una digestión enzimática del RNA, con posterior precipitación del DNA genómico con isopropanol y solubilización en agua.

2.2.2. Extracción del RNA total.

El RNA total de *A. ferrooxidans* se extrajo durante la fase exponencial tardía de crecimiento en azufre, tiosulfato e ión ferroso (aproximadamente 1×10^8 cel/mL para células crecidas en azufre e ión ferroso y app. 3×10^8 cel/mL para células crecidas en tiosulfato). Se modificó el protocolo de extracción con fenol caliente (Guiliani y col., 1997). Las células se colectaron por centrifugación a $6.000 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con agua ácida, pH 1,7. Para la obtención de RNA se tomaron fracciones de 10 mg (peso húmedo) de pellet de células y se resuspendieron en 300 μ L de solución de lisis (acetato de sodio 0,02 M pH 5,5; SDS, 0,5 %; EDTA, 1 mM). A cada una de las suspensiones se agregó 600 μ L de fenol saturado ácido precalentado a 65 °C y la mezcla se incubó durante 7 min a 65 °C con agitación por inversión cada 45 s. Luego de centrifugar por 4 min a $12.700 \times g$, la fase acuosa se extrajo nuevamente con el mismo volumen de fenol ácido por 7 min a 65 °C. Luego se realizó una extracción con 600 μ L de fenol ácido/cloroformo a temperatura ambiente y dos extracciones con 600 μ L de cloroformo y se centrifugó durante 4 min a $12.700 \times g$ entre cada uno de los pasos anteriormente descritos. El RNA se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 a 3 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C durante toda la noche o

alternativamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Luego de la precipitación, el RNA se recuperó por centrifugación a $12.700 \times g$ por 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavó 2 veces con etanol al 70 % y se resuspendió en $100\text{ }\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. Para eliminar los restos de DNA presentes en la preparación, el RNA se trató por 30 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 30 U de DNasa I FPLC pure (Amersham) en un volumen final de $200\text{ }\mu\text{L}$ en presencia de 6 mM MgCl_2 . La enzima se inactivó con la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM y una posterior incubación por 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego de la digestión del DNA, el RNA se extrajo una vez con $400\text{ }\mu\text{L}$ de fenol/cloroformo ácido y dos veces con $400\text{ }\mu\text{L}$ de cloroformo. Luego, se precipitó con acetato de sodio 3 M pH 5,2 de la forma anteriormente descrita. Después de dos lavados con etanol al 70 %, éste se resuspendió en $40\text{ }\mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. La integridad del RNA se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Para determinar la concentración del RNA se midió la A_{260} de una dilución 1/500 y se utilizó la relación $1\text{ OD}_{260} = 40\text{ }\mu\text{g RNA/mL}$. La pureza de éste se estimó por la razón de absorbancias a $260/280\text{ nm}$.

2.2.3. Transcripción inversa.

Para cada una de las reacciones de transcripción inversa se utilizaron 1 - $5\text{ }\mu\text{g}$ de RNA total y 400 ng del partidor reverso respectivo. En un primer paso se juntó el RNA con el partidor en un volumen final de $14\text{ }\mu\text{L}$ y esta mezcla se incubó a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, para luego poner inmediatamente en hielo e incubar durante 2 min. Este paso tiene por objetivo permitir la

desnaturación de las posibles estructuras secundarias del RNA y facilitar el acceso del partidador a su zona de hibridación. Luego, se agregó la mezcla de reacción que contuvo (concentración final): amortiguador MMLV (“Moloney Murine Leukemia Virus”) 1X, dNTPs 0,8 mM y 200 U de transcriptasa inversa (RT) MMLV (Promega). La síntesis de cDNA se realizó durante 1 h a 42 °C y al terminar la reacción la enzima se desnaturalizó por 10 min a 65 °C.

2.2.4. Partidores y reacciones de PCR.

Todos los partidores se diseñaron a partir de la secuencia disponible del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y se compraron a la empresa SIGMA-PROLIGO (www.proligo.com). En el anexo 1 se detallan todos los oligonucleótidos utilizados en esta Tesis. Se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa (Promega) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Cada reacción de PCR se montó en un volumen final de reacción de 25 µL y se utilizaron 2 ng/µL de DNA genómico, 5 ng/µL de cada partidador, 0,1 mM dNTPs, 5 % DMSO, y 0,1 U/µL de *Taq* DNA polimerasa. Para la amplificación, se utilizó el siguiente programa: 3 min a 95 °C, seguido de 25 a 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55-62 °C (de acuerdo a los partidores utilizados), 0,5- 2 min a 72 °C, para finalizar con un paso de 3 min a 72 °C.

2.2.5. Electroforesis del DNA y RNA en geles de agarosa.

Se utilizaron geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 0,5 X (20 mM Tris-acetato pH 8,0, 0,5 mM EDTA). Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6 X (0.25 % azul de bromofenol, 40 % sacarosa). La

tinción se realizó durante 10 min con una solución de bromuro de etidio de concentración 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador TAE 0,5 X. Las bandas se visualizaron con luz ultravioleta.

2.2.6. PCR en tiempo real.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el sistema Light Cycler (Roche). Todos los partidores se diseñaron con el programa “Light Cycler Probe Design 1.0” (Roche) (Anexo 1). Las reacciones de PCR se hicieron en capilares de vidrio en un volumen final de 20 μL . Se utilizó 1 μL de una dilución 1/20 del cDNA correspondiente, 0,5 μM final de cada partidador y 1 μL de “master mix” de acuerdo a las instrucciones del proveedor del “kit DNA Fast Start DNA SYBR Green I” (Roche). El partidador reverso utilizado en las amplificaciones por PCR en tiempo real fue el mismo que se utilizó para sintetizar el cDNA. Para cada pareja de partidores se optimizó la temperatura de amplificación y se obtuvo un producto amplificado único, el cual se distinguió mediante su T_m .

Para la cuantificación del cDNA se construyeron curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de DNA genómico de *A. ferrooxidans* cuyo rango fue desde 10 ng a 1 pg. Al graficar el valor de Ct, ciclo en el cual la amplificación comienza a ser exponencial, versus el logaritmo de la concentración de DNA obtenemos una recta con pendiente negativa, mediante la cual podemos calcular el número de copias del cDNA amplificado bajo estas mismas condiciones (Anexo 2). Para estos experimentos se

desarrollaron dos réplicas biológicas, con preparaciones independientes de RNA y de cDNA. El número de copias medido en cada condición fue normalizado con respecto al valor obtenido para un cDNA del gen *rrs*, que codifica para el rRNA 16S, el cuál fue preparado a partir del mismo RNA utilizado para la cuantificación de los transcritos de interés. Los valores finales calculados para la expresión de los genes en células crecidas en azufre y tiosulfato, se expresaron relativo a los valores obtenidos de la cuantificación de los respectivos cDNA en las células crecidas en ión ferroso.

2.3 Técnicas de proteómica

2.3.1. Preparación de extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans* para SDS-PAGE.

El extracto de proteínas totales se preparó a partir de células de *A. ferrooxidans* crecidas hasta fase exponencial tardía las que se lavaron, resuspendieron (a razón de 50 mg/mL) y sonicaron en amortiguador Tris-HCl 30 mM pH 7,5 más PMSF 100 µg/mL. La suspensión se centrifugó por 10 min a 10.000 x g a 4 °C y se descartó el precipitado (debris celular). La concentración de proteínas del sobrenadante fue aproximadamente 4-8 mg/mL.

2.3.2. Determinación cuantitativa de proteínas

Se realizó según el método de Bradford (1976) usando el sistema comercial Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce).

2.3.3. Electroforesis de proteínas en minigeles de poliacrilamida- SDS

Para analizar las muestras de proteínas totales en geles monodimensionales SDS-PAGE, se mezcló 2 volúmenes de la solución que contenía 5-20 μg de proteínas más un volumen de amortiguador de carga 3X (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8, SDS 6 %, glicerol 30 %, β -mercaptoetanol 15 % y azul de bromofenol 0,06 %). Las muestras se calentaron a 95 °C por 5 min, se centrifugaron brevemente y 1 a 5 μL del sobrenadante se aplicaron en los pocillos de geles de poliacrilamida al 12,5 %. La electroforesis se corrió a 200 V hasta que el colorante indicador alcanzó el borde inferior del gel. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Comassie R-250 (0,2 % de azul de Comassie en metanol 25 % y ácido acético 7,5 %) o con nitrato de plata (Laemmli, 1970; Rabilloud y col., 1988).

2.3.4. Expresión y purificación de la proteína P21 recombinante (P21r)

Para la purificación de la proteína P21r en condiciones desnaturantes se procedió de acuerdo a lo que se describe a continuación. Se creció 5 mL de cultivo de la cepa BL21 (DE3) (clon 1d 2,1) durante toda la noche. Las células se centrifugaron y resuspendieron en 1 mL de LB fresco y utilizado como inóculo para 300 mL de cultivo. El cultivo de 300 mL de la cepa BL21 (DE3) 1d 2,1, se creció hasta una $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 0,6 y se adicionó IPTG 1 mM. Luego de 3 h, las células se colectaron por centrifugación durante 20 min a

4.500 x g y el pellet se resuspendió en 30 mL de amortiguador de unión 1 X que contenía 5 mM de imidazol, 0,5 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl, pH 7,9. Las células se lisaron por sonicación (6 veces por intervalos de 30 s). Después de separar el pellet mediante centrifugación (20.000 x g por 15 min) éste se resuspendió en 5 mL de amortiguador de unión 1 X que contenía urea 6 M y se incubó por 1 h en un baño con hielo. Las muestras así obtenidas se centrifugaron (39.000 x g por 20 min) y los sobrenadantes se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,45 µm. Seguidamente se aplicaron sobre una columna que contenía 1 mL de resina his-NTA. La proteína P21r se eluyó con 10 mL de amortiguador de elución que contenía imidazol 300 mM, NaCl 0,25 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,9 y urea 6 M. Las fracciones colectadas (0,5 mL) se analizaron mediante SDS-PAGE.

2.3.5. Preparación de anticuerpos policlonales anti-P21

Para la detección de la proteína P21 fue necesario producir anticuerpos anti-P21. Estos se generaron a partir de una muestra de proteínas desde un extracto purificado de la proteína P21r mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel, el cuál se separó en un gel SDS-PAGE en gradiente de acrilamida de 7-20 %. La porción del gel en que se encontraba la proteína se cortó y envió a BiosChile para la producción de los anticuerpos en conejo (Figura 10).

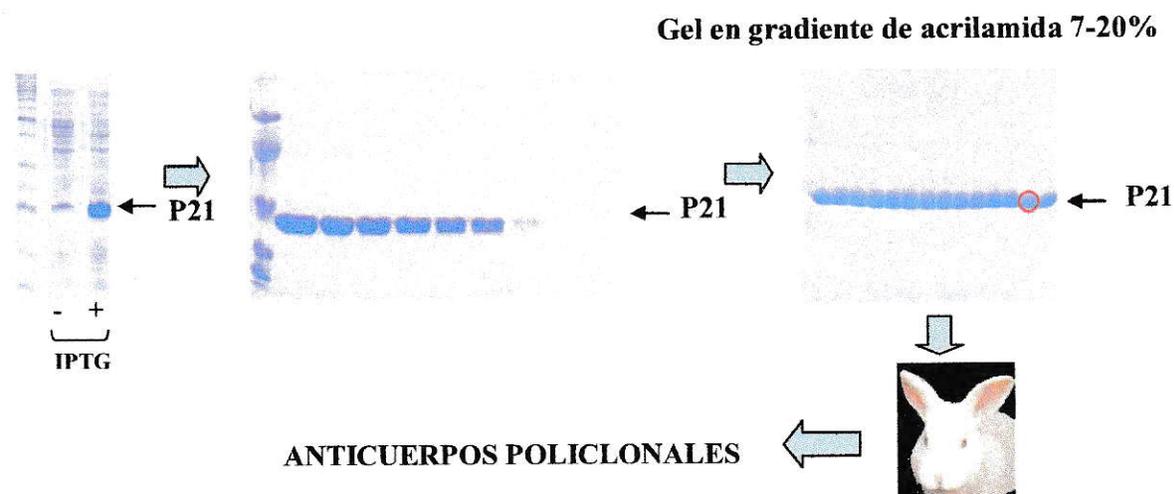


Figura 10. Estrategia empleada para la producción de anticuerpos policlonales anti-P21 de *A. ferrooxidans*.

2.3.6. Detección inmunológica de las proteínas mediante “Western- blotting”

La expresión de la proteína P21 en extractos proteicos de *A. ferrooxidans* y de la P21 recombinante en *E. coli*, se detectó mediante “Western-blotting”. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa. Se aplicó una corriente constante de 80 mA durante 60 min. La eficiencia de la electrotransferencia se confirmó mediante el uso de marcadores moleculares preteñidos (New England Biolabs) y tiñendo el gel después de la electrotransferencia con azul de Comassie R-250.

La membrana que contenía las proteínas transferidas se incubó por 2 h con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM (TBS), Tween-20 0,1 % (TBS-T) y seroalbúmina bovina (BSA) 1 % (TBS-T-BSA). Luego se lavó tres veces por 15 min cada vez con TBS-T y se incubó por toda la noche con el antisuero de conejo anti-P21 1/1.000. Seguidamente, la membrana se lavó tres veces por 20 min cada vez con TBS-T. Se incubó por 2 h con anticuerpos monoclonales anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Amersham) como anticuerpo secundario a una dilución 1/5.000. Se hicieron tres lavados de la membrana con TBS-T. La detección de la reacción antígeno-anticuerpo sobre la membrana se realizó mediante el método colorimétrico de Promega. Este consistió en incubar la membrana con amortiguador TBS que contenía metanol al 20 %, 0,5 mg/mL 4-cloro-1-naftol (Biorad), 0,15 % H₂O₂ (Merck) por 5-15 min. La reacción se realizó en la oscuridad y luego se visualizaron las bandas.

2.3.7. Entrecruzamiento químico

Células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre hasta la fase exponencial tardía se lavaron dos veces con solución salina [(NH₄)₂SO₄ 0,77 mM, MgSO₄ 1,63 mM, K₂HPO₄ 0,175 mM] y se resuspendieron en amortiguador fosfato salino (PBS) (0,1 M fosfato, 0,15 M NaCl, pH 7,2). Se agregó el agente de entrecruzamiento ditiobis(succinimidilpropionato) (DSP) (Pierce) a una concentración final de 2 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Para detener la reacción se adicionó 1 volumen de acetato de amonio

0,5 M. A 2 volúmenes de la mezcla de reacción se adicionó 1 volumen de amortiguador de carga 3 X (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8, SDS 6 %, glicerol 30 % y azul de bromofenol 0,06 %) en presencia y ausencia de DTT 50 mM. Para visualizar las proteínas se prepararon geles SDS-PAGE al 12,5%, tal como se indicó anteriormente. La posición de la proteína P21 en el gel se visualizó mediante “Western-blotting”.

2.3.8. Inmunoprecipitación

Para facilitar el aislamiento de los posibles complejos, se utilizaron partículas magnéticas de poliestireno (Dynabeads M-280 Sheep anti-Rabbit IgG, DYNAL, BIOTECH). En primer lugar, se realizó un entrecruzamiento entre el anticuerpo anti-P21 y las partículas magnéticas utilizando el agente de entrecruzamiento DMP (dihidrocloruro de dimetilpimelimidato) (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Estas nuevas partículas que contenían las partículas magnéticas de poliestireno entrecruzadas con el anticuerpo anti-P21, se utilizaron para la inmunoprecipitación de la proteína P21. Para evaluar la efectividad de las partículas preparadas se realizó la inmunoprecipitación utilizando proteína P21 pura. Se mezcló 25 µg de P21 con las partículas magnéticas (5×10^7 partículas/mL) preparadas en amortiguador Tris-HCl (20 mM Tris, 0,15 M NaCl, 4 mM CaCl_2 , 0,1 % Tritón X-100, pH 7,0) en un volumen final de 1 mL. La mezcla se incubó por 1 h, 4 h o toda la noche a 4 °C, con agitación suave. Luego las partículas se lavaron 3 veces con el mismo amortiguador y la

proteína se eluyó con 25 μ L de citrato de sodio 0,1 M pH 2,3 dos veces por 25 min con agitación. Tanto el eluido como los posteriores lavados de las partículas se analizaron en geles SDS-PAGE al 12,5%, tal como se indicó anteriormente.

Para la inmunoprecipitación desde los extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans* se utilizaron células crecidas en azufre o en ión ferroso hasta fase exponencial tardía, previamente sometidos a entrecruzamiento químico con DSP. Para la reacción de inmunoprecipitación se utilizaron 250 μ g o 750 μ g de proteína total y 5×10^7 partículas magnéticas (conteniendo el anticuerpo anti-P21)/mL. Se siguió el protocolo de inmunoprecipitación tal como se describió previamente, sólo que la mezcla de reacción se incubó durante 2 h a 4 °C. El eluido se analizó en geles SDS-PAGE al 12,5 %, preparado en presencia o ausencia de DTT.

2.3.9. Electroforesis nativa: “Blue Native Gel Electrophoresis” (BN-PAGE)

Esencialmente la técnica de BN-PAGE es un método de cambio de carga (“charge shift”), desarrollado para el aislamiento de complejos nativos de proteínas de membrana que también se ocupa para separar proteínas ácidas y básicas a un pH fijo de 7,5. En combinación con una segunda dimensión SDS-PAGE constituye un método analítico para el estudio de complejos multiproteicos (Schägger y col., 1994). Para la preparación de la muestra para BN-PAGE, en primer lugar se incluyó el ácido 6-amino-

caproico (o 6-amino-hexanoico), lo que permite que las proteínas altamente insolubles pasen a solución, sin afectar la corrida del gel por cuanto a pH 7,0 este ácido tiene carga neta igual a cero. En segundo lugar, se introduce tanto en el amortiguador ubicado en el cátodo como en la muestra, el compuesto aniónico azul de Comassie G-250 (CBB). El CBB se asocia a las proteínas de membrana y las solubiliza de tal manera que se mantienen muchas interacciones proteína-proteína. Este confiere una carga negativa a los complejos de proteína y disminuye la agregación artificial de las proteínas durante la electroforesis mediante repulsión electrostática sin la necesidad de adicionar detergentes al gel (Krause, 2006).

Con el empleo del protocolo de BN-PAGE original (Schägger y col., 1994), que incluye la utilización de CBB en la muestra, no se obtuvo un resultado resolutivo por lo que se modificó el método disminuyendo la concentración de ácido amino-caproico y eliminando el CBB en la muestra. En resumen, se prepararon extractos proteicos totales en amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 7,0 a partir de células de *A. ferrooxidans* crecido en azufre o en ión ferroso. Los extractos se incubaron en hielo durante 30 min. 30 o 200 µg del extracto de proteínas totales, se cargaron en un gel de acrilamida nativo en gradiente de 5 – 15 % (preparado en amortiguador BisTris 50 mM pH 7,0 y ácido 6-aminocaproico 100 mM). Para la corrida se utilizó un amortiguador de corrida que contenía Tricina 50 mM, BisTris 15 mM pH 7,0 y azul de Comassie G-250 0,02 %. A partir de este primer gel se cortó el carril donde se cargó la muestra y se incubó en una solución que contenía

Tris-HCl 20 mM pH 7,5, DTT 50 mM y SDS 0,4 %. Con este tratamiento se espera que las proteínas que estaban formando parte de complejos multiproteicos se disocien, luego de lo cual este carril es colocado de manera horizontal en un gel Tricina-SDS-PAGE al 10 % que se corrió en condiciones desnaturantes (Laemmli, 1970). Las proteínas se visualizaron tiñendo los geles con azul de Comassie R-250 o con nitrato de plata (Laemmli, 1970; Rabilloud y col., 1988). La ubicación de la proteína P21 fue determinada en los geles mediante "Western-blotting".

2.3.10. Electroforesis nativa en geles ácidos

La preparación de geles ácidos a pH 2,5 se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Avruch y Fairbanks (1972). Células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre o ión ferroso se lisaron en amortiguador citrato de sodio 100 mM, ácido fosfórico 12 mM (pH 2,5). El gel contenía citrato de sodio 100 mM, ácido fosfórico 12 mM, pH 2,5 y 10 % de acrilamida/bis-acrilamida. Como polimerizadores se adicionó en forma secuencial ácido ascórbico 0,21 mg/mL, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y peróxido de hidrógeno 0,01 %v/v. A 20 μg o 100 μg de proteínas totales se adicionó el amortiguador de carga (pararosaanilina y glicerol 10 %) y la muestra se cargó en el gel. La electroforesis se desarrolló utilizando el amortiguador de corrida, citrato de sodio 50 mM, ácido fosfórico 6 mM, pH 2,5 durante 2 h a 70 V. Después de la corrida, los geles se incubaron 30 min en Tris-HCl 20 mM pH 7,5, DTT 50 mM y SDS 0,4 % y posteriormente se corrió una segunda dimensión en geles

SDS-PAGE convencionales. Las proteínas se visualizaron tiñendo los geles con azul de Comassie R-250 o con nitrato de plata (Laemmli, 1970; Rabilloud y col., 1988). La ubicación de la proteína P21 fue determinada en los geles mediante “Western-blotting”.

2.3.11. Medición de actividad tiosulfato deshidrogenasa

La actividad tiosulfato deshidrogenasa se midió en extractos proteicos totales, de periplasma y de membrana de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, tiosulfato o ión ferroso, de acuerdo al procedimiento de Silver y Lundgren (1968).

El extracto de proteínas periplásmicas se preparó de acuerdo a lo descrito más adelante. El extracto de proteínas totales se preparó a partir de células de *A. ferrooxidans* crecidas hasta fase exponencial tardía que fueron lavadas, resuspendidas (a razón de 50 mg/mL) y sonicadas en amortiguador Tris-HCl 30 mM pH 7,5 más PMSF 100 µg/mL. Se agregó RNAsa a 50 µg/mL y DNasa a 50 µg/mL y se incubó en frío por 15 min. La suspensión se centrifugó por 10 min a 10.000 x g a 4 °C y se descartó el precipitado. La concentración de proteínas del sobrenadante osciló entre 5 y 9 mg/mL. Para la preparación de las membranas, la fracción soluble proveniente del tratamiento anterior, se centrifugó a 100.000 x g por 1,5 h a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de células se lavó 4 veces en amortiguador acetato de potasio 0,15 M pH 5,0. Finalmente, el pellet se

resuspendió completamente en el mismo amortiguador y esta suspensión correspondió al extracto de membrana.

La actividad tiosulfato deshidrogenasa se midió siguiendo la reducción del ferricianuro a ferrocianuro en el tiempo, mediante el registro continuo de la absorbancia a 420 nm. En la figura 11 se muestra el espectrograma correspondiente para ambos compuestos químicos.

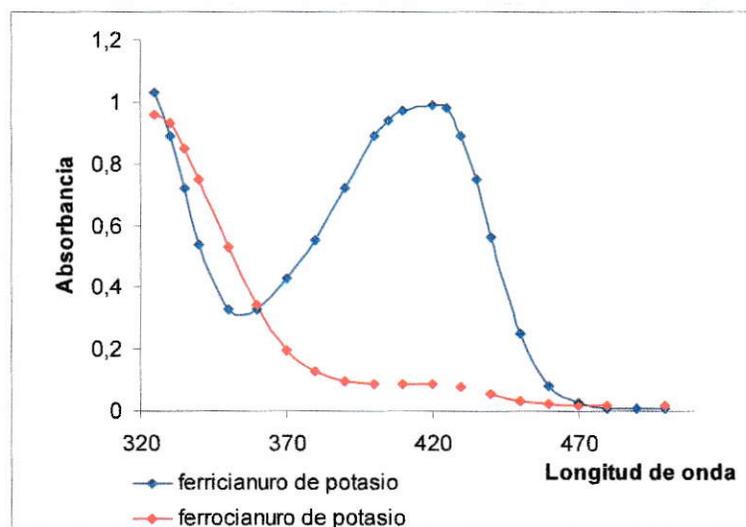


Figura 11. Espectrogramas de absorción de los compuestos ferricianuro y ferrocianuro de potasio.

La enzima oxida tiosulfato a tetracionato con la reducción concomitante de ferricianuro a ferrocianuro. El ensayo se realizó incubando el extracto celular o las fracciones de éste, en amortiguador acetato de potasio 0,15 M pH 5,0 más 200 μ L de ferricianuro de potasio 5 mM en un

volumen final de 1 mL. La reacción enzimática comenzó al agregar a la mezcla tiosulfato de sodio a una concentración final de 10 mM. El progreso de la reacción se siguió midiendo la absorbancia a 420 nm durante 15 min en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 6. La actividad específica se definió como nmoles de ferricianuro reducidos por min y por μg de proteína.

2.3.12. Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

Las células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre, tiosulfato o ión ferroso hasta la fase exponencial tardía, se lavaron y se resuspendieron (a razón de 50 mg/mL) en Tris-HCl 30 mM, pH 7,5 frío. Se agregó RNasa y DNasa a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en frío por 15 min y luego las células se sonicaron cuatro veces con intervalos de 10 min de congelación. La suspensión se centrifugó por 10 min a 10.000 x g, 4 °C y se descartó el precipitado (debris celular). La concentración de proteínas del sobrenadante osciló entre 5 y 9 mg/mL.

2.3.12.1. 2D-PAGE sin alcanzar el equilibrio (2D-NEPHGE) (O'Farrel, 1977)

El sobrenadante se diluyó en el amortiguador de rehidratación (urea 9,5 M, Nonidet P-40 2 %, anfolitos 2 % (1,6 % anfolitos pH 3-10 y 0,4 % anfolitos 5-7, Bio-Lyte) y β -mercaptoetanol 5 %. El gel para la primera dimensión contenía urea ultrapura 5,5 g, 1,33 mL acrilamida/bis-acrilamida 30 %, 2 mL Nonidet P-40 10 %, 0,5 mL anfolitos 3-10 Bio-Lyte 40 %, 20 μL de persulfato de amonio 10 % y 14 μL de TEMED, en un volumen final de 10 mL.

Las muestras se cargaron en la superficie superior del gel y se cubrieron con una solución de urea 9 M, anfolitos 1 % (0,8 % anfolitos pH 5-7 y 0,2 % anfolitos pH 3-10, Bio-Lyte). El isoelectroenfoco se desarrolló por 5 h a 400 V utilizando una solución de H_3PO_4 0,01 M en el ánodo y una solución de NaOH 0,02 M en el cátodo. Después de la corrida los geles se dializaron contra una solución de glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, SDS 2,3 %, Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM por 2 h a temperatura ambiente. Para la segunda dimensión los geles se transfirieron a un gel de SDS-PAGE (12,5 %) y se cubrió con agarosa 0,5 % en amortiguador de Laemmli luego de aplicar el patrón de peso molecular (BenchMark™ Ladder, Invitrogen). El gel se corrió toda la noche a bajo voltaje (~ 50 V). Luego de la electroforesis, el gel se removió y se tiñó con nitrato de plata de acuerdo a Rabilloud y col. (1988).

2.3.12.2. 2D-PAGE convencional utilizando el sistema Protean IEF cell de BIORAD

El sobrenadante se diluyó en el amortiguador de rehidratación (urea 8 M, CHAPS 2 %, DTT 10 mM, anfolitos Bio-Lyte 3-10 0,2 %) para obtener una concentración final de la proteína de 0,3-0,9 mg/mL. Se agregó una alícuota de 300 μ L a una tira que contiene un gel de agarosa (ReadyStrips IPG, pH 3-10, Biorad). Finalmente, se agregó aceite mineral con una pipeta sobre la tira para prevenir la deshidratación y precipitación de la urea. La secuencia de rehidratación se programó en el equipo PROTEAN IEF (Biorad). La temperatura de la plataforma de Peltier se fija a 20 °C y la tira se rehidrató

12 h bajo condiciones activas (voltaje aplicado de 50 V). El programa del equipo PROTEAN de IEF se programó para comenzar el paso de focalización automáticamente después de 12 h. La tira se enfocó para un total de 120.000 V/h utilizando el siguiente programa de corrida: 250 V por 15 min lento, 2.000 V por 2 h lento, 8.000 V por 4 h lineal, 10.000 V por 11 h lineal. Para preparar la tira de ReadyStrip IPG para la segunda dimensión, ésta se quitó de la bandeja de focalización y se equilibró durante 15 min en 5 mL del primer amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, SDS 2 %, glicerol 30 %, y DTT 1 %). Luego se pasaron las tiras a un segundo amortiguador de equilibrio con la misma composición que el paso anterior pero con yodoacetamida 1,5% en sustitución del DTT. Para la segunda dimensión (SDS-PAGE) las tiras de ReadyStrip IPG se transfirieron a geles SDS-PAGE (12,5 %) y se cubrieron con agarosa 0,5 % en amortiguador de Laemmli luego de aplicar el patrón de peso molecular (BenchMark™ Ladder, Invitrogen). Los geles se corrieron toda la noche a bajo voltaje (~ 50 V). Luego de la electroforesis, los geles se removieron y se tiñeron con nitrato de plata de acuerdo a Rabilloud y col. (1988).

2.3.12.3. Selección de proteínas de los geles 2D y secuenciación por espectrometría de masas

Las intensidades de las señales de las proteínas de interés se determinaron mediante un programa computacional de tratamiento de imágenes (Scion Image, USA o Delta 2D versión 3.3). Estas muestras se

aislaron del gel de SDS-PAGE y se enviaron para su posterior secuenciación mediante espectrometría de masas (MS) con un equipamiento de ionización por electro-spray y un analizador de tiempo de vuelo (ESI-QUAD-TOF). Las muestras se procesaron en el Centro de Proteómica de la Universidad de Cambridge (UK). Los datos de los iones MS/MS producidos con este método se utilizaron para identificar las proteínas mediante su búsqueda en las bases de datos de secuencias aminoacídicas de proteínas (Mascot, Matrix Science). Los parámetros de tolerancia del péptido (± 2 Da) y la tolerancia de MS/MS ($\pm 1,2$ Da) se limitaron y el tipo de instrumento se fijó en ESI-QUAD-TOF. Las búsquedas se realizaron contra la base de datos de proteínas de *A. ferrooxidans* generada durante esta Tesis.

2.3.13. Preparación de los extractos de proteínas totales para el análisis directo mediante espectrometría de masas.

Los extractos proteicos totales para el análisis directo mediante espectrometría de masas se prepararon a partir de 5×10^{10} células de *A. ferrooxidans* crecidas hasta la fase exponencial tardía en los tres medios de crecimiento: ión ferroso, azufre y tiosulfato. Las células se resuspendieron en amortiguador de sonicación bicarbonato de amonio 0,1 mM y PMSF 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se sonicaron en hielo (Gygi y col., 2000). Luego se congelaron a -70 °C con hielo seco y se guardaron a esa temperatura hasta su análisis.

Los extractos de proteínas totales se sometieron directamente a digestión con tripsina de acuerdo al procedimiento de Schevchenko y col. (1996) para ser analizados mediante espectrometría de masas.

2.3.14. Preparación de las fracciones periplásmicas.

Para elegir el método más apropiado y eficiente para obtener las proteínas del periplasma de *A. ferrooxidans* se evaluó el método más comúnmente utilizado en la preparación de fracciones periplásmicas en bacterias, el método del shock osmótico (Laundenbach y col., 1991) y el método de permeabilización con cloroformo (Ames y col., 1984). La posible lisis celular durante la preparación de los extractos fue controlada determinando mediante inmunodetección la presencia de una proteína citoplásmica abundante, el factor de elongación Ef-Tu.

Encontramos que el shock osmótico liberó una gran cantidad de Ef-Tu, indicando claramente un cierto grado de ruptura celular. Por otro lado, utilizando cloroformo obtuvimos fracciones periplásmicas mucho más puras y el factor de elongación Ef-Tu fue indetectable mediante la técnica inmunológica. Además, mediante este método se obtuvieron extractos periplásmicos enriquecidos en rusticianina, una proteína periplásmica bien caracterizada de *A. ferrooxidans*. En conclusión, los extractos periplásmicos se prepararon mediante el método de Ames y col. (1984), con algunas modificaciones.

Las fracciones periplásmicas se obtuvieron tratando las células completas con cloroformo a pH 2,5. Las células (200 mL a aproximadamente 1×10^8 cel/mL) se centrifugaron a $5.500 \times g$ por 15 min. Las células se lavaron dos veces con solución salina [(NH₄)₂SO₄, 0,77 mM, MgSO₄ 1,63 mM, K₂HPO₄ 0,175 mM, pH 2,5], y se resuspendieron en 200 μ L de solución salina y luego se les agregó 20 μ L de cloroformo. Después de agitar suavemente las células se mantuvieron a temperatura ambiente por 15 min. Luego se les adicionó 50 μ L de 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0. Las células se separaron por centrifugación a $6.000 \times g$ por 20 min y el sobrenadante que contenía las proteínas periplásmicas se separó y se le adicionó PMSF (100 μ g/mL). Finalmente, las proteínas se concentraron en "Speed Vac".

2.3.15. Digestión en gel de las proteínas presentes en la fracción periplásmica de *A. ferrooxidans*, para el análisis mediante espectrometría de masas.

Las proteínas obtenidas en la preparación anterior se solubilizaron directamente en amortiguador de carga para proteínas y una alícuota de cada muestra (20 μ g de proteínas por cada carril) se separó en un gel SDS-PAGE al 12,5 % de poliacrilamida. Los geles se tiñeron con azul de Comassie R-250 por aproximadamente 18 h y se destiñeron en agua. Los geles que contenían las proteínas periplásmicas se enviaron al laboratorio de espectrometría de masas de la Facultad de Química de la Universidad de Virginia. Cada porción del gel que contiene las proteínas separadas se cortó

en cinco partes desde arriba hacia abajo y se realizó la digestión con tripsina de acuerdo al procedimiento de Schevchenko y col. (1996).

2.3.16. Análisis de proteínas totales y de la fracción periplásmica de *A. ferrooxidans* mediante espectrometría de masas.

Los productos de digestión se analizaron en el laboratorio de espectrometría de masas de la Facultad de Química de la Universidad de Virginia. Para el análisis de las muestras correspondientes a los extractos proteicos totales, los péptidos se separaron en una columna de fase reversa y posteriormente se analizaron en un espectrómetro de masas ThermoElectron LCQ^{Deca}. Algunos péptidos identificados se confirmaron manualmente y se utilizaron como marcadores para el consecutivo análisis diferencial mediante FT-ICR MS (fourier transform ión cyclotron resonance mass spectrometry).

Los péptidos provenientes de la digestión de las proteínas periplásmicas se analizaron en un equipo de HPLC Agilent serie 1100 (Palo Alto, CA, USA) conectado a un espectrómetro de masas de transformada de Fourier, LTQ-FT (hybrid linear ión trap-Fourier Transform) (ThermElectron, San Jose, CA) para la separación y análisis en línea de los péptidos.

2.3.17. Generación de la base de datos de proteínas de *A. ferrooxidans*.

Al comenzar estos estudios el genoma de *A. ferrooxidans* no se encontraba anotado, por lo que tuvimos que hacer una anotación automática

utilizando la secuencia del genoma disponible en la base de datos del TIGR (<http://www.tigr.org>). Para predecir los correspondientes marcos de lectura (ORF) se utilizó el programa Glimmer (versión 2,0) (Salzberg y col., 1998). La identidad de los ORF predichos fue investigada utilizando la base de datos no redundante del NCBI (27 de Julio del 2003), y se utilizó como filtro un valor de $e=1 \times 10^{-6}$ o menor.

Los datos adquiridos desde los espectros de masas se analizaron a través de la base de datos de proteínas predichas, utilizando el programa SEQUEST (Eng y col., 1994). La secuencia de los péptidos entregada automáticamente se validó manualmente (Corbin y col., 2003).

2.3.18. Análisis bioinformático de las secuencias aminoacídicas de las proteínas.

La búsqueda de similitud y de dominios conservados para cada una de las proteínas de interés se realizó mediante el empleo del programa BlastP y la base de datos de dominios conservados del NCBI, que contiene dominios importados desde SMART, Pfam and COGs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se hicieron análisis de similitud para todos los marcos abiertos predichos por Glimmer, a los cuales se les llamó AFO (“*A. ferrooxidans* ORF”). Los pesos moleculares y los puntos isoeléctricos de las proteínas predichas a partir de nuestra base de datos se obtuvieron utilizando el servidor http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html. La presencia de señales de exportación para cada una de las proteínas encontradas en el periplasma se

realizó usando SignalP 3,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), TatP 1,0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP-1.0>), SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>). La predicción de lipoproteínas se realizó utilizando el programa LipoP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/LipoP>). La predicción de localización subcelular se obtuvo utilizando las herramientas bioinformáticas, PENCE (<http://www.cs.ualberta.ca/%7Ebioinfo/PA/Sub/index.html>) y CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw>).

La clasificación de las proteínas de la fracción periplásmica en las diferentes categorías funcionales se realizó de acuerdo a la clasificación funcional entregada por el TIGR para la secuencia recientemente anotada del genoma de *A. ferrooxidans*. Para una mejor comprensión, los nombres de las proteínas y de las categorías funcionales se mantuvieron en inglés.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis de la posible participación de la proteína P21 en un complejo multiproteico.

La proteína P21 tiene similitud con una tiosulfato azufre transferasa (TST), que se ha postulado se encuentra ubicada en el periplasma de *A. ferrooxidans* (Ramirez y col., 2002). A diferencia de otras TST descritas, P21 posee dos cisteínas en su extremo carboxilo terminal que podrían participar en la unión de un centro hierro-azufre presente en proteínas involucradas en el transporte de electrones (Berks y col., 1995), sugiriendo la participación de esta proteína en reacciones de oxido-reducción. Además, se encontró que los niveles de P21 son más elevados en células crecidas en azufre, tiosulfato y otros sulfuros metálicos, que en células crecidas en ión ferroso, sugiriendo un papel importante durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en compuestos reducidos de azufre. La medición de la actividad TST de la proteína P21 recombinante pura fue infructuosa. La incapacidad de obtener una proteína pura activa hace suponer la necesidad de otros componentes ubicados en el periplasma de *A. ferrooxidans* para que se lleve a cabo la reacción enzimática. Probablemente, en forma similar a lo que sucede en otros sistemas de oxidación de tiosulfato en el periplasma (Bamford y col., 2002), la proteína P21 se encuentre asociada a otras proteínas formando un complejo.

Para comprobar esta hipótesis se utilizaron herramientas de inmunoprecipitación y de entrecruzamiento químico. Para ello, se prepararon anticuerpos policlonales anti-P21. El anticuerpo policlonal generado detectó eficientemente la proteína P21 en los extractos proteicos totales de células crecidas en azufre y tiosulfato. Sin embargo, la expresión de la proteína fue siempre mayor en azufre que en tiosulfato, tal cual se había comunicado previamente (Ramírez y col., 2002) por lo que se decidió utilizar extractos provenientes desde las células crecidas en azufre para los experimentos.

Para comenzar los estudios se decidió averiguar la progresión de la expresión de la proteína P21 durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en azufre, de tal manera de trabajar en un punto de la curva en la cual se tuviera suficiente biomasa, pero a la vez la expresión fuese óptima. Al respecto encontramos que no existían diferencias drásticas en la expresión de la proteína durante el crecimiento de la bacteria (Figura 12), por lo que se trabajó con células cosechadas en fase exponencial tardía.

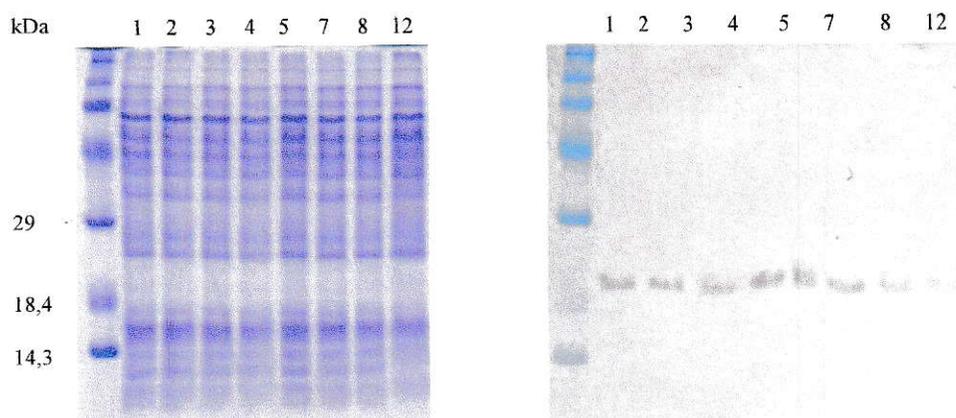


Figura 12. Análisis de la expresión de la proteína P21 durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en azufre. Las proteínas totales se separaron en un gel SDS-PAGE. Éstas se tiñeron con azul de Coomassie o se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa donde se enfrentaron con el anticuerpo anti-P21. Los números en forma creciente indican los tiempos (h) en los que se tomó cada muestra después de 72 h de inoculación: (1) 0, (2) 24, (3) 39, (4) 65, (5) 91, (6) 108, (7) 140, (8) 158 y (9) 172.

3.1.1. Búsqueda de un complejo multiproteico mediante un ensayo de entrecruzamiento químico.

Para detectar la presencia de un complejo multiproteico se utilizó un agente de entrecruzamiento químico homobifuncional, denominado DSP (éster de N-hidroxisuccimida). Durante el entrecruzamiento el grupo NHS-éster reacciona con las aminas primarias de las proteínas formando enlaces amida covalentes y liberando N-hidroxisuccinimida. Este agente de entrecruzamiento tiene la particularidad de ser hidrofóbico y por lo tanto el entrecruzamiento puede ser desarrollado con las células enteras en vivo. El entrecruzamiento puede ser revertido fácilmente utilizando un agente

reductor tal como ditioneitol (DTT) o β -mercaptoetanol. Aplicando esta técnica a células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre se detectó un posible complejo multiproteico de alto peso molecular (Figura 13). Este resultado constituye el primer indicio de que P21 efectivamente se encuentra asociada a otras proteínas. Sin embargo, a través de esta técnica es imposible identificar las proteínas asociadas.

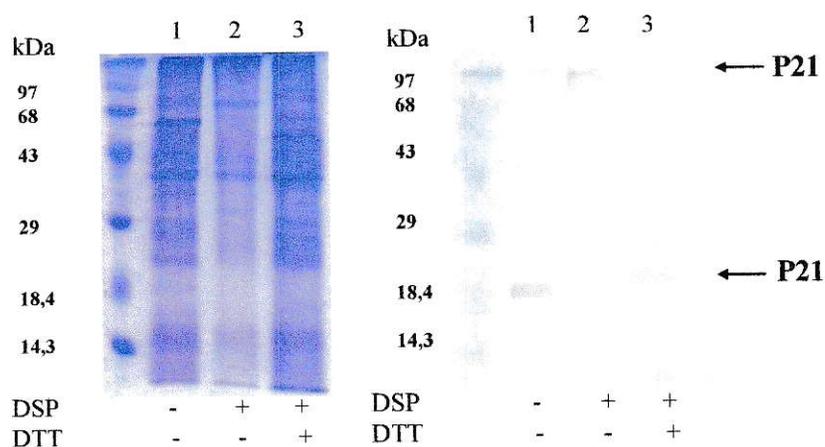


Figura 13. Entrecruzamiento de la proteína P21 en extractos de proteínas totales de *A. ferrooxidans* crecido en azufre. Las células enteras se resuspendieron en PBS pH 7,2 y se incubaron con DSP 2 mM por 30 min. Luego las células se lavaron, sonicaron y las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE para su visualización con azul de Comassie o para su transferencia a una membrana de nitrocelulosa. La proteína P21 se detectó en la membrana utilizando el anticuerpo anti-P21. El carril 1 muestra el extracto total proveniente de células no incubadas con DSP, el carril 2 muestra el extracto total proveniente de células incubadas con DSP y el carril 3 muestra el extracto total proveniente de células incubadas con DSP y posteriormente tratadas con ditioneitol (DTT).

3.1.2. Análisis proteómico del posible complejo formado por la proteína P21

Para identificar las proteínas presentes en un complejo usualmente se utiliza inmunoprecipitación y detección de las proteínas en geles SDS-PAGE y “Western-blotting”. Se aplicó esta técnica utilizando anticuerpos anti-P21 adheridos a partículas biomagnéticas (Dinabeads) las cuáles se enfrentaron tanto a la proteína pura, como a extractos concentrados de células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre. Esta técnica permitió inmunoprecipitar eficientemente a la proteína pura, pero la baja concentración de P21 en los extractos totales impidió que fuera inmunoprecipitada a niveles que permitieran la detección de las proteínas asociadas, aún utilizando una tinción de proteínas altamente sensible como lo es la tinción con nitrato de plata.

Otra estrategia utilizada fue la técnica llamada en inglés “Blue Native Gel Electrophoresis” (BN-PAGE), que ha sido aplicada eficientemente para la detección de complejos mitocondriales (Schägger y col., 1994). Sin embargo, tanto en las condiciones estándar ensayadas como utilizando un BN-PAGE modificado, el putativo complejo de la P21 no fue detectado. Uno de los factores limitantes para el caso de *A. ferrooxidans* podría ser el pH, debido a que todos estos experimentos se desarrollan a pHs cercanos a la neutralidad, y *A. ferrooxidans* es un acidófilo que tiene un periplasma con un valor de pH

cercano a 3. De esta manera, buscamos una técnica que permitiera identificar complejos multiproteicos a pH ácido.

3.1.3. Análisis del complejo mediante electroforesis nativa en geles ácidos.

Para analizar el putativo complejo se efectuó electroforesis nativa a partir de extractos proteicos totales de células de *A. ferrooxidans* crecido en azufre o en ión ferroso y resuspendidas y sonicadas en tampón citrato pH 2,5. En la Figura 14A se muestra un gel nativo de los correspondientes extractos. Se aprecia claramente una banda muy intensa en las células crecidas en azufre (destacada con una flecha) comparada con la banda presente en la muestra de células crecidas en ión ferroso.

En la figura 14B se muestra la segunda dimensión SDS-PAGE corrida a partir de los geles nativos mostrados en 14A. Mediante "Western-blotting" se detectó claramente la presencia de la proteína P21 en las muestras provenientes de células crecidas en azufre mientras que fue imperceptible en las muestras provenientes de células crecidas en ión ferroso. Las proteínas ubicadas en la vertical de la proteína P21 corresponderían a las proteínas asociadas a ella en forma nativa. Para observar mejor estas proteínas, se repitió el gel utilizando mayor cantidad de proteína total. Se encontró que la proteína P21 podría estar asociada al menos a otras cuatro proteínas (Figura 15). Las proteínas correspondientes a las manchas detectadas en los geles fueron identificadas mediante espectrometría de masas (Tabla 2).

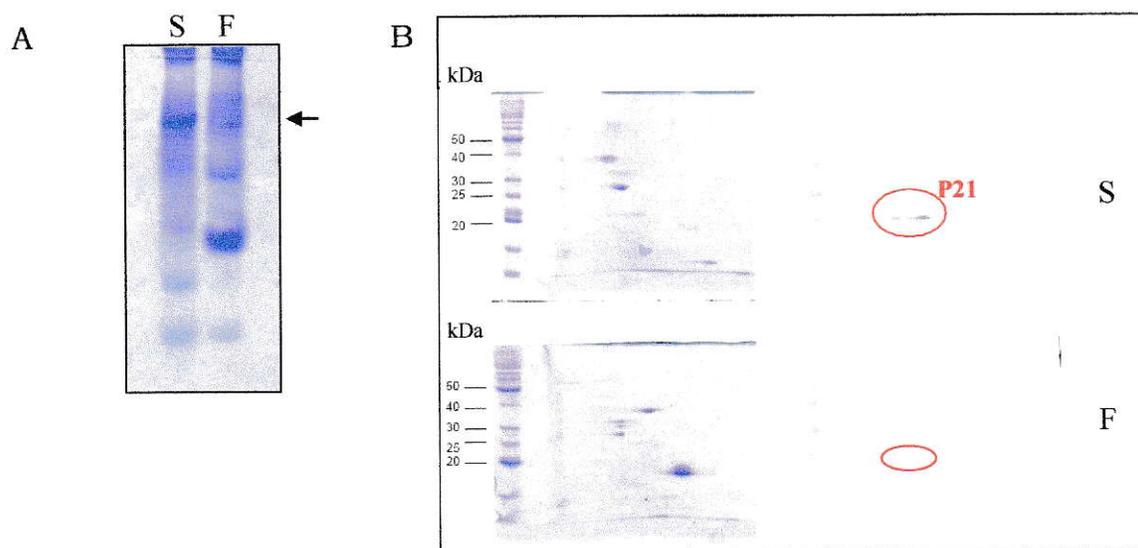


Figura 14. Electroforesis en geles ácidos de extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. **A.** 20 μ g de proteínas totales extraídas de células crecidas en azufre (S) o en ión ferroso (F) y preparados a pH 2,5, se aplicaron en un gel de poliacrilamida pH 2,5 el cuál se sometió a electroforesis en condiciones nativas. **B.** El carril del gel nativo que contiene la muestra de azufre o de ión ferroso se cortó y las proteínas presentes se separaron en una segunda dimensión SDS-PAGE convencional. A la izquierda se muestra el gel teñido con azul de Coomassie y a la derecha se muestran las membranas de nitrocelulosa en la cuales se analizó la presencia de la proteína P21 utilizando un anticuerpo anti-P21.

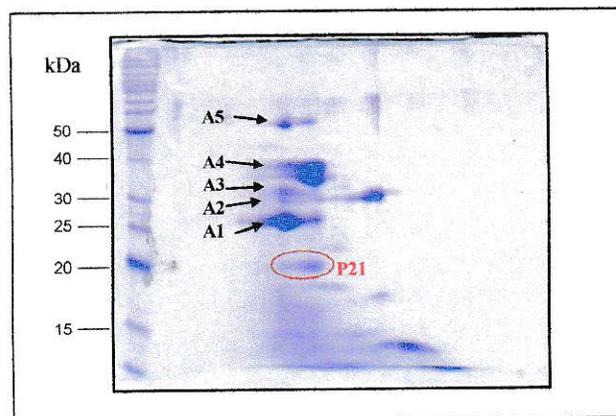


Figura 15. SDS-PAGE proveniente de una electroforesis nativa en geles ácidos de extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. 100 μ g de proteína total extraída a pH 2,5 de células crecidas en azufre, se aplicaron en un gel de poliacrilamida pH 2,5 y el carril del gel nativo que contenía la muestra se cortó y las proteínas presentes se separaron en una segunda dimensión SDS-PAGE convencional. Las proteínas presentes en el gel se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie.

Tabla 2. Proteínas asociadas a la proteína P21 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Mancha	AFO	Proteína	Puntaje
A1	4314	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	224
A2	3617	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type	345
A3	3617	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type	266
A4	4312	periplasmic solute-binding protein, putative	341
A5	4336	outer membrane protein	319

Las proteínas se identificaron por espectrometría de masas. AFO: marco de lectura abierto obtenido a partir del análisis de la secuencia completa del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Interesantemente, dos de las proteínas detectadas (AFO 4312 y 4314) se encuentran en el contexto genómico de la proteína P21 (Figura 16A). Además demostramos que la proteína P21 y la proteína AFO 4312 (denominada ModA1) forman parte de una misma unidad transcripcional (Figura 16B).

Este posible operón codificaría también para una proteína con homología a una tiosulfato quinona oxido reductasa (DoxDA1). Esta proteína podría tener un papel importante en la oxidación del azufre y tiosulfato, ya que correspondería a una tiosulfato deshidrogenasa encargada de oxidar el tiosulfato a tetracionato.

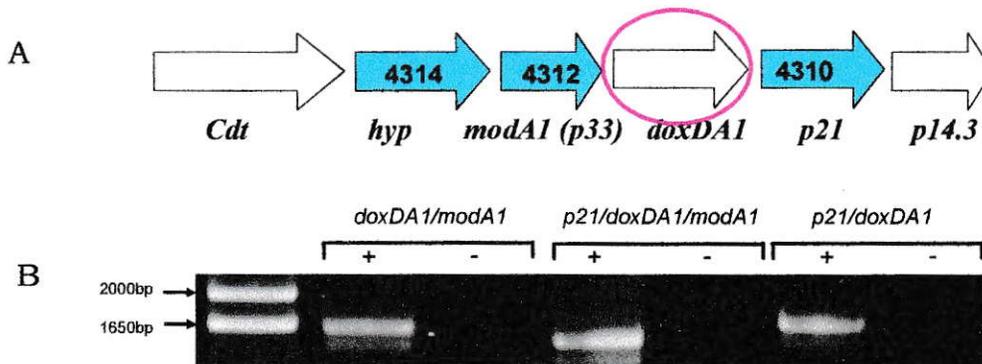


Figura 16. Análisis genómico del gen *p21*. **A.** Representación de la organización física de los genes ubicados alrededor del gen *p21*; *hyp*, proteína hipotética con señal de exportación Tat; *modA1*, posible proteína de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato; *doxDA1*, posible tiosulfato quinona oxidoreductasa; *p21* y *p14.3*, posibles tiosulfato azufre transferasas. Los números dentro de las flechas indican el correspondiente AFO descrito en la Tabla 1. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR utilizando partidores específicos para cada gen. La reacción de RT se realizó utilizando 3 μ g de RNA total obtenido de células crecidas en azufre elemental. Se incluyeron reacciones de RT con (+) y sin (-) transcriptasa reversa, con el fin de descartar falsos positivos debido a contaminación de los cDNA con DNA genómico.

3.2 Análisis de la actividad tiosulfato deshidrogenasa en *A. ferrooxidans*.

La actividad tiosulfato deshidrogenasa (TD) ha sido descrita como la principal actividad enzimática encargada de la oxidación del tiosulfato por *A. ferrooxidans*. Esta enzima oxida el tiosulfato a tetrionato (Silver y Lundgren, 1968). Se ha demostrado que el tetrionato es uno de los principales productos durante la oxidación del tiosulfato por *A. ferrooxidans* (Pronk y col., 1990), por lo que esta enzima tendría un papel clave en la oxidación del tiosulfato por esta bacteria.

Previo al desarrollo de esta Tesis, la actividad TD de *A. ferrooxidans* sólo había sido medida en extractos totales de células crecidas en azufre (Silver y Lundgren, 1968). Por lo tanto se procedió a medir dicha actividad tanto en extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, tiosulfato como en ión ferroso. Además, debido a que en otras bacterias la actividad ha sido asociada a la fracción periplásmica, se procedió a medir la actividad en esta fracción celular tanto en células crecidas en azufre, en tiosulfato como en ión ferroso. Tanto en los extractos proteicos totales como en los extractos periplásmicos, se encontró actividad en las tres condiciones de crecimiento aunque fue levemente mayor en los extractos proteicos provenientes de cultivos en azufre y casi cinco veces mayor en los extractos proteicos provenientes de cultivos en tiosulfato, en comparación con lo

detectado en extractos provenientes de cultivos crecidos en ión ferroso (Tabla 3).

Tabla 3. Actividad tiosulfato deshidrogenasa en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

	Actividad específica (nmol/min/ μ g proteína)	
	Extracto total	Extracto periplásmico
Tiosulfato	78 \pm 8,4	540 \pm 30
Azufre	17,5 \pm 2,1	400 \pm 42
Hierro II	15,5 \pm 2,1	343 \pm 90

Células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato, azufre o ión ferroso se cosecharon en la fase exponencial tardía para la preparación de los extractos proteicos. Los valores indican la actividad específica expresada como los nanomoles de ferricianuro reducidos por min y por μ g de proteína.

A la fecha, esta actividad se ha detectado también en algunas otras bacterias quimiolitotróficas como *A. thiooxidans* (Nakamura y col., 2001; Meulenberg y col., 1993), pero la secuencia aminoacídica de estas proteínas no se ha determinado ni tampoco se han identificado los genes que las codifican.

Recientemente, Müller y col. (2004) describieron una proteína con actividad tiosulfato deshidrogenasa en la arquea termoacidófila *A. ambivalens*. Esta proteína es capaz de transferir los electrones provenientes de la oxidación del tiosulfato directamente al reservorio de quinonas y la

llamaron tiosulfato quinona oxidoreductasa. La enzima está formada por dos subunidades, DoxD y DoxA (Figura 17).

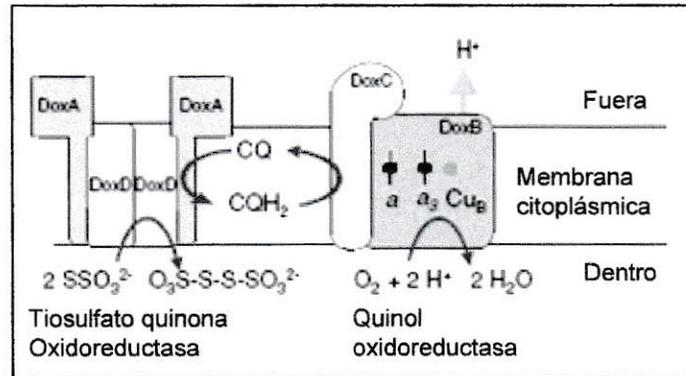


Figura 17. Representación esquemática de la tiosulfato quinona oxidoreductasa (TQO) de *Acidianus ambivalens*. La enzima está compuesta de dos subunidades (DoxD y DoxA) que en conjunto catalizan la oxidación del tiosulfato a tetracionato. Los electrones generados durante este proceso son captados por el reservorio de quinonas y transferidos a la oxidasa terminal DoxCB (Müller y col., 2004).

DoxD es una proteína de membrana de 16 kDa y DoxA es una proteína soluble de 28 kDa. Los autores secuenciaron estas proteínas y buscaron homólogos en los genomas secuenciados de otros microorganismos. En el caso de *A. ferrooxidans* encontraron dos posibles proteínas Dox. Cada una de las proteínas de *A. ferrooxidans* era codificada por un solo gen que incluía la secuencia de ambos polipéptidos, por lo que se les llamó DoxDA (DoxDA1 y DoxDA2). Estas proteínas corresponderían a proteínas de membrana que tendrían su sitio activo expuesto al periplasma. Sin embargo, hasta ahora la

actividad TD nunca se había medido en fracciones de membrana de *A. ferrooxidans*.

Se preparó un extracto de proteínas totales de células crecidas en tiosulfato y se midió la actividad TD en el extracto total, la fracción soluble y la fracción de membrana. Interesantemente, encontramos un nivel de actividad similar en la membrana y en la fracción soluble, siendo levemente mayor en la fracción de membrana (Tabla 4). La actividad asociada a las membranas podría deberse a la expresión de una o las dos proteínas DoxDA.

Tabla 4. Actividad tiosulfato deshidrogenasa en extractos proteicos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Extracto	Actividad total (nmol/min) x 10 ³	Actividad específica (nmol/min/μg proteína)
Total	351,1	84
Soluble	131,1	74
Membrana	40,3	101

Células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato se cosecharon en la fase exponencial tardía para la preparación de los extractos proteicos. La actividad específica se expresó como nanomoles de ferricianuro reducidos por min y por μg de proteína.

Con el fin de determinar si ambos genes *doxDA* se expresaban en *A. ferrooxidans*, se procedió a realizar un ensayo de RT-PCR utilizando partidores específicos para ambos genes y el RNA extraído en la fase exponencial tardía desde células crecidas en ión ferroso, azufre y tiosulfato. Se encontró que ambos genes se expresaban en todas las condiciones de crecimiento (Figura 18).

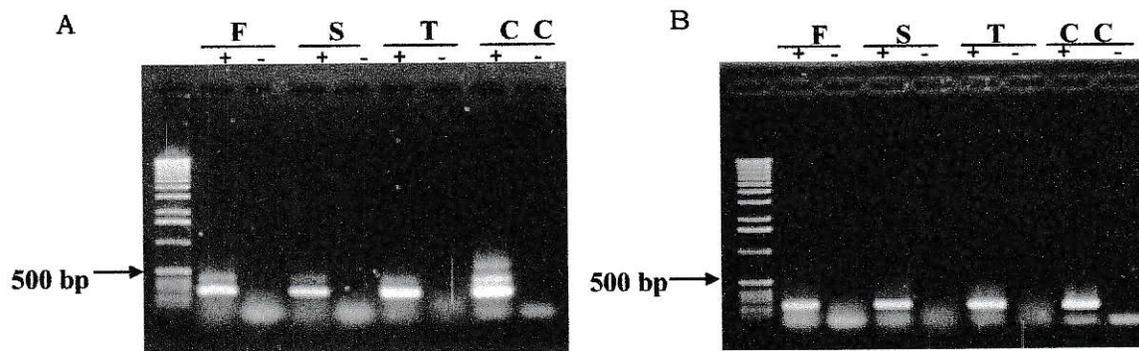


Figura 18. Expresión de los genes *doxDA* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mediante RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR utilizando partidores específicos para el gen *doxDA1* (A) o *doxDA2* (B). La reacción de RT se realizó utilizando 3 μ g de RNA total obtenido de células crecidas en ión ferroso (F), azufre (S) o tiosulfato (T). Se incluyeron reacciones de RT con (+) y sin (-) transcriptasa reversa, con el fin de descartar falsos positivos debido a contaminación de los cDNA con DNA genómico. C, control con DNA genómico.

Para determinar si existía diferencia en la expresión de los genes de acuerdo a la naturaleza del sustrato oxidable, se realizó PCR en tiempo real utilizando el RNA extraído en las mismas condiciones descritas para los experimentos de RT-PCR, y además RNA extraído de células de *A. ferrooxidans* crecido en pirita. Se encontró que tanto los genes *doxDA1* como *doxDA2* se expresaban en las células crecidas en pirita, tal como demostramos para las otras condiciones de crecimiento. Los niveles de ambos transcritos siempre fueron mayores en las células crecidas en compuestos de azufre reducido en comparación con las células crecidas en ión ferroso. Sin embargo, se observó que los niveles del transcrito *doxDA1* son mayores en tiosulfato que en azufre, y que los niveles del transcrito *doxDA2* son muy similares para ambas condiciones de crecimiento (Tabla 5). Interesantemente, cuando se analizaron los niveles de ambos transcritos en células crecidas en pirita encontramos que ambos genes son expresados más de seis veces en este sustrato en comparación con los niveles encontrados en células crecidas en ión ferroso (Tabla 5). Esto hace suponer que efectivamente ambas proteínas DoxDA tienen un papel importante durante el proceso de biolixiviación de la pirita.

Tabla 5. Comparación de los niveles de expresión de los transcritos *doxDA1* y *doxDA2* cuantificados mediante PCR en tiempo real.

Razón	<i>doxDA1</i>	<i>doxDA2</i>
Azufre/Fe (II)	2,5	3,8
Tiosulfato/Fe (II)	6,7	3,3
Pirita/Fe (II)	10,8	6,7

El número de copias de los transcritos en cada condición se calculó relativo al número de copias del transcrito del gen ribosomal 16S de *A. ferrooxidans*. Los resultados se expresaron como el número de copias relativa en células crecidas en azufre, tiosulfato y pirita con respecto al número de copias relativa en las células crecidas en ión ferroso. Los experimentos de real time PCR se ensayaron en las condiciones estándar, utilizando dos extracciones independientes de RNA para cada condición de crecimiento.

Anteriormente se había analizado el contexto genómico del gen *doxDA1*, el cual se encontró era cotranscrito con *modA1* y *p21*. Por otro lado, el gen *doxDA2* se encuentra codificado en la hebra antiparalela al operón de la P21 y se encuentra río abajo de un gen que codifica para otra proteína posiblemente de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato, la cual se denominó ModA2 (Figura 19A). Mediante experimentos de RT-PCR se demostró que el gen *modA2* también se expresa en células de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato. Sin embargo, se demostró que *doxDA2* no se cotranscribe con *modA2*, y por lo tanto constituyen unidades transcripcionales independientes (Figura 19B).

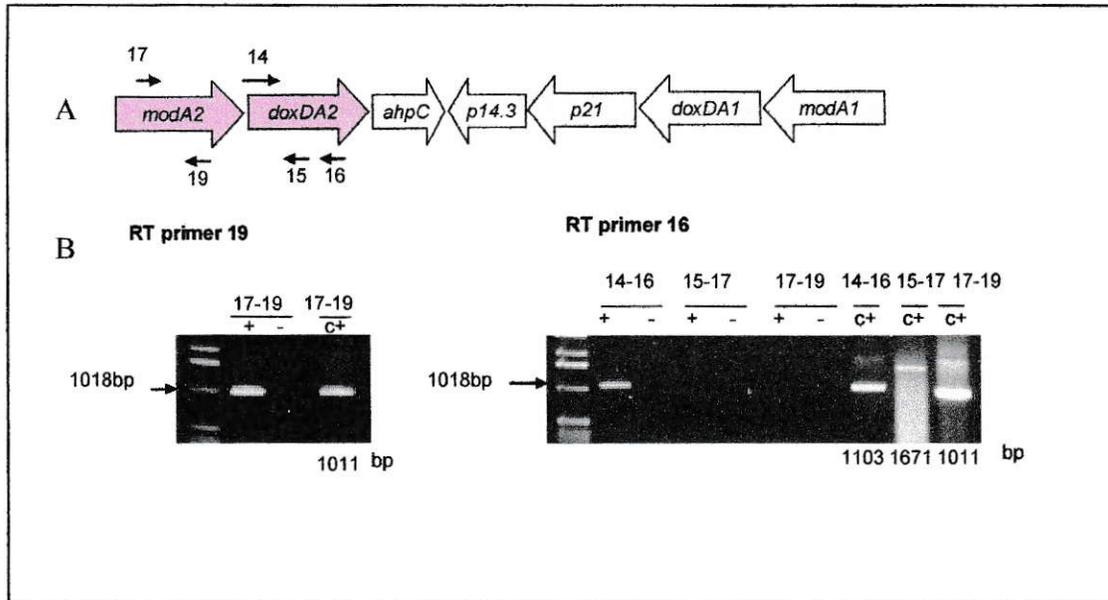


Figura 19. Análisis de cotranscripción de los genes *modA2* y *doxDA2* de *A. ferrooxidans* por RT-PCR. A. Diagrama esquemático indicando la posición de los genes. Las flechas indican la localización de los partidores utilizados para las reacciones de RT y de PCR. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR. La reacción de RT se realizó utilizando 3 μ g de RNA total obtenido de células crecidas en tiosulfato. Se incluyeron reacciones de RT con (+) y sin (-) transcriptasa reversa, con el fin de descartar falsos positivos debido a contaminación de los cDNA con DNA genómico. C, control con DNA genómico. Los tamaños esperados de los productos de amplificación se muestran bajo el gel.

3.3 La proteómica como herramienta para el estudio de microorganismos utilizados en biominería.

La genómica, metagenómica y la proteómica a gran escala se utilizan en el estudio de las respuestas regulatorias globales que usan los microorganismos para adaptarse a los cambios ambientales.

La proteómica constituye una herramienta poderosa y fundamental, en especial en aquellos casos en que el empleo de la genómica se ve limitado por las características propias del microorganismo, tal como sucede en el caso de *A. ferrooxidans*, para el cual no se han descrito hasta el momento, técnicas eficientes que permitan su transformación con DNA exógeno o el desarrollo de cepas mutantes. La proteómica provee información directa acerca de la dinámica de expresión de las proteínas, dando una visión global del comportamiento celular en una determinada condición. Un aspecto importante en los estudios proteómicos es caracterizar las proteínas diferencialmente expresadas por células expuestas a diversas condiciones ambientales. La electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) en combinación con la espectrometría de masas es comúnmente la herramienta más utilizada en los estudios proteómicos en bacterias (Washburn y Yates, 2000). Mediante esta técnica las proteínas presentes en un extracto celular se separan de acuerdo a su punto isoelectrico (isoelectroenfoque), y luego, en una segunda electroforesis de acuerdo a su peso molecular. Las proteínas aisladas de los geles pueden ser identificadas

mediante secuenciación del extremo amino-terminal por microsecuenciación de EDMAN o mediante el análisis de los péptidos separados por espectrometría de masas.

3.3.1. Estudios proteómicos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270: análisis de proteínas totales de *A. ferrooxidans* crecido en diferentes fuentes de energía mediante 2D-PAGE.

Previo al desarrollo de esta Tesis, nuestro laboratorio realizó un estudio proteómico tendiente a estudiar la expresión diferencial de las proteínas totales de *A. ferrooxidans* crecido en azufre en comparación al crecimiento en ión ferroso. Para separar las proteínas totales de *A. ferrooxidans* sintetizadas durante el crecimiento en ambos sustratos energéticos, se utilizó la técnica de electroforesis 2D-NEPHGE. Se encontró una proteína cuyo nivel de expresión era significativamente mayor en azufre que en ión ferroso y se identificó como una posible tiosulfato azufre transferasa (P21). Además se determinó que una posible proteína de unión a sulfato/tiosulfato (ModA1) presentaba niveles altos de expresión en células de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato en comparación con ión ferroso (Ramírez y col., 2002).

Con el fin de profundizar en estos estudios, se decidió como primer paso durante el desarrollo de esta Tesis completar estos análisis y por lo tanto se realizó un análisis diferencial de las proteínas sintetizadas por las células crecidas en tiosulfato, azufre y en ión ferroso. Para ello, se realizó electroforesis 2D-PAGE de muestras de proteínas totales provenientes de

células crecidas en estos sustratos mediante dos sistemas de isoelectroenfoque: la técnica de O'Farrel y col. (1977) y el sistema Protean II - IEF cell de Bio-Rad. A partir de los gels bidimensionales se enviaron a secuenciar 13 proteínas mediante microsecuenciación del extremo amino terminal o mediante espectrometría de masas. En la figura 20, se observa la ubicación de todas las manchas proteicas. El análisis de los péptidos permitió la identificación de las proteínas (Tabla 6) y la localización de los correspondientes genes en la secuencia genómica disponible de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Ramírez y col., 2004).

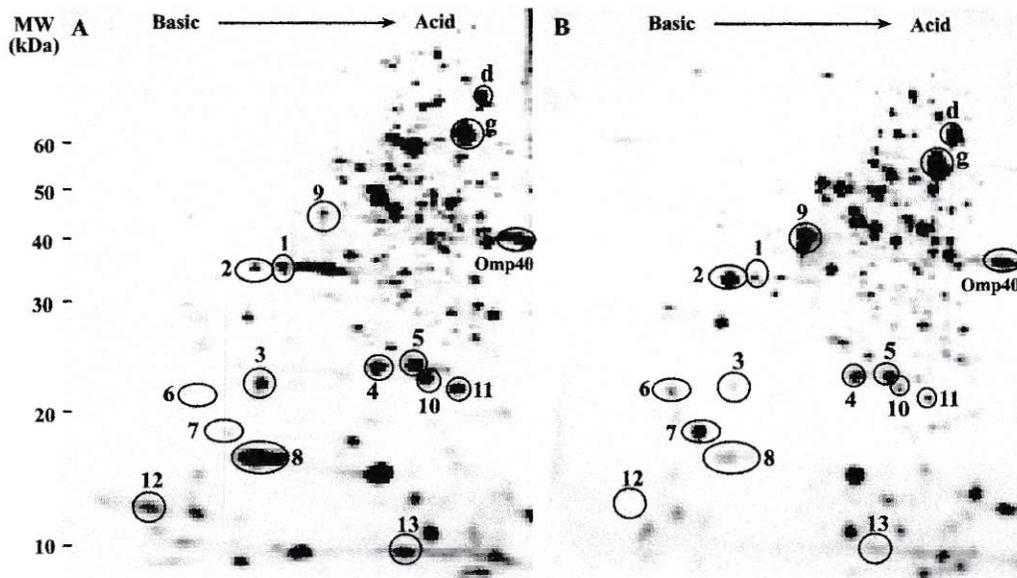


Figura 20. Expresión diferencial de proteínas expresadas por *A. ferrooxidans*. Las células de *A. ferrooxidans* se crecieron en azufre o en ión ferroso en presencia de [^{35}S]-metionina. Los extractos de proteínas totales provenientes desde estos cultivos se separaron mediante 2D-PAGE al no equilibrio y las proteínas se detectaron por autoradiografía.

Tabla 6. Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en azufre o en ión ferroso.

Mancha	SP	PM/pI	S ⁰	Proteína putativa
1	+	32,975/8.58	↓ 2.4	Phosphate binding protein PstS
2	+	33,984/8.77	↑ 1.9	Sulfate/thiosulfate binding protein (ModA1)
3	+	19,950/8.86	↓ 3.4	Cytochrome <i>c</i> ₅₅₂
4	-	22,377/5.69	↓ 1.6	Thioredoxin peroxidase
5	-	22,948/6.05	↓ 2.1	Superoxide dismutase
6	+	20,915/9.18	↑ ^α	Thiosulfate sulfur transferase (P21)
7	+	16,322/8.84	↑ 7.7	Putative sterol carrier protein
8	+	16,550/8.00	↓ 5.9	Rusticyanin
9	+	45,137/7.85	↑ 4.6	Capsule polysaccharide export WcbC
10	-	22,673/5.54	↓ 5.7	Putative protein
11	-	20,371/5.25	↓ 3.5	Conserved hypothetical protein
12	-	11,332/9.00	↓ ^α	Bacterial nucleoid DNA-binding protein
13	-	12,877/5.90	↓ 6.5	Small RuBisCo subunit CbbS

Las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas. La presencia (+) o ausencia (-) de péptido señal (SP) se determinó utilizando el programa SignalP 3.0. Los valores de peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) se calcularon con el programa ProtParam. Las flechas indican el número de veces en que aumentan (↑) o disminuyen (↓) los niveles de la proteína en las células crecidas en azufre respecto a las células crecidas en ión ferroso.

Dentro de las proteínas con mayor nivel de expresión en azufre y tiosulfato se encontró, además de las ya mencionadas P21 (Mancha 6, Figura 20) y ModA1 (Mancha 2, Figura 20), una posible proteína de transporte de polisacárido capsular de 45 kDa (WcbC) (Mancha 9, Figura 20), y una posible proteína de transporte de esteroides no caracterizada de 16 kDa (Mancha 7, Figura 20).

El nivel de expresión de la proteína de WcbC, se encuentra elevado en las células crecidas en azufre elemental respecto de las células crecidas en ión ferroso. Al utilizar como sustrato para el crecimiento de *A. ferrooxidans* uno de los propuestos intermediarios en la oxidación del azufre, el tiosulfato, también se encontró que los niveles de la proteína WcbC eran mayores en las células crecidas en este sustrato que en las células crecidas en ión ferroso (Figura 21). Al respecto, se conoce que *A. ferrooxidans* se adhiere a la superficie de los minerales, tal como al azufre elemental usado en estos estudios, produciendo una sustancia polisacárida extracelular (EPS), lo que podría estar dando cuenta de la inducción de esta proteína (Harneit y col., 2006).

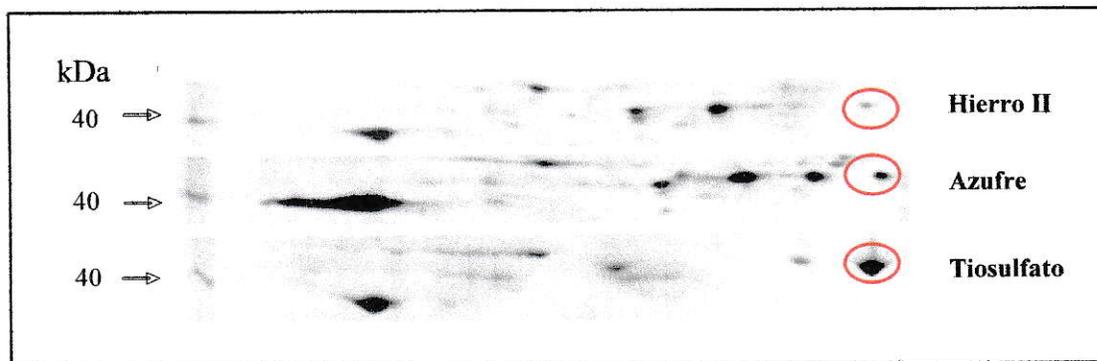


Figura 21. 2D-PAGE de proteínas totales de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en ión ferroso, azufre elemental y tiosulfato. Se muestra una sección de los respectivos geles en las que se indica con rojo la posición de la proteína WcbC.

Entre las proteínas que aumentaron su nivel de expresión en las células crecidas en ión ferroso, encontramos además de la bien caracterizada rusticianina, la subunidad menor de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (RuBisCo) (CbbS1), una proteína de unión a DNA y dos proteínas desconocidas. La subunidad de la rubisco (CbbL1) y una proteína del carboxisoma de 30 kDa (CbbQ), que se encuentra codificada río abajo de los genes *cbbLS1*, también presentó niveles mayores de expresión en las células crecidas en ión ferroso comparado con las células crecidas en azufre. Al respecto, se ha postulado que dos parámetros fisiológicos, la disponibilidad de la fuente de carbono (incluyendo CO₂), y la disponibilidad de compuestos inorgánicos reducidos utilizados como sustrato durante el crecimiento autotrófico, controlan la expresión de las enzimas del ciclo de Calvin (como la Rubisco) en bacterias quimioautotróficas (Shively y col., 1998).

Como se describió en la sección anterior en el contexto genómico de la proteína P21, además de la proteína de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato (ModA1), se encuentra codificada otra proteína con similitud a una proteína de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato, la que se denominó ModA2. El gen que codifica para ModA2 se encuentra en dirección opuesta al gen *p21* y río abajo de una segunda copia del gen *doxDA* (que codifica para una posible tiosulfato quinona oxidoreductasa), el cual se denominó *doxDA2*. Experimentos de RT-PCR desarrollados durante esta Tesis demostraron que en efecto el gen *modA2* se transcribe aunque al parecer no estaría formando

una unidad transcripcional con *doxDA2* (Figura 19). Anteriormente, Ramírez (2002) había descrito que los niveles de ModA1 se encontraban aumentados en las células crecidas en tiosulfato en comparación con las células crecidas en ión ferroso. Nosotros encontramos que lo mismo sucedía con la proteína ModA2 (Figura 22A). Sin embargo, los niveles de ModA2 son mucho mayores en células crecidas en tiosulfato que en células crecidas en azufre (Figura 22B) a diferencia de lo encontrado para ModA1.

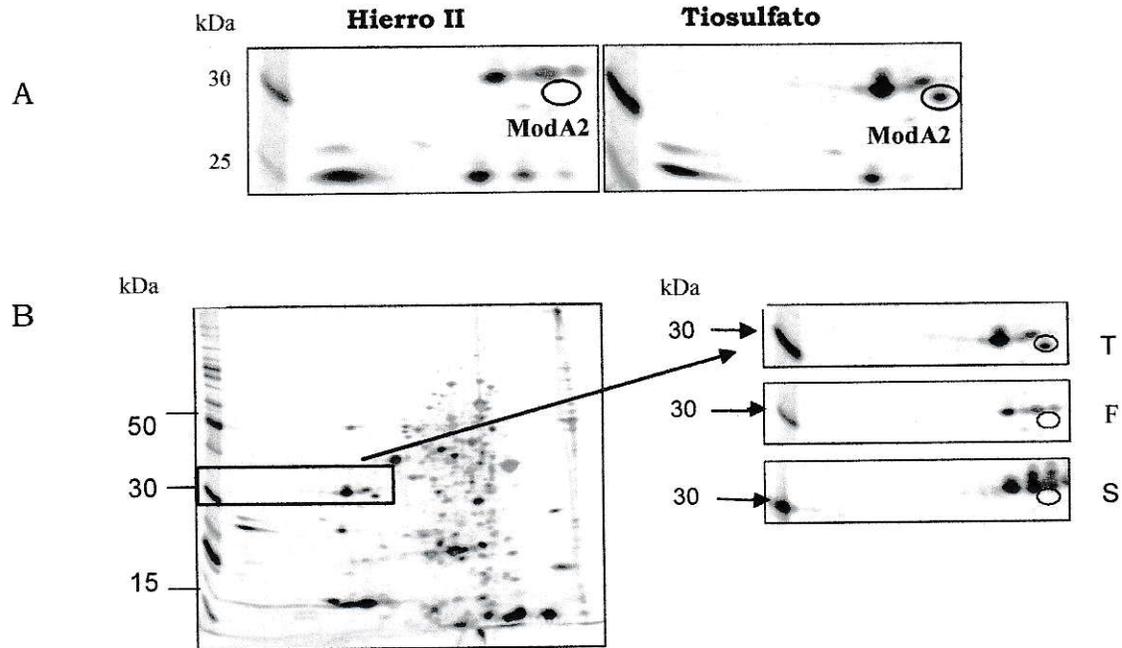


Figura 22. Análisis de la expresión de la proteína ModA2 en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Las proteínas totales de *A. ferrooxidans* crecido en diferentes condiciones se separaron mediante 2D-NEPHGE con un gradiente de pH entre 3 (derecha del gel) y 10 (izquierda del gel). Las proteínas se detectaron mediante tinción con nitrato de plata. **A.** Sección de los geles 2D-PAGE de células crecidas en tiosulfato o en hierro. **B.** Gel 2D-PAGE completo obtenido a partir de células crecidas en tiosulfato, y secciones de los geles 2D-PAGE obtenido a partir de células crecidas en tiosulfato (T), ión ferroso (F) y azufre (S). Con un círculo se indica la posición de la proteína ModA2.

3.3.2. Estudios proteómicos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mediante proteómica a gran escala (“high throughput proteomic”).

Últimamente se ha desarrollado una nueva técnica para el análisis de proteínas mediante espectrometría de masas y en la actualidad es posible identificar todas las proteínas presentes en un lisado celular sin una separación previa de las mismas mediante geles. A esta metodología se le ha llamado proteómica a gran escala o en inglés, “high throughput proteomics”. Un extracto proteico total puede ser una muestra extremadamente compleja de analizar, por lo que normalmente las proteínas son sometidas a una separación cromatográfica (HPLC) previo al análisis mediante espectrometría de masas. La combinación de HPLC con el análisis mediante espectrometría de masas denominado en inglés, “electron spray ionization” (ESI-MS/MS), es una metodología automatizada y se ha aplicado satisfactoriamente al análisis de la expresión de proteínas en muestras complejas (Washburn y col., 2001).

3.3.2.1. Análisis de proteínas totales de *A. ferrooxidans*.

Con el fin de profundizar los estudios de expresión de proteínas sintetizadas por *A. ferrooxidans* crecido en diferentes fuentes de energía, se realizó un análisis de las proteínas presentes en extractos proteicos totales provenientes de células de *A. ferrooxidans* crecido en ión ferroso, azufre y tiosulfato, mediante proteómica a gran escala.

En general, cada extracto proteico se sometió directamente a digestión triptica, y los péptidos resultantes se separaron mediante HPLC y se analizaron por espectrometría de masas.

Se encontraron 15 proteínas más abundantes (de acuerdo al número total de péptidos) en azufre y tiosulfato comparado con la muestra proveniente desde el cultivo en ión ferroso (Tabla 7). En general, se encontraron algunas proteínas caracterizadas previamente, como la oxidasa de hierro (HiPIP), la ATP synthase F1 y una posible sulfuro quinona oxido reductasa (SQR). Además se corroboró algunos resultados encontrados mediante proteómica convencional 2D-PAGE, analizados en esta Tesis. Se encontró una posible proteína de transporte de esteroides de 16 kDa (AFO 1450) (Mancha 7, Figura 20), la proteína P21 y la proteína ModA1. Además, se encontró un aumento de los niveles de una de las proteínas con similitud a una tiosulfato quinona oxidoreductasa (DoxDA1). Como ya se recalcó, estas tres últimas proteínas estarían codificadas en una misma unidad transcripcional.

Tabla 7. Proteínas de *A. ferrooxidans* de las cuales se obtuvo un mayor número de péptidos de células crecidas en azufre y en tiosulfato, en comparación con los encontrados en células crecidas en ión ferroso.

AFO	Proteína
1450	Putative sterol carrier protein (<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259)
1727	Superoxide dismutase (Sod)
1882	Sulfide-quinone reductase, putative
2356	Ribosome recycling factor (Frr)
3520	Cold-shock protein (CspE)
3845	AhpC-TSA family-glutaredoxin domain protein
3852	Conserved hypothetical protein
3913	Ribosomal protein L11 (RplK)
3933	Serine hydroxymethyltransferase (GlyA)
4310	Sulfur-pyrite-thiosulfate-sulfide-induced protein (P21)
4311	DoxD-like family protein (DoxDA1)
4312	Periplasmic solute-binding protein, putative (ModA1)
4543	ATP synthase F1, beta subunit (AtpD)
4624	Cytochrome c oxidase, aa3-type, subunit I (CoxA)
551	Iron oxidase (Iro)

Las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas LCQ/MS.

Alternativamente, la utilización de “Fourier transform ión cyclotron resonante mass spectrometer” (FT-ICR MS) (Martin y col., 2000) es recomendada para realizar análisis diferenciales más exhaustivos debido a que posee una gran resolución y un amplio rango dinámico. Sin embargo, el análisis de los espectros es muy complejo y en general se recomienda aplicar esta técnica al análisis de subproteomas, los cuáles tienen una menor cantidad de proteínas. A pesar de la complejidad del análisis de los extractos totales, fue posible identificar algunas proteínas de las cuales se generaron

un mayor número de péptidos a partir de los extractos proteicos provenientes desde cultivos de azufre en comparación con las células crecidas en ión ferroso o en tiosulfato (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Proteínas de *A. ferrooxidans* de las cuales se obtuvo un mayor número de péptidos de células crecidas en azufre, en comparación con los encontrados en células crecidas en ión ferroso.

AFO	Proteína
2117	Hypothetical protein
2096	Hypothetical protein (no está anotada)
1450	Putative sterol carrier protein (<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259)
2088	Conjugal transfer protein TrbE, putative
554	Ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b subunit (PetB-2)
2086	Conjugal transfer protein TrbJ, putative
2275	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative (ModA3)
1359	Outer membrane toxin secretion efflux protein, putative
2181	Hypothetical protein
3983	Pyrroline-5-carboxylate reductase (ProC)
3069	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D, authentic frameshift
39	Aspartate 1-decarboxylase (PanD)
861	NLP-P60 family protein

Las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas FT-ICR MS.

Tabla 9. Proteínas de *A. ferrooxidans* de las cuales se obtuvo un mayor número de péptidos de células crecidas en azufre, en comparación con los encontrados en células crecidas en tiosulfato.

AFO	Proteína
2117	Hypothetical protein
2088	Conjugal transfer protein TrbE, putative
2096	Hypothetical protein (no está anotada)
2275	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative (ModA3)
2011	Conjugal transfer protein, TrbF
2081	Conjugal transfer protein TrbL, putative (revisar porque está cortada)
554	Ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b subunit (PetB-2)
633	Hypothetical protein
1055	Hypothetical protein
1359	Outer membrane toxin secretion efflux protein, putative
2086	Conjugal transfer protein TrbJ, putative
2411	Hypothetical protein
3147	Oxidoreductase (<i>Lactobacillus plantarum</i>)
708	NADH dehydrogenase I, G subunit [<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493]
776	Roadblock-LC7 domain protein

Las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas FT-ICR MS.

Al respecto, cabe destacar la identificación de cuatro proteínas con similitud a proteínas pertenecientes al sistema de secreción tipo IV, que en otros microorganismos participa en la transferencia de DNA o proteínas desde la célula hacia otras células o hacia el medio extracelular. Las proteínas se identificaron como TrbB, TrbE, TrbF y TrbJ. Estos resultados se validaron utilizando PCR en tiempo real y macroarreglos de DNA (Valenzuela y col., 2006). En todos los casos se demostró un aumento de la expresión de

los respectivos genes sólo durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en azufre, por lo que las proteínas podrían estar relacionadas a la interacción de la bacteria con un sustrato sólido. Además mediante esta técnica, se logró determinar que los niveles de otra proteína con similitud a una proteína de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato, la cual se identificó como ModA3 (AFO 2275), se encontraban aumentados en las células provenientes de cultivos en azufre en comparación con las células crecidas tanto en ión ferroso como en tiosulfato.

La aparición de cuatro de las proteínas que conforman el sistema de secreción tipo IV en las muestras provenientes de células crecidas en azufre permite especular que este sistema pudiera estar cumpliendo un papel fundamental durante esta condición de crecimiento. Por lo tanto, se profundizó en el estudio de este sistema analizando la región del genoma que codifica para estas proteínas y se encontró que los genes se agrupaban principalmente en dos regiones separadas por 60 kb, tal como lo habían descrito previamente Barreto y col. (2003). La organización de los genes en *A. ferrooxidans* es muy similar a lo encontrado en *Agrobacterium tumefaciens*, en la que se conoce que el sistema Trb se encuentra relacionado con la transferencia de DNA y proteínas entre ella y su hospedero (Figura 23).

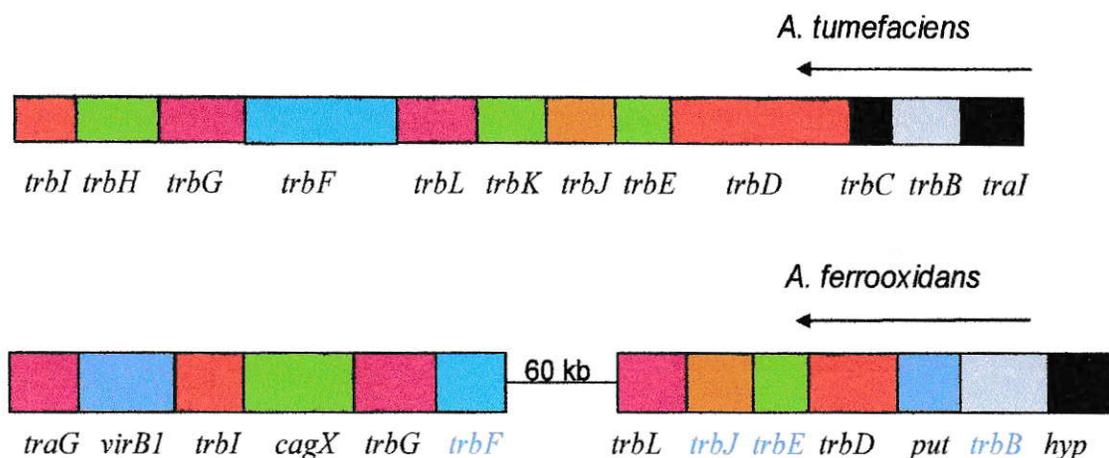


Figura 23. Diagrama esquemático representando la organización de los genes que conforman el sistema de secreción tipo IV. Los nombres de los genes correspondientes a las proteínas identificadas mediante análisis por espectrometría de masas se muestran con letras azules.

Tres de las proteínas Trb encontradas mediante los estudios proteómicos, se encuentran codificadas en una misma región del genoma. Para comprobar si forman una única unidad transcripcional, se realizó RT-PCR para algunos de los genes. Los resultados demostraron que estos genes se expresan, pero no se cotranscriben (Anexo 3). Esto podría explicar la ausencia de las otras proteínas Trb codificadas en la misma región del genoma en las muestras analizadas por espectrometría de masas, ya que éstas podrían sintetizarse en un nivel mucho menor.

3.3.2.2. Análisis de proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

El espacio periplásmico de las bacterias Gram negativas contiene enzimas que sintetizan componentes de la membrana celular, enzimas degradativas, proteínas que participan en el metabolismo disimilatorio y el componente sensor de algunos sistemas de control metabólico que responden a estímulos ambientales. Las proteínas del periplasma son solubles y pueden ser separadas de otras proteínas celulares a través de técnicas que promueven la permeabilización de la membrana externa de las bacterias.

Se ha demostrado que las actividades enzimáticas involucradas en la oxidación de compuestos reducidos de azufre en microorganismos quimiolitotróficos se encuentran principalmente asociadas a la fracción periplásmica. Por otro lado, los componentes del único sistema bien caracterizado de oxidación de tiosulfato, el sistema Sox, está formado por proteínas que se encuentran formando un complejo en el periplasma (Friedrich y col., 2005). Con el fin de encontrar e identificar otros componentes involucrados en la oxidación de compuestos reducidos de azufre por *A. ferrooxidans* se realizó un análisis global y diferencial de las proteínas periplásmicas sintetizadas durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en tiosulfato, ión ferroso y azufre elemental.

3.3.2.2.1. Análisis global de proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* mediante espectrometría de masas.

Las proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 expresadas durante el crecimiento en tiosulfato, ión ferroso y azufre elemental se extrajeron con cloroformo y sometieron a electroforesis convencional en geles de poliacrilamida (Figura 24). Las proteínas resueltas en los geles se analizaron e identificaron mediante espectrometría de masas FT-ICR MS. Todas las proteínas identificadas se sometieron a un exhaustivo análisis bioinformático que incluyó una búsqueda de similitud mediante Blastp, de dominios conservados, de señales de exportación, determinación de punto isoelectrico y peso molecular y análisis de su contexto genómico.

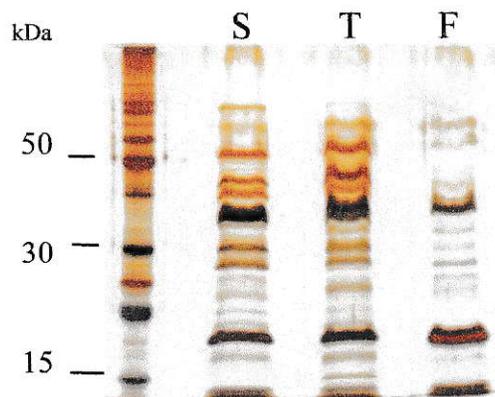


Figura 24. SDS-PAGE de las proteínas periplásmicas extraídas de cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en azufre (S), tiosulfato (T) e ión ferroso (F). Gel de poliacrilamida al 12,5 % teñido con nitrato de plata.

A) Proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en tiosulfato.

En las muestras de proteínas periplásmicas provenientes de cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en tiosulfato se identificaron 130 proteínas. La mayor parte de las proteínas, 36 %, correspondió a proteínas de función desconocida que incluyeron proteínas conservadas de función desconocida (10 %) y proteínas clasificadas como hipotéticas (26 %). El 14,6 % correspondió a proteínas relacionadas con la composición o biogénesis de la envoltura celular, el 13,8 % a proteínas relacionadas con transporte a través de la membrana celular, el 10,8 % a proteínas relacionadas con el metabolismo energético y el 10% a proteínas relacionadas con el plegamiento y la estabilización de la estructura de las proteínas (Figura 25).

De acuerdo a nuestros resultados, todas estas proteínas se expresan en alguna condición de crecimiento y por lo tanto las proteínas hipotéticas corresponderían a proteínas desconocidas de *A. ferrooxidans*. La espectrometría de masas es una técnica con un amplio rango dinámico, por lo que es posible identificar proteínas que se encuentran en concentraciones muy bajas. Al respecto, se encontró un pequeño porcentaje de proteínas relacionadas con el metabolismo de ADN, transcripción, metabolismo de aminoácidos y síntesis de proteínas. Éstas pueden haberse liberado producto de ruptura celular generada durante la preparación de la muestra, ya que aunque la técnica utilizada para preparar los extractos permite obtener un

extracto muy enriquecido en proteínas periplásmicas no permite tener un extracto totalmente puro.

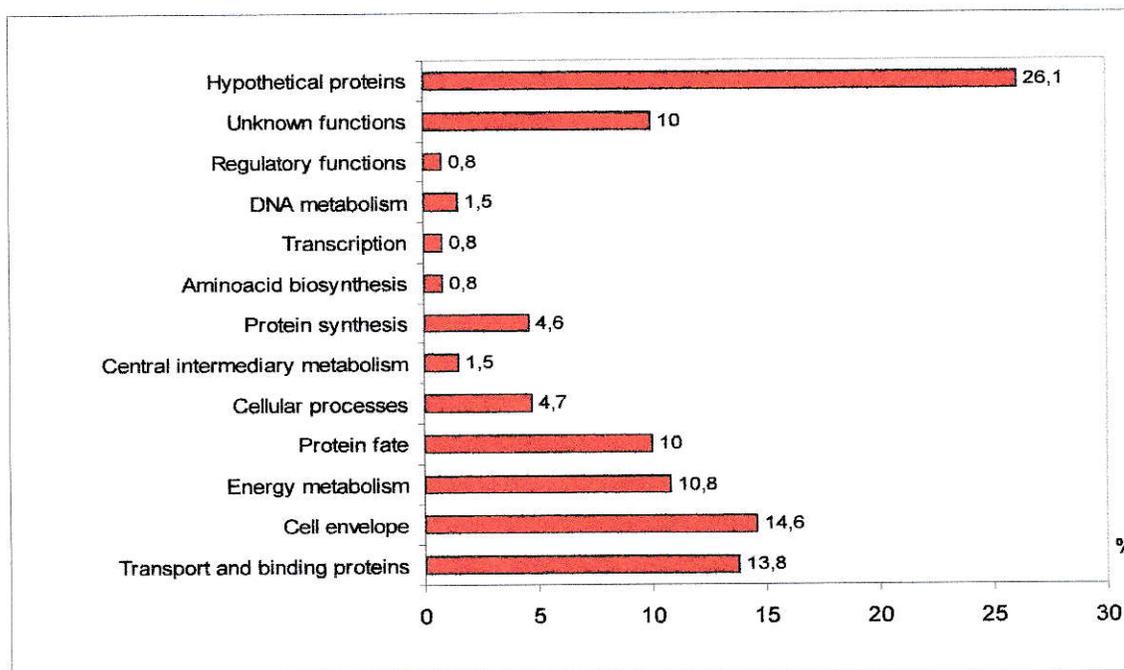


Figura 25. Proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en tiosulfato clasificadas de acuerdo a la categoría funcional.

Por otro lado, la gran mayoría de las proteínas identificadas tienen algún tipo de señal de exportación (Figura 26). El 62,3 % de ellas tienen una señal tipo Sec, el 3,8 % tiene una señal tipo Tat, el 11,5 % tiene una señal tipo SecretomeP, el 8,5 % corresponde a proteínas periplásmicas o precursores de proteínas exportadas que no tienen una señal típica pero

que mediante análisis de similitud se conoce que poseen dicha ubicación subcelular. Finalmente, sólo el 13,8 % de las proteínas no poseían algún tipo de señal, y la mayoría de ellas corresponden a proteínas típicamente citoplásmicas que pudieran estar presentes en la muestra producto de una lisis celular. La lista completa de las proteínas identificadas en las muestras de periplasma provenientes desde cultivos de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato se encuentra dividida en dos Tablas, una que muestra las proteínas con señal de exportación (Tabla 10) y otra que muestra las proteínas sin señal de exportación (Tabla 11).

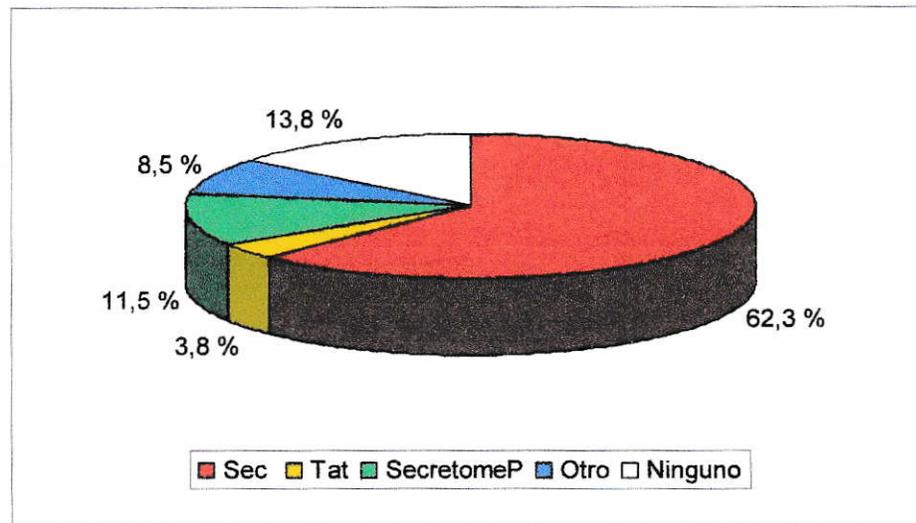


Figura 26. Distribución de las proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en tiosulfato clasificadas de acuerdo a la señal de exportación.

Tabla 10. Proteínas con señal de exportación identificadas en extractos periplásmicos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, crecido en tiosulfato.

AFO	AFE	Proteína	PM (kDa)	pl teórico	Señal de exportación
Transport and binding proteins (Anions)					
1673	1151	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS (<i>pstS2</i>)	38,4	9,3	Sec
2372	1648	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein (<i>pstS1</i>)	36,2	9,41	Sec
Transport and binding proteins (Cations and iron carrying compounds)					
263	174	TonB-dependent receptor	86,9	9,19	Sec
1538	1054	TonB-dependent receptor	85,3	6,53	Sec
2281	1590	iron compound ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative	38,4	9,72	Sec
3502	2438	cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	33,5	8,85	Sec
4277	2957	tol-pal system beta propeller repeat protein TolB (<i>tolB</i>)	45,5	8,76	Sec
4505	3103	TonB-dependent receptor	84,8	8,96	Sec
Transport and binding proteins: Porins					
1240	848	carbohydrate-selective porin, OprB family	40,7	7,05	Sec
Transport and binding proteins: Other					
1827	1256	toluene tolerance protein, putative	25,2	9,08	Sec
4142	2865	toluene tolerance protein, putative	23,5	9,33	Sec
Transport and binding proteins (Unknown substrate)					
2275	1586	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative	37,3	9,18	Sec
4306	2975	periplasmic solute-binding protein, putative	36,6	8,73	Sec
4312	2981	periplasmic solute-binding protein, putative	36,7	9,1	Sec
Cell envelope: Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides					
3003	2087	periplasmic glucans biosynthesis protein, MdoG (<i>mdoG</i>)	57,4	7,38	Sec
Cell envelope: Surface structures					
3773	2621	pilin, putative	17,7	5,09	SecP
4373	3018	pilus chaperone protein, putative	30	11,54	Sec
Cell envelope: other					
238	158	lipoprotein, putative	15,5	11,3	Sec, LipoP
445	297	lipoprotein, putative	10,2	9,42	Sec, LipoP
832	560	outer membrane protein, OMPP1-FadL-TodX family	47	8,59	Sec
1081	745	lipoprotein, putative	43,7	9,35	SecP
1134	783	outer membrane lipoprotein Slp, putative	20,1	6,28	SecP, LipoP
1242	850	lipoprotein, putative	16,2	8,49	Sec, LipoP
1443	982	vacJ lipoprotein	30,2	6,97	Sec, LipoP
2347	1632	outer membrane protein, OMP85 family	86,6	8,90	Sec
3514	2445	lipoprotein, putative	13,8	10,03	Sec, LipoP
3709	2579	rare lipoprotein B, putative	18,9	10,61	Sec LipoP
3825	2654	outer membrane protein transport protein, OMPP1-FadL-TodX family	36,9	5,92	Sec
3918	2722	OmpA family protein	22,3	9,4	Sec
3958	2748	lipoprotein, SmpA-OmlA family	7,9	9,16	SecP
4269	2953	peptidoglycan-associated lipoprotein, putative	19,6	6,4	Sec, LipoP
4336	2996	outer membrane protein	55	8,93	Sec

Energy metabolism: Amino acids and amines					
824	555	glycine cleavage system H protein, putative	15,2	4,74	SecP
Energy metabolism: Electron transport					
14	8	cytochrome c4 (<i>cycA-1</i>)	27,5	9,65	Sec
551	373	iron oxidase (<i>iro</i>)	10,8	9	Tat
561	378	cytochrome c4 (<i>cycA-2</i>)	26,2	9,95	Sec
4620	3179	cytochrome c (<i>cyc2</i>)	52,8	5,4	Sec
4621	3180	cytochrome c552 (<i>cyc1</i>)	25,2	9,2	Sec
4627	3186	rusticyanin (<i>rus</i>)	19,9	8,85	Sec
Protein fate: Protein and peptide secretion and trafficking					
3537	2463	type I secretion outer membrane protein, TolC family	50,4	6,4	Sec
Protein fate: Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides					
387	259	serine protease, DO-DeqQ family	53,4	7,3	Sec
2428	1685	serine protease, DO-DeqQ family	49,7	7,14	Sec
3614	2514	carboxy-terminal peptidase (<i>ctpA</i>) [3.4.21.102]	50,8	8,93	Sec
Protein fate: Protein folding and stabilization					
117	75	survival protein SurA (<i>surA</i>) [5.2.1.8]	52,3	6,42	Sec
243	162	thiol:disulfide interchange protein DsbG, putative	31,8	8,54	Sec
3617	2516	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type	28	9,24	Sec
Cellular processes: Detoxification					
2023	1399	carboxysome peptide B	92,4	8,21	SecP
Cellular processes: DNA transformation					
3754	2607	competence lipoprotein ComL, putative	30,2	8,93	Sec, Lipop
Central intermediary metabolism: Sulfur metabolism					
4310	2979	sulfur-pyrite-thiosulfate-sulfide-induced protein (P21)	23,8	9,36	Sec
Central intermediary metabolism: Other					
335	225	chologylglycine hydrolase, putative	39,3	7,15	Sec
Protein synthesis: Ribosomal proteins: synthesis and modification					
724	491	ribosomal protein L35 (<i>rplM</i>)	75	12,31	SecP
3890	2701	ribosomal protein S19 (<i>rpsS</i>)	10,3	11,28	SecP
3913	2717	ribosomal protein L11 (<i>rplK</i>)	14,9	9,84	SecP
Unknown function: Enzymes of unknown specificity					
1211	831	phosphoesterase family protein	60	6,26	Tat
3253	2266	phosphorylase, putative	39,5	7,28	SecP
Unknown function: General					
257	169	TonB-dependent receptor domain protein	28,9	8,41	SecP
1239	847	PQQ enzyme repeat domain protein	43,2	9,61	Sec
1245	851	dsbG domain protein	22,3	8,42	Sec
1678	1154	PQQ enzyme repeat domain protein	41,7	7,82	Sec
2019	1396	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein (Carboxysome structural protein CsoS2)	78,7	9,32	Tat
3704	2576	Ycel-like family protein	25,2	9,28	Sec
3816	2650	ErfK-YbiS-YcfS-YnhG family protein	37,6	7,77	Sec
3965	2753	thiol:disulfide interchange domain protein	21,9	6,96	Sec
4304	2974	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domainprotein	29,5	6,24	Tat
4314	2982	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal	29,7	6,35	Tat
4353	3006	LysM domain protein	37,6	9,62	Sec

Hypothetical proteins: Conserved

205	206	conserved hypothetical protein	63,2	9,78	Sec
262	163	conserved hypothetical protein	59,6	9,4	Sec
417	278	conserved hypothetical protein	23,9	9,04	Sec
1442	981	conserved hypothetical protein	24,2	8,92	Sec
3694	2570	conserved hypothetical protein	27,4	9,98	SecP
4271	2954	conserved hypothetical protein	28,9	8,91	Sec
4622	3181	conserved hypothetical protein	19,9	8,54	Sec

Hypothetical proteins: Domain

1546	1060	conserved domain protein	39,3	7,29	Sec
1547	1061	conserved domain protein	10,8	5,66	Sec
3602	2507	conserved domain protein	28	8,04	SecP
4205	2910	conserved domain protein	52,2	9,31	Sec

Hypothetical proteins

237	157	hypothetical protein	31,3	10,79	Sec
439	292	hypothetical protein	15,5	9,3	Sec
678	457	hypothetical protein	15,4	9,74	Sec
895	610	hypothetical protein	10,9	12,24	Sec
1203	826	hypothetical protein	17,8	9,72	Sec
1617	1110	hypothetical protein	16,1	10	Sec
3041	2111	hypothetical protein	21,4	9,94	Sec
3123	2167	hypothetical protein	25,4	9,88	SecP
3477	2418	hypothetical protein	27,9	9,55	Sec
3487	2429	hypothetical protein	46,3	9,04	Sec
3495	2434	hypothetical protein	44,5	8,78	Sec
3989	2770	hypothetical protein	19,9	5,04	Sec
4232	2928	hypothetical protein	14,8	7,8	Sec
4334	2994	hypothetical protein	49,8	9,1	Sec
4441	3060	hypothetical protein	20,3	10,14	Sec
4500	3099	hypothetical protein	21,3	8,56	Sec
4642	3197	hypothetical protein	14,5	9,48	Sec

ORFs no anotados por TIGR

		Score	e-value			
51	Hypothetical protein			15,4	7,25	Sec
253	Hypothetical protein			10,4	9,43	Sec
675	Copper resistance protein CopC (<i>Burkholderia</i> sp. 383)	85.9	4E-16	13,5	10,17	Sec
1450	Putative sterol carrier protein (<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259)	120	3E-26	20,5	9,40	Sec
1526	Hypothetical protein			15,3	10,28	Sec
4302	Hypothetical protein			16,8	9,33	Sec
4616	Cytochrome c, class I (<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-C)	74.3	5E-12	32,2	9,99	SecP

Los nombres de las proteínas corresponden a los asignados por el TIGR. AFO, marco abierto de lectura obtenido a partir del análisis de la secuencia completa del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, AFE, proteínas predichas desde "TIGR- Comprehensive Microbial Resource"; PM, peso molecular; pI, punto isoeléctrico; Sec, predicción de péptido señal por SignalP; Tat, predicción de péptido señal por TatP; LipoP, predicción de señal para una lipoproteína; SecP, predicción de señal no típica por SecretomeP. Cálculo de PM, pI, y predicción de señal de exportación se realizaron con AFOs desde la base de datos local.

Tabla 11. Proteínas sin señal de exportación identificadas en extractos periplásmicos de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270, crecido en tiosulfato

AFO	AFE	Proteína	PM (Kda)	pl teórico	PENCE	CELLO
Transport and binding proteins (Cations)						
2209	1539	molybdenum-pterin binding protein	7,2	5,77	CP	CP
Transport and binding proteins: Unknown substrate						
365	244	ABC transporter, permease protein, putative	40,8	6,66	MI	MI
Cell envelope: Other						
4166	2882	lipoprotein, putative	69,3	8,93	NP	PP
Energy metabolism: ATP-proton motive force interconversion						
4540	3127	ATP synthase F1, alpha subunit (<i>atpA</i>) [3,6,3,14]	55,6	5,28	MI	CP
Energy metabolism: Chemoautotrophy						
2015	1394	ribulose biphosphate carboxylase, large subunit (<i>cbbL-2</i>) [4,1,1,39]	52,8	5,80	NP	CP
2017	1395	ribulose biphosphate carboxylase, small subunit (<i>cbbS-2</i>) [4,1,1,39]	12,9	5,90	NP	CP
Energy metabolism: Electron transport						
3425	2383	thioredoxin (<i>trx</i>)	11,9	4,59	PP	CP
3975	2761	sulfide quinone reductase, putative	41,2	7,24	CP	CP
Energy metabolism: Glycolysis/gluconeogenesis						
4475	3083	phosphoglycerate kinase (<i>pgk</i>) [2,7,2,3]	44,7	6,29	CP	CP
Protein fate: Protein and peptide secretion and trafficking						
3826	2655	outer membrane lipoprotein carrier protein LolA, putative	25,8	9,97	PP	PP
Protein fate: Protein folding and stabilization						
655	655	chaperone protein Dnak (<i>dnaK</i>)	68,2	5,04	CP	CP
1476	1009	heat shock protein, Hsp20 family	16,9	6,2	CP	CP
3580	2493	thiol:disulfide interchange protein DsbD (<i>dsbD</i>) [1,8,1,8]	67	9,13	MI o PP	MI
3582	2495	chaperonin, 10 kDa (<i>groES</i>)	13,2	6,31	CP	CP
3584	2496	chaperonin, 60 kDa (<i>groEL</i>)	58,6	5,2	CP	CP
Cellular processes: Detoxification						
1727	1188	superoxide dismutase (<i>sod</i>) [1,15,1,1]	22,9	6,05	CP	CP
2024	1400	carboxysMEe shell peptide	9,9	5,3	EC	CP
2025	1401	carboxysMEe shell peptide	10,2	5,64	EC	CP
2026	1402	carboxysMEe shell peptide	8,8	6,05	EC	CP
Protein synthesis: Ribosomal proteins: synthesis and modification						
3861	2677	ribosMEal protein L17 (<i>rplQ</i>)	14,2	11,1	CP	CP
3908	2714	ribosMEal protein L7-L12 (<i>rplL</i>)	12,8	4,6	NP	CP
Protein synthesis: Translation factors						
3899	2707	translation elongation factor Tu (<i>tuf-1</i>)	43,2	5,35	CP	CP
Amino acid biosynthesis: Aspartate family						
3944	2740	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--hMEocysteine S-methyltransferase (<i>metE</i>) [2,1,1,14]	88,2	5,86	CP	CP

Transcription: Degradation of RNA						
3548	2472	endoribonuclease L-PSP, putative	13,5	5,16	NP	ME
DNA metabolism: Chromosome-associated proteins						
3071	2130	DNA-binding protein HU (<i>hup</i>)	93,9	9,77	CP	CP
DNA metabolism: DNA replication, recombination, and repair						
731	495	integration host factor, alpha subunit (<i>ihfA</i>)	10,9	9,4	CP	CP
Regulatory functions: Other						
1744	1202	RNA chaperone Hfq (<i>hfq</i>)	9,8	5,24	CP	CP
Hypothetical proteins: Conserved						
809	545	conserved hypothetical protein	8,3	6,19	NP	CP
1817	1248	conserved hypothetical protein	15,1	5,06	NP	ME

Los nombres de las proteínas corresponden a los asignados por el TIGR. AFO, marco abierto de lectura obtenido a partir del análisis de la secuencia completa del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, AFE, proteínas predichas desde "TIGR- Comprehensive Microbial Resource". La ubicación subcelular fue predicha utilizando las herramientas bioinformáticas CELLO y PENCE. PM, peso molecular; pI, punto isoeléctrico; MI, membrana interna; CP, citoplásmica; ME, membrana externa; PP, periplásmica; NP, sin predicción, Cálculo de PM, pI, and predicción de señal de exportación se realizaron con AFOs desde la base de datos local.

Otro aspecto relevante en relación a este análisis global es que encontramos que gran parte de las proteínas identificadas (70,8 %) tiene puntos isoeléctricos básicos (Figura 27) siendo algunas de ellas extremadamente básicas con pI alrededor de 12. El carácter básico de las proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* podría estar relacionado con el bajo pH al cuál se encuentran estas proteínas, ya que el periplasma de *A. ferrooxidans* tiene un pH alrededor de 3.

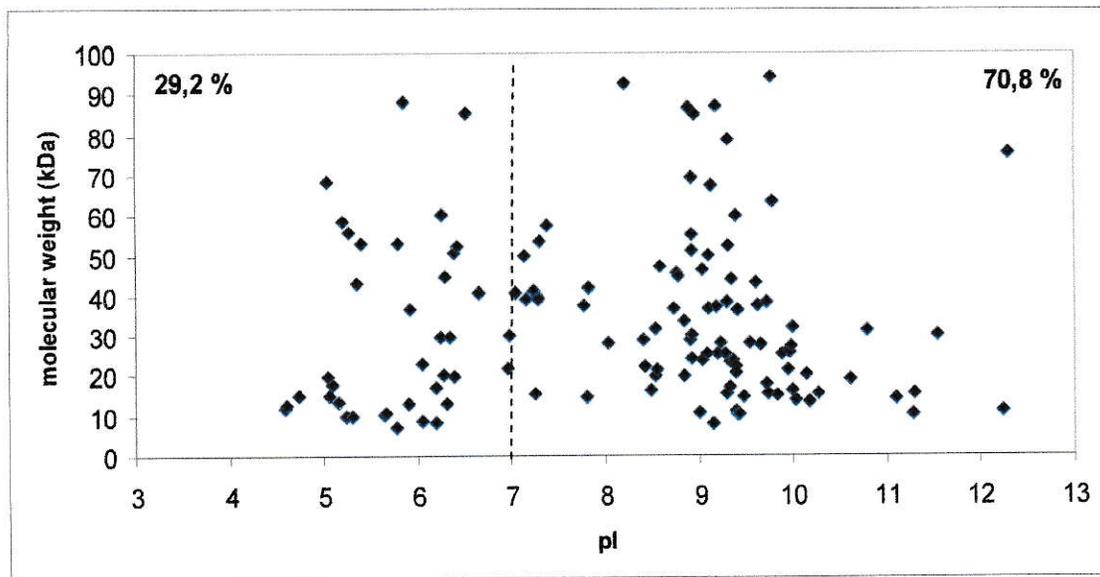


Figura 27. Distribución de las proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en tiosulfato, de acuerdo a su punto isoeléctrico.

B) Comparación entre las proteínas periplásmicas expresadas en tiosulfato con aquellas expresadas durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en azufre o en ion ferroso.

Se identificaron otras 34 proteínas que se encontraron en muestras provenientes de cultivos en ión ferroso y azufre elemental y que no se encontraron previamente en los cultivos en tiosulfato (Figura 28). De estas proteínas, 14 tienen algún tipo de señal de exportación.

Se identificaron 11 proteínas a las que no se les puede asignar una función conocida. Además, las muestras provenientes de los cultivos en ión ferroso y azufre elemental poseen una mayor cantidad de proteínas ribosomales y de otras proteínas típicamente citoplásmicas involucradas en

biosíntesis y plegamiento. Algunas de estas proteínas poseen una señal de exportación pero su ubicación periplásmica es incierta y lo más probable es que su aparición se deba a lisis celular.

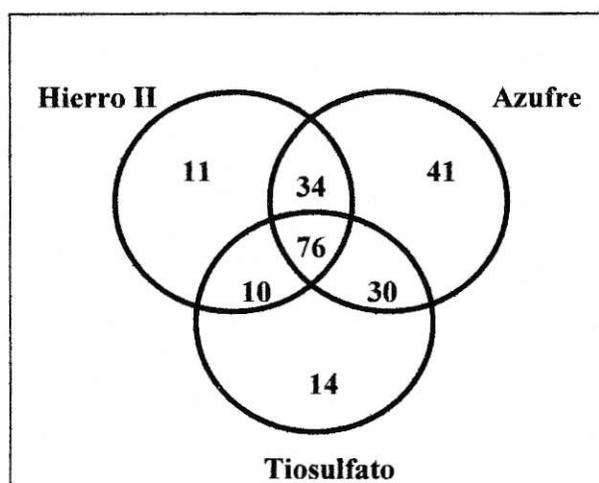


Figura 28. Número de proteínas identificadas en las muestras de periplasma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en diferentes fuentes de energía.

Por otro lado, se encontraron 71 proteínas provenientes de cultivos de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental y que no se encontraron en las muestras de ión ferroso. De éstas, 30 proteínas se expresaron también en las células crecidas en tiosulfato. Por lo tanto, se identificaron 41 nuevas proteínas que sólo se encontraron en muestras provenientes desde cultivos de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental (Figura 28). Aunque

nuevamente se encontró cierto grado de contaminación de la muestra con componentes citoplásmicos y en especial proteínas ribosomales, fue posible identificar nuevas proteínas relacionadas con transporte, metabolismo energético o adhesión.

Finalmente, se identificaron 21 proteínas que se expresan en ión ferroso, y no en azufre (Figura 28). De estas proteínas, 10 habían sido identificadas previamente en las muestras provenientes de cultivos en tiosulfato.

En vista de lo anterior y comparando las tres fuentes de crecimiento, se encontró que 14 del total de las proteínas identificadas en muestras provenientes de cultivos en tiosulfato fueron exclusivamente producidas durante esta condición de crecimiento (Figura 28). Estas proteínas corresponden a los AFOs: 1827, 2281, 365, 4166, 3580, 2023, 335, 1245, 3816, 4304, 205, 1546, 4205 y 4500. De éstas, el 28,6 % correspondió a proteínas únicas de *A. ferrooxidans* de función desconocida.

3.3.2.2.2. Análisis diferencial de proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* mediante electroforesis bidimensional.

El análisis global de proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* permitió identificar todas las proteínas presentes en una determinada condición de crecimiento. Sin embargo, no permitió cuantificar los niveles de expresión de estas proteínas.

Para obtener una cuantificación aproximada de los niveles de algunas de las proteínas más abundantes se realizó un análisis diferencial mediante 2D-NEPHGE (O'Farrel, 1975). Los patrones de expresión de proteínas periplásmicas de cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en tiosulfato, ión ferroso y azufre elemental se compararon con el patrón de expresión de proteínas totales obtenidas durante estas tres condiciones de crecimiento. En la Figura 29 se muestran los geles realizados mediante este procedimiento y la posición de las proteínas que se marcaron para su identificación. En general, la cantidad de manchas observadas en los extractos periplásmicos es considerablemente menor a la cantidad de proteínas identificadas en los mismos extractos mediante proteómica a gran escala. Sin duda, las manchas observadas en los geles bidimensionales corresponden a las proteínas mayoritarias de la fracción periplásmica. De hecho, se conoce que para el caso de *A. ferrooxidans* crecido en ión ferroso la proteína periplásmica rusticianina corresponde al 5 % de la proteína total.

La cuantificación de las manchas se llevó a cabo utilizando el software Delta 2D. Se comparó la intensidad relativa de cada mancha en los geles provenientes de las muestras de periplasma de tiosulfato v/s periplasma de ión ferroso y de las muestras de periplasma de azufre elemental v/s periplasma de ión ferroso. En total se identificaron 21 manchas mediante análisis de secuencia por espectrometría de masas (Tabla 12).

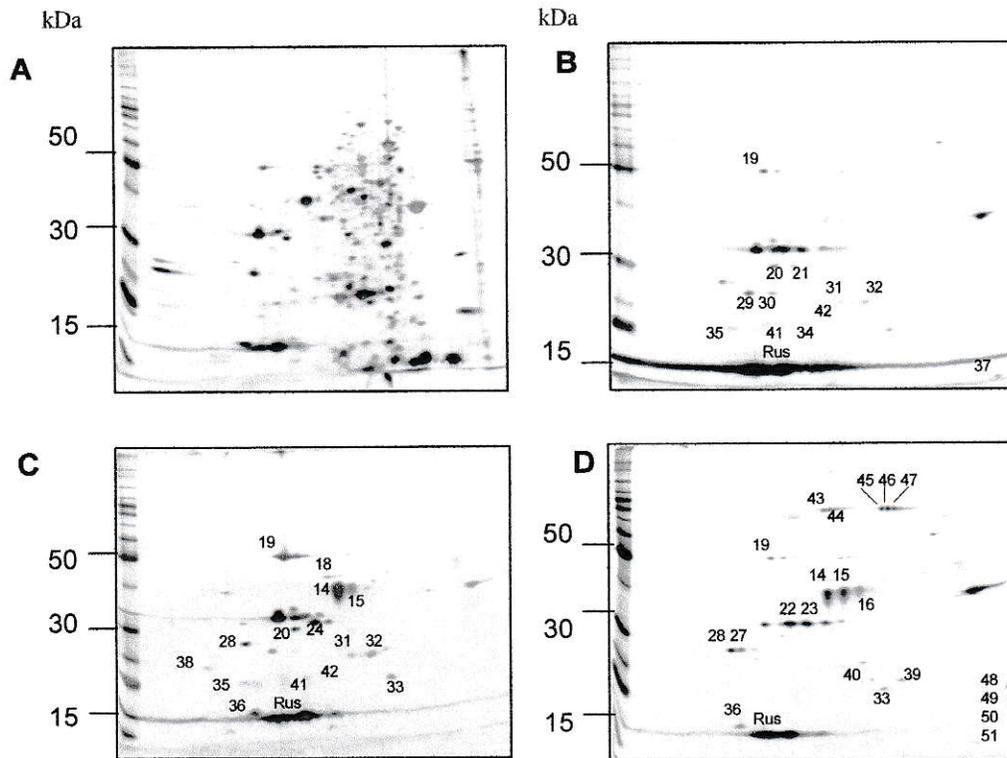


Figura 29. Separación de proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mediante 2D-PAGE. Electroforesis bidimensional de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato (A, C), ión ferroso (B) y azufre elemental (D). Las proteínas totales (A) y proteínas periplásmicas (B,C,D) obtenidas de células crecidas en las diferentes condiciones de crecimiento, se separaron mediante 2D-NEPHGE con un gradiente de pH 3,0 (derecha del gel) a 10 (izquierda del gel). Las proteínas se detectaron mediante tinción de los geles con nitrato de plata.

Tabla 12. Análisis diferencial e identificación de las proteínas presentes en los extractos periplásmicos de *A. ferrooxidans* crecido en diferentes fuentes de energía.

Mancha	AFO	AFE	Proteína	PM (kDa)	pI	Razón T/I	Razón S/I
14	832	560	outer membrane protein, OMPP1-FadL-TodX family	47	8,59	7,778	1,18
15	4277	2957	tol-pal system beta propeller repeat protein TolB (tolB)	45,5	8,76	7,642	3,887
18	4334	2994	hypothetical protein	49,8	9,1	89,3	3,324
19	4336	2996	outer membrane protein	55	8,93	5,047	1,284
20	3502	2438	cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	33,5	8,85	1,297	0,197
22	1673	1151	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS (pstS-2)	38,4	9,3	0,814	0,832
23	1673	1151	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS (pstS-2)	38,4	9,3	0,315	1,357
24	4306	2975	periplasmic solute-binding protein, putative	36,6	8,73	∞	ND
27	2275	1586	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative	37,3	9,18	0,62	7,102
28	2275	1586	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative	37,3	9,18	1,551	3,054
29	3617	2516	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type	28	9,24	0,703	0,064
30	3617	2516	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type	28	9,24	0,18	0,114
31	4314	2982	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	29,7	6,35	1,689	0,389
32	4314	2982	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	29,7	6,35	2,087	0,074
36	1450		Putative sterol carrier protein (<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259)	20,5	9,40	3,541	8,02
40	1727	1188	superoxide dismutase (sod) [1,15,1,1]	22,9	6,05	0	3,012

41	4142	2865	toluene tolerance protein, putative	23,5	9,33	1,621	0,715
42	1442	981	conserved hypothetical protein	24,2	8,92	2,035	0
44	263	174	TonB-dependent receptor	86,9	9,19	ND	19,1
45	1538	1054	TonB-dependent receptor	85,3	6,53	ND	∞
47	1538	1054	TonB-dependent receptor	85,3	6,53	ND	24,9

Los nombres de las proteínas corresponden a los asignados por el TIGR. AFO, marco abierto de lectura obtenido a partir del análisis de la secuencia completa del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. AFE, proteínas predichas desde "TIGR- Comprehensive Microbial Resource". PM, peso molecular; pI, punto isoeléctrico, Razón T/I, volumen relativo con respecto a todas las manchas en el gel desde tiosulfato/volumen relativo con respecto a todas las manchas en el gel desde ión ferroso, Razón S/I, volumen relativo con respecto a todas las manchas en el gel desde azufre/volumen relativo con respecto a todas las manchas en el gel desde ión ferroso.

4. DISCUSIÓN

4.1 Oxidación de tiosulfato por *A. ferrooxidans*.

4.1.1. Análisis de la participación de la proteína P21 en un complejo multiproteico.

Durante la oxidación de la pirita y de otros compuestos azufrados por *A. ferrooxidans* se genera tiosulfato como uno de los principales intermediarios (Schippers y Sand, 1999). En los microorganismos existen diferentes vías de oxidación del tiosulfato y en el caso de *A. ferrooxidans* se ha postulado que éste puede ser oxidado mediante la acción de dos actividades enzimáticas encontradas en extractos crudos. Una de éstas es la tiosulfato azufre transferasa (TST), una proteína de la familia rodanasa que participa en la transferencia del azufre sulfano del tiosulfato al cianuro. Tabita y col. (1969) comunicaron la purificación parcial de una rodanasa de *A. ferrooxidans*, que presenta una actividad azufre transferasa óptima en un rango de pH de 7,5 a 9,0. Por otro lado, Gardner y Rawlings (2000) detectaron una actividad TST en células enteras y extractos crudos libres de células de *A. ferrooxidans* y otros quimiolitótrofos oxidadores de azufre como *A. thiooxidans* y *A. caldus*. Esta actividad no se encontró en *L. ferrooxidans*, un quimiolitótrofo capaz de oxidar ión ferroso o el hierro presente en la pirita, pero no el azufre contenido en el mineral (Schippers y Sand, 1999; Sand y col., 2001). Hasta el momento no se conocen la(s) proteína(s) responsables de

la actividad TST detectada en *A. ferrooxidans*. Recientemente nuestro laboratorio comunicó la existencia de una proteína con similitud a una tiosulfato azufre transferasa, ubicada en la periferia de las células, cuya síntesis se regula dependiendo de la naturaleza del sustrato oxidable. Al respecto se encontró que los niveles de esta proteína, denominada P21, aumentaban fuertemente en células crecidas en compuestos reducidos de azufre en comparación a las células crecidas en ión ferroso (Ramírez y col., 2002). Adicionalmente, resultados obtenidos mediante macroarreglos de DNA demostraron el mismo comportamiento a nivel transcripcional (Acosta y col., 2005). No fue posible detectar actividad TST para la proteína recombinante pura, por lo que posiblemente P21 no sea responsable por sí sola de la actividad TST detectada en *A. ferrooxidans* (Ramírez y col., 2002). Es probable que la oxidación de tiosulfato se lleve a cabo mediante la acción de un complejo de proteínas tal como sucede en otros microorganismos quimiolitotrofos que poseen un complejo de proteínas ubicado en el periplasma encargado de la oxidación completa del tiosulfato a sulfato, el cual se conoce como sistema Sox. En el caso de *A. ferrooxidans*, la detección en el medio de cultivo de intermediarios de compuestos de azufre parcialmente oxidados sugiere que el mecanismo es diferente al modelo que involucra las proteínas Sox propuesto para la oxidación del tiosulfato en otros microorganismos, lo cual está apoyado por el hecho que no se encontraron genes que codifican proteínas con similitud a proteínas Sox en

la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Ramírez y col., 2004).

Durante esta Tesis se analizó la posible participación de P21 en un complejo multiproteico y se encontró que efectivamente a pH ácido la proteína P21 se encontraría asociada al menos con otras cuatro proteínas. Estas proteínas corresponden a una peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa, PPIC (PPIasa) (AFO 3617), a una proteína de unión a soluto periplásmica (AFO 4312), a una proteína de membrana externa (AFO 4336) y a una proteína desconocida con una señal de exportación Tat (AFO 4314). Tanto estas proteínas como la P21 se encontraron en la fracción periplásmica de *A. ferrooxidans*.

Se ha demostrado que las PPIasas participan en el plegamiento de proteínas en el periplasma. Estas facilitan la isomerización cis-trans de residuos de prolina tanto *in vitro* como *in vivo* (Fischer y col., 1998; Matouscheck y col., 1995) y se conoce que éste es uno de los pasos limitantes en el plegamiento de las proteínas. El AFO 3617 es una proteína que posee un dominio PPIasa. Sin embargo, la proteína completa no posee similitud a otras proteínas conocidas de la base de datos. Por otro lado, mediante un análisis proteómico del periplasma de *A. ferrooxidans* se demostró que esta proteína tiene ubicación periplásmica, pero sus niveles no se encontraron aumentados en las células crecidas en azufre o tiosulfato en comparación con las células crecidas en ión ferroso, sugiriendo que esta proteína podría cumplir una función accesoria dentro del complejo o bien,

que se asocia transientemente sólo para garantizar el correcto plegamiento de las otras proteínas encontradas.

El AFO 4312 corresponde a una proteína previamente identificada como una proteína de unión a tiosulfato/sulfato/molibdato de 33 kDa (ModA1) cuyos niveles de expresión son mayores en células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato en comparación a células crecidas en ión ferroso (Ramírez, 2000). De acuerdo a nuestros resultados de estudios proteómicos esta proteína se ubicó en el periplasma y sus niveles de expresión fueron mayores en células de *A. ferrooxidans* crecidas tanto en tiosulfato como en azufre en comparación con ión ferroso.

El AFO 4336 corresponde a una proteína previamente identificada como una proteína de membrana externa de 54 kDa que se induce en azufre, pirita y tiosulfato en *A. ferrooxidans* MSR (Bounfiglio y col., 1999). Esta proteína tiene similitud a una quinoproteína deshidrogenasa de *Picrophilus torridus* y también tiene un motivo PQQ que ha sido encontrado en algunas enzimas que utilizan pirrol-quinolina quinona como grupo prostético. Las quinoproteínas forman una clase de enzimas las cuáles usan quinona como cofactor para la oxidación de una amplia variedad de alcoholes y aminas (Oubrie y Dijkstra, 2000). Recientemente Kanao y col. (2006) identificaron a esta proteína (GI: 112982645) como la responsable de la actividad tetrionato hidrolasa de *A. ferrooxidans* y por lo tanto, estaría relacionada directamente con la oxidación de tiosulfato en este microorganismo. El análisis del periplasma de *A. ferrooxidans* indica que ésta corresponde a una

proteína periplásmica cuyos niveles de expresión aumentan más de cinco veces en las células crecidas en tiosulfato en comparación con las células crecidas en ión ferroso.

Finalmente, la proteína AFO 4314 no tiene similitud con proteínas conocidas en la base de datos. Sin embargo, la existencia de un péptido señal Tat es común en proteínas que forman complejos multiproteicos (Rodrigue y col., 1999). Además, mediante estudios proteómicos del periplasma de *A. ferrooxidans* comprobamos que el nivel de expresión de esta proteína es mayor en células crecidas en tiosulfato en comparación a células crecidas en ión ferroso. Cabe destacar que tanto esta proteína como las proteínas P21 y ModA1 se encuentran codificadas por genes localizados adyacentes en el genoma de *A. ferrooxidans*, y mediante ensayos de RT-PCR, comprobamos que al menos P21 y ModA1 forman parte de una misma unidad transcripcional. Este operón estaría compuesto también de un gen que codifica para una proteína con homología a una tiosulfato quinona oxidoreductasa (DoxDA1). Esta proteína podría tener un papel importante en la oxidación de azufre y tiosulfato ya que correspondería a una posible tiosulfato deshidrogenasa encargada de oxidar el tiosulfato a tetracionato.

Estos resultados demuestran que la proteína P21 estaría asociada en el periplasma a un grupo de proteínas que podrían cumplir un papel relevante durante la oxidación de compuestos azufrados por *A. ferrooxidans*. En efecto, casi todas las proteínas que estarían formando parte de este complejo se inducen en tiosulfato. Sin embargo, aun queda por descubrir el papel de P21

en la oxidación de azufre elemental y de pirita, ya que aunque los niveles de la P21 son mayores en células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato en comparación con las células crecidas en ión ferroso, los niveles de expresión de esta proteína son mayores en las células crecidas en sustratos sólidos como el azufre elemental y la pirita en comparación a las células crecidas en tiosulfato (Ramírez y col., 2002). En futuros trabajos, será importante además comprobar la funcionalidad de este complejo y medir las actividades tiosulfato azufre transferasa, tetrionato hidrolasa y tiosulfato quinona oxidoreductasa de las proteínas encontradas.

4.1.2. Actividad tiosulfato deshidrogenasa en *A. ferrooxidans*.

Una de las proteínas codificadas en el operón en que se encuentra P21 tiene similitud con la tiosulfato quinona oxidoreductasa (TQO) de *A. ambivalens*. Esta enzima sería responsable de oxidar tiosulfato a tetrionato en este microorganismo. La TQO es una tiosulfato deshidrogenasa (TD) que a diferencia de otras TD descritas se encuentra inserta en la membrana. Esta enzima puede utilizar tanto el ferricianuro como una decilubiquinona como aceptor de electrones. Está compuesta de dos subunidades, DoxD y DoxA, que se encuentran codificadas en una unidad transcripcional (Müller y col., 2004).

En *A. ferrooxidans* se encontró dos posibles TQO. A diferencia de la TQO de *A. ambivalens*, en las TQO de *A. ferrooxidans* ambas subunidades (DoxD y DoxA) se encuentran fusionadas y por lo tanto se encuentran

codificadas en el mismo gen (*doxDA*). *A. ferrooxidans* posee dos copias del gen *doxDA*. Tal como lo comunicó recientemente Friedrich y col. (2005) aún no se conoce cuál sería el significado de esta duplicación en la oxidación de tiosulfato por *A. ferrooxidans*. Nuestros resultados indican que la expresión de *doxDA1* y *doxDA2*, determinada mediante PCR en tiempo real, es mayor en células crecidas en azufre y tiosulfato en comparación con células crecidas en ión ferroso. Un comportamiento similar fue observado para *doxDA1* mediante macroarreglos de DNA (Acosta y col., 2005). La expresión de los genes *doxDA* puede ser de particular importancia durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en pirita, ya que en estas condiciones se encontraron niveles mucho mayores de los transcritos. En concordancia con este resultado, se sabe que el tiosulfato es uno de los principales intermediarios en la oxidación de la pirita (Schippers y Sand, 1999).

Como se mencionó anteriormente, *doxDA1* forma parte de la misma unidad transcripcional en la que se encuentra codificada la proteína P21. El gen que codifica para *DoxDA2* también se encuentra en el contexto génico del gen *p21*, pero en la dirección opuesta y similar al caso de *doxDA1*, se ubica río abajo de un gen que codifica para una proteína de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato (*modA2*). El análisis de la fracción periplásmica de *A. ferrooxidans* mediante 2D-PAGE y proteómica a gran escala demostró que *ModA2* correspondería a una proteína periplásmica cuyos niveles de expresión son más altos en células crecidas en tiosulfato que en células

crecidas en ión ferroso. Sin embargo, tal como se demostró mediante experimentos de RT-PCR, los genes *doxDA2* y *modA2* no se cotranscriben.

Silver y Lundgren (1968) comunicaron una actividad TD en extractos proteicos totales de células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre. En el caso de otros microorganismos, como *A. thiooxidans*, se había comunicado que esta actividad se encontraba en la fracción periplásmica (Nakamura y col., 2001). Sin embargo, en la arquea *A. ambivalens* se encontró que la actividad TD estaba asociada a la fracción de membrana. En este caso la actividad TD es producto de la expresión de la proteína DoxDA, la cual transfiere los electrones provenientes del tiosulfato al reservorio de quinonas (Müller y col., 2004). Al respecto, nuestros estudios demostraron que la actividad TD también está presente en extractos proteicos totales de células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato y hierro. Además, para todas estas condiciones de crecimiento se encontró actividad TD asociada a la fracción periplásmica. En las células crecidas en tiosulfato se detectó también actividad TD asociada a la fracción de membrana, lo cual no ha sido comunicado anteriormente en *A. ferrooxidans*. La expresión de una o las dos proteínas DoxDA encontradas en *A. ferrooxidans* podría dar cuenta de la actividad TD asociada a la fracción de membrana. Por otro lado, se ha demostrado que células de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crecidas en azufre o ión ferroso catalizan la transferencia de electrones desde el tiosulfato a quinonas exógenas, y se encontró que esta actividad es aproximadamente 20

veces mayor en células crecidas en azufre en comparación con células crecidas en ión ferroso (Brasseur y col., 2004).

Tanto la expresión de los genes *doxDA* como la actividad asociada a membrana y el antecedente previo que *A. ferrooxidans* posee una actividad TQO dependiente de la fuente de energía del medio de crecimiento, sugiere que estas proteínas son funcionales y que pueden estar cumpliendo un papel relevante durante la oxidación de tiosulfato y de pirita por *A. ferrooxidans*. Para relacionar directamente a las proteínas DoxDA con la actividad TD detectada *in vitro* será necesario purificar las proteínas y medir su actividad. Sin embargo, nuestros intentos para expresar estas proteínas en un sistema heterólogo, como *Escherichia coli*, fueron infructuosos. Se ha documentado que en general, la expresión de proteínas de membrana tiene un gran porcentaje de fracasos, pero aun no se conoce con exactitud a que se puede deber (Pizza y col., 2000).

Los resultados descritos en esta Tesis demuestran que P21 y las proteínas DoxDA1, DoxDA2, ModA1 y ModA2, codificadas adyacentes en el genoma de *A. ferrooxidans*, tienen niveles de expresión mayores en células crecidas en tiosulfato que en células crecidas en ión ferroso. Algunas de estas proteínas, junto a una posible tetrionato hidrolasa, estarían formando parte de un complejo de oxidación de tiosulfato hasta sulfato en el periplasma (Figura 30) lo cual sugiere que desempeñan funciones relevantes durante la oxidación de tiosulfato y/o de compuestos reducidos de azufre por

A. ferrooxidans. Evidentemente el determinar la función de cada uno de estos componentes requerirá una gran cantidad de trabajo futuro.

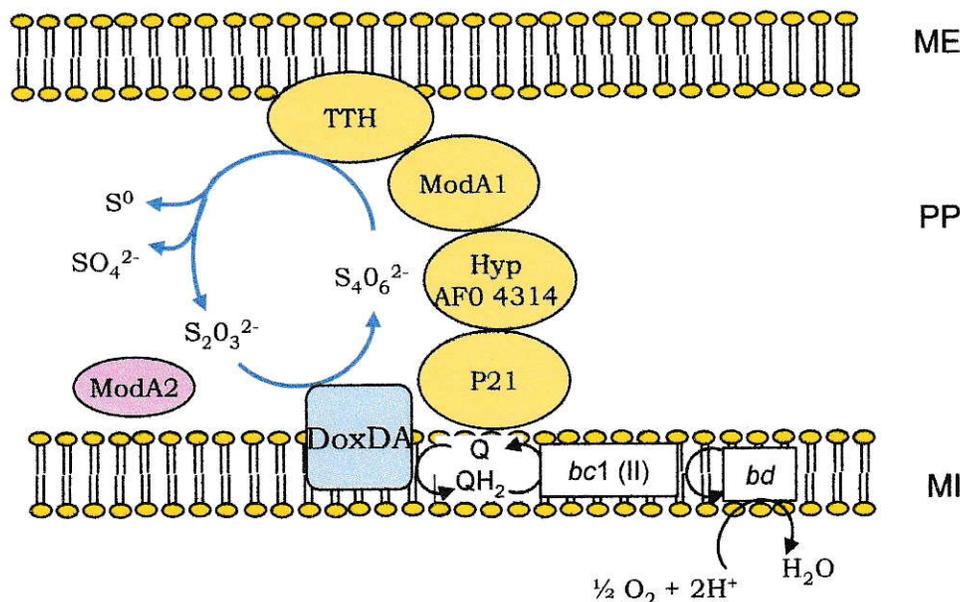


Figura 30. Modelo para la oxidación del tiosulfato en *A. ferrooxidans*. El tiosulfato sería oxidado a sulfato debido a la acción de varias proteínas, de las cuáles cuatro estarían formando un complejo en el periplasma capaz de conectar las actividades catalíticas de la enzima tiosulfato deshidrogenasa (DoxDA1 o DoxDA2), que oxida el tiosulfato a tetratiónato, y de la enzima tetratiónato hidrolasa (TTH) que oxida el tetratiónato a sulfato. Aunque la proteína ModA2 no se encontró asociada al complejo, su nivel de expresión sugiere que tendría una participación relevante durante el crecimiento de la bacteria en tiosulfato. ModA1, proteína de unión a tiosulfato/sulfato/molibdato; AFO 4314, marco abierto de lectura n° 4314 en la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans*; P21, posible tiosulfato azufre transferasa. ME, membrana externa; PP, periplasma; MI: membrana interna.

4.2 Estudios proteómicos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Anteriormente se utilizó 2D-PAGE para estudiar cambios en la expresión de proteínas de *A. ferrooxidans* crecido en diferentes condiciones. De esta manera se identificaron proteínas inducidas en estrés por calor (Varela y Jerez, 1992), pH (Amaro y col., 1991), limitación de fosfato (Seeger y Jerez, 1993; Vera y col., 2003) o presencia de cobre (Novo y col., 2003). Con el fin de obtener más información acerca del metabolismo de compuestos azufrados en *A. ferrooxidans*, se analizaron los cambios en la expresión de proteínas en los extractos proteicos totales y los extractos periplásmicos de células crecidas en tiosulfato, azufre e ión ferroso mediante proteómica convencional 2D-PAGE y proteómica a gran escala. A partir de estos análisis recopilamos una gran cantidad de información que fue analizada exhaustivamente mediante herramientas bioinformáticas. Algunas de las proteínas identificadas se conocían previamente, pero la gran mayoría no se habían descrito en *A. ferrooxidans*, por lo cual se hizo un análisis de éstas de acuerdo a lo que se encuentra comunicado en la literatura para otros microorganismos.

4.2.1. Análisis de los extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans*

Mediante análisis proteómicos de extractos totales de *A. ferrooxidans* por 2D-PAGE, además de la posible tiosulfato azufre transferasa (P21) y la proteína de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato (ModA1) identificadas

previamente, se identificaron otras dos proteínas cuyo nivel de síntesis fue mayor en células crecidas en azufre en comparación con células crecidas en ión ferroso: una posible proteína de exportación de polisacárido de 45 kDa (WcbC) y una proteína de 16 kDa, con similitud a una posible proteína de transporte de esteroides no caracterizada de *Thiobacillus denitrificans* (Ramírez y col., 2004). La proteína con similitud a WcbC formaría parte de un sistema de exportación de polisacárido. En *A. ferrooxidans*, ésta proteína es codificada por el gen *wcbC*, cuyo contexto incluye los genes *wcbD*, *wzm* y *wzt* que codifican para las otras proteínas del sistema de exportación de polisacárido descrito en otros microorganismos (Figura 31) (De Shazer y col., 2001). Es conocido que muchas bacterias lixiviantes crecen adheridas a la superficie de los sustratos sólidos como azufre elemental o sulfuros metálicos. Esta adherencia se lleva a cabo principalmente mediante una sustancia polimérica extracelular que rodea a las células (EPS) que varía dependiendo de la condición de crecimiento (Rohwerder y col., 2003). En efecto, células planctónicas que crecen utilizando sustratos solubles como ión ferroso prácticamente no producen EPS (Gehrke y col., 1998, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que en *A. ferrooxidans* se expresan genes que codifican para proteínas que sintetizan precursores de EPS (Barreto y col., 2005).

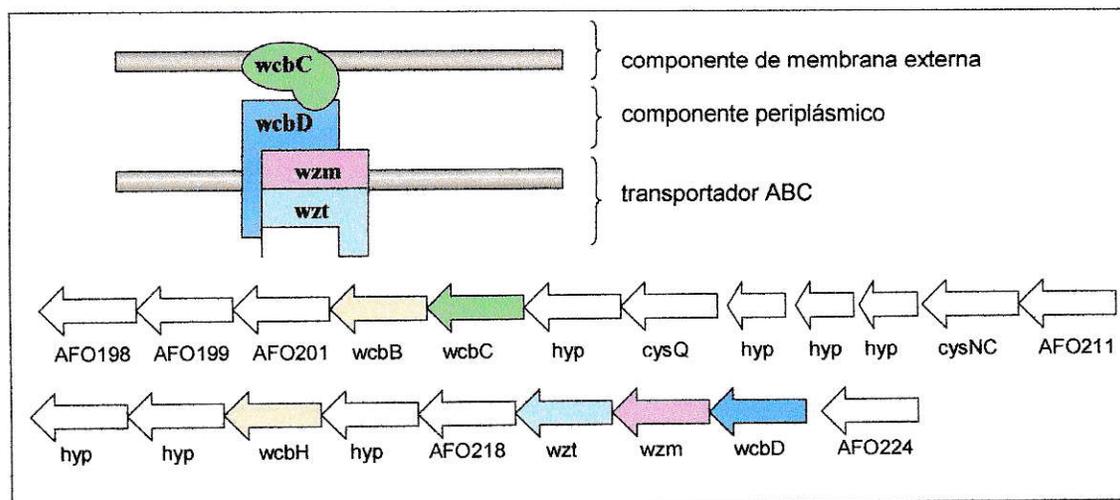


Figura 31. Representación esquemática de un sistema putativo de exportación de polisacárido en *A. ferrooxidans*. Las flechas indica la ubicación de los genes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En colores se indican los genes esenciales del sistema de transporte.

La proteína de 16 kDa (AFO 1450) tiene similitud con una proteína no caracterizada de *T. denitrificans* que posee un dominio involucrado en unión de esteroides. Mediante proteómica a gran escala utilizando LCQ/MS también se detectó que esta proteína es abundante en células crecidas en azufre y tiosulfato comparado con células crecidas en ión ferroso. Por otro lado, esta proteína posee un péptido señal tipo Sec y se identificó en las fracciones periplásmicas de *A. ferrooxidans* provenientes de cultivos en azufre, tiosulfato e ión ferroso. El análisis diferencial de las fracciones periplásmicas demostró que los niveles de esta proteína están altamente aumentados en células crecidas en azufre y tiosulfato respecto de lo encontrado en células crecidas en ión ferroso. Esto sugiere que esta proteína no identificada previamente en

A. ferrooxidans podría cumplir un papel relevante durante el crecimiento de la bacteria en compuestos de azufre parcialmente oxidados.

Mediante el análisis proteómico a gran escala de extractos totales de *A. ferrooxidans* se encontró que efectivamente todas las proteínas pertenecientes al operón de P21 tienen niveles de expresión mayores en células crecidas en azufre y tiosulfato en comparación con células crecidas en ión ferroso. De esta manera quedó demostrado que el nivel de expresión de DoxDA1, una de las dos posibles proteínas TQO, es mayor en células crecidas en compuestos de azufre reducido en relación con células crecidas en ión ferroso, tal como sucede en el caso de ModA1 y P21. Otra proteína cuyos niveles encontramos aumentados en células crecidas en azufre y tiosulfato en comparación con ión ferroso es Iro oxidasa o HiPIP (Tabla 7). El gen que codifica para esta proteína se ubica en el operón *petII*, que codifica también para un complejo *bc1* y para un citocromo *c* (CycA). Previamente, Quatrini y col. (2006) demostraron mediante análisis por PCR en tiempo real que el transcrito de HiPIP es más abundante en células crecidas en azufre que en células crecidas en ión ferroso, y se sugirió que puede participar durante la oxidación de azufre transfiriendo los electrones entre el complejo *bc1* y la oxidasa terminal. Los mismos estudios indicaron que a nivel transcripcional, los niveles de CoxA, una subunidad de la citocromo oxidasa CoxABCD son mayores en células crecidas en ión ferroso, lo que coincide con el nivel de expresión de los otros genes del operón. Sin embargo, mediante análisis proteómicos nosotros encontramos que células crecidas en azufre

poseen niveles más elevados de CoxA que células crecidas en ión ferroso (Tabla 7). Por lo tanto, se requieren mayores estudios para cuantificar los niveles de expresión de esta proteína en diferentes condiciones de crecimiento y de esta manera inferir la función que estaría cumpliendo CoxA durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en azufre. Además, identificamos otra proteína cuyos niveles se encontraron aumentados en células crecidas en azufre y tiosulfato en comparación con ión ferroso. Ésta correspondería a una sulfuro quinona oxidoreductasa (SQR) la que fue descrita por primera vez en *A. ferrooxidans* NASF-1 por Wakai y col. (2004). En este trabajo, los autores indicaron que a nivel transcripcional los niveles del transcrito correspondiente serían 3 veces mayores en células crecidas en azufre comparado a los niveles detectados en células crecidas en ión ferroso.

Análisis proteómicos mediante FT-ICR MS permitieron identificar otro grupo de proteínas que poseen niveles de expresión más elevados en células crecidas en azufre en comparación con células crecidas en tiosulfato o en ión ferroso. Éstas fueron identificadas como TrbB, TrbE, trbJ, TrbF y TrbL. Estas proteínas tienen similitud a las proteínas del mismo nombre pertenecientes al sistema de secreción tipo IV (SSIV), Trb de *Agrobacterium tumefaciens*. El SSIV presenta gran variabilidad de funciones entre las que se encuentran la formación de biopelículas y/o el intercambio de macromoléculas como DNA o complejos DNA-proteína (Yeo y Waksman, 2004; Covacci y col., 1999). Durante el proceso de biolixiviación la formación de biopelículas favorece la interacción de las bacterias con el mineral, por lo que es probable que estas

proteínas se encuentren relacionadas con la capacidad de adherencia que poseen las células crecidas en azufre. En efecto, a pesar que se trabajó con las células planctónicas de cultivos de azufre en perlas, se encontró diferencias en la expresión de proteínas que pueden desempeñar un papel relevante durante la adherencia, tal como la proteína de exportación de polisacárido, WcbC. Tanto el número como la organización de los genes *trb* de *A. ferrooxidans* son muy similares a los comunicados para *Helicobacter pylori*, uno de los pocos sistemas de secreción tipo IV caracterizados, y que se conoce participa en la secreción de proteínas (Tanaka y col., 2003). En *A. ferrooxidans*, los genes *trb* se encuentran agrupados en dos regiones del genoma sugiriendo que podrían transcribirse como dos unidades transcripcionales (Barreto y col., 2003). Sin embargo, experimentos de RT-PCR desarrollados en esta Tesis demostraron que los genes *trbB*, *trbF* y *trbJ* no se cotranscriben. Mediante PCR en tiempo real y macroarreglos de DNA se encontró que a nivel transcripcional los niveles de expresión de estos genes también fueron mayores en células crecidas en azufre en comparación con células crecidas en ión ferroso (Valenzuela y col., 2006). Aunque no está claro que función puede estar cumpliendo este sistema en *A. ferrooxidans*, es probable que se encuentre relacionado con la formación de biopelículas y el intercambio de macromoléculas. A raíz de estos resultados nuestro laboratorio ha comenzado una nueva línea de investigación que pretende determinar la funcionalidad de este sistema en *A. ferrooxidans*.

Otra proteína con niveles de expresión mayores en células crecidas en azufre comparado a células crecidas en tiosulfato e ión ferroso es una tercera proteína de unión a sustrato de la familia ModA. Esta proteína se denominó ModA3 (AFO 2275) y se encontró presente también en fracciones periplásmicas de células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre, tiosulfato e ión ferroso. Mediante geles 2D-PAGE, se encontraron dos formas para esta proteína que difieren en su punto isoeléctrico. Una de ellas, muestra niveles muy superiores en azufre con respecto a lo encontrado en tiosulfato e ión ferroso, mientras que la otra forma presenta niveles de expresión similares tanto en azufre y tiosulfato.

4.2.2. Análisis de extractos de proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans*.

Mediante el análisis proteómico a gran escala por FT-ICR MS de extractos periplásmicos de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato, se identificaron 130 proteínas. Tal como se esperaba, muchas de éstas poseen una señal de exportación tipo Sec o Tat. Sin embargo, un 13.8 % de ellas no poseen ningún tipo de señal de acuerdo a las herramientas de predicción utilizadas en este estudio. Aunque se conoce que algunas proteínas que son exportadas no poseen una señal de exportación típica, la identificación de algunas proteínas ribosomales, el factor de elongación EF-Tu y algunos componentes del carboxisoma y de algunas otras proteínas típicamente citoplásmicas, sugiere que la presencia de estas proteínas en la fracción

periplásmica puede deberse también a un cierto grado de lisis durante la preparación de los extractos.

Casi el 50 % de las proteínas identificadas corresponderían a precursores de proteínas de membrana externa relacionadas con la envoltura celular, a proteínas que catalizan el plegamiento, a proteínas de transporte y unión y a proteínas relacionadas con el metabolismo energético. Por otro lado, un 36 % corresponde a proteínas de función desconocida.

El análisis de los puntos isoeléctricos de las proteínas identificadas muestra claramente que la mayor parte de las proteínas encontradas en la fracción periplásmica (70,8 %) tienen un pI mayor a 7,0 y sólo el 29,2 % de las proteínas tienen un pI bajo 7,0. Esta distribución es completamente diferente a lo encontrado en el caso de las proteínas periplásmicas de *E. coli* y *Synechocystis* sp., en las que más del 50% tienen pI bajo 7,0 (Rey y col., 2005; Fulda y col., 2000). En *Helicobacter pylori*, una bacteria que también tolera un ambiente de alta acidez, se ha demostrado que muchas de las proteínas encontradas en el espacio periplásmico y en la membrana celular tienen puntos isoeléctricos más alcalinos al compararlas con las proteínas de microorganismos neutrófilos. El carácter básico de estas proteínas podría conferirle a la bacteria la capacidad de retardar el flujo de protones dentro del espacio periplásmico (Scott y col., 1998). Una situación similar podría tener lugar en el caso de *A. ferrooxidans*. Además, mediante análisis bioinformáticos se demostró que la mayor parte de las proteínas básicas se encuentran en la fracción periplásmica, ya que la distribución de los puntos

isoelectricos de las proteínas citoplásmicas de *A. ferrooxidans* comparada con la observada para las proteínas de microorganismos neutrófilos, es muy similar. Por lo tanto, la presencia de un gran porcentaje de proteínas básicas en el periplasma de *A. ferrooxidans* (16,8 % de proteínas con pI sobre 10), puede responder a una adaptación de este microorganismo acidófilo, que le confiere un cierto grado de resistencia al ácido presente en su ambiente.

En nuestro estudio identificamos 101 proteínas de la fracción periplásmica de células crecidas en tiosulfato, que de acuerdo a las predicciones bioinformáticas posee algún tipo de señal de exportación. La mayor parte de estas proteínas se encuentran agrupadas principalmente como proteínas de envoltura, del metabolismo energético, de transporte y unión, de plegamiento y proteínas de función desconocida.

Además de las proteínas relacionadas con el metabolismo del tiosulfato descritas previamente, se obtuvo una gran cantidad de información respecto de otras proteínas expresadas durante las diferentes condiciones de crecimiento estudiadas, la cual se resume en la Tabla 13. A continuación se entrega una descripción de las posibles identidades de estas proteínas y de su posible función.

Tabla 13. Proteínas identificadas en los extractos periplásmicos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en diferentes sustratos energéticos.

AFO	AFE	Proteína	Hierro II	Azufre	Tiosulfato
Proteínas relacionadas con plegamiento					
117	75	survival protein SurA (<i>surA</i>)	-	x	x
3617	2516	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIC-type	x	x	x
3580	2493	thiol:disulfide interchange protein DsbD (<i>dsbD</i>)	-	-	x
243	162	thiol:disulfide interchange protein DsbG, putative	-	x	x
1767	1214	thiol:disulfide interchange protein, putative	-	x	-
1245	851	dsbG domain protein	-	-	x
3614	2514	carboxy-terminal peptidase (<i>ctpA</i>)	x	-	x
387	259	serine protease, DO-DeqQ family	x	x	x
2428	1685	serine protease, DO-DeqQ family	x	x	x
4373	3018	pilus chaperone protein, putative	x	-	x
Proteínas involucradas en la biogénesis de la envoltura celular					
824	555	glycine cleavage system H protein, putative	x	x	x
832	560	outer membrane protein, OMPP1-FadL-TodX family	x	x	x
3825	2654	outer membrane protein transport protein, OMPP1-FadL-TodX family	x	x	x
3826	2655	outer membrane lipoprotein carrier protein LolA, putative	x	x	x
2347	1632	outer membrane protein, OMP85 family	x	x	x
3709	2579	rare lipoprotein B, putative	x	x	x
Proteínas de membrana externa					
3918	2722	OmpA family protein	x	x	x
4269	2953	peptidoglycan-associated lipoprotein, putative	-	x	x
4336	2996	outer membrane protein	x	x	x
1134	783	outer membrane lipoprotein Slp, putative	x	x	x
3958	2748	lipoprotein, SmpA-OmlA family	x	x	x
3773	2621	pilin, putative	-	x	x
Proteínas de transporte y unión					
1673	1151	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS (<i>pstS2</i>)	x	x	x
2372	1648	phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein PstS (<i>pstS1</i>)	x	x	x
4505	3103	TonB-dependent receptor	x	x	x
263	174	TonB-dependent receptor	-	x	x
1538	1054	TonB-dependent receptor	-	x	x
1171	806	TonB-dependent receptor	-	x	-
1177	810	TonB-dependent receptor	-	x	-
2296	1601	TonB-dependent receptor	-	x	-
3537	2463	type I secretion outer membrane protein, TolC family	-	x	x
4277	2957	tol-pal system beta propeller repeat protein TolB (<i>tolB</i>)	x	x	x
2281	1590	iron compound ABC transporter, periplasmic iron-binding protein, putative	-	-	x
3502	2438	cation ABC transporter, periplasmic cation-binding protein, putative	x	x	x
1240	848	carbohydrate-selective porin, OprB family	-	x	x
1827	1256	toluene tolerance protein, putative	-	-	x
4142	2865	toluene tolerance protein, putative	x	x	x
4312	2981	periplasmic solute-binding protein, putative	x	x	x
4306	2975	periplasmic solute-binding protein, putative	x	-	x

2275	1586	ABC transporter, periplasmic substrate-binding protein, putative	x	x	x
675		Copper resistance protein CopC (<i>Burkholderia</i> sp. 383)	x	x	x
1450		Putative sterol carrier protein (<i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259)	x	x	x
Proteínas involucradas en metabolismo energético					
14	8	cytochrome c4 (cycA-1)	x	-	x
561	378	cytochrome c4 (cycA-2)	-	x	x
4620	3179	cytochrome c (cyc2)	x	x	x
4621	3180	cytochrome c552 (cyc1)	x	x	x
4627	3186	rusticyanin (rus)	x	x	x
551	373	iron oxidase (iro)	x	x	x
Proteínas a las que no se les puede asignar una función específica					
4271	2954	conserved hypothetical protein	x	x	x
1211	831	phosphoesterase family protein	-	x	x
1239	847	PQQ enzyme repeat domain protein	x	x	x
1442	981	conserved hypothetical protein	x	x	x
1443	982	vacJ lipoprotein	-	x	x
1678	1154	PQQ enzyme repeat domain protein	x	x	x
2019	1396	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein (Carboxysome structural protein CsoS2)	x	x	x
3754	2607	competence lipoprotein ComL, putative	-	x	x
3253	2266	phosphorylase, putative	x	-	x
3704	2576	Ycel-like family protein			
3816	2650	ErfK-YbiS-YcfS-YnhG family protein	-	-	x
4304	2974	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domainprotein	-	-	x
4314	2982	Tat (twin-arginine translocation) pathway signal sequence domain protein	x	x	x
4353	3006	LysM domain protein	x	-	x

4.2.2.1. *Proteínas relacionadas con plegamiento*

En general se conoce que algunas proteínas localizadas en el periplasma de las bacterias, participan en el ensamblaje de proteínas extracitoplásmicas y son facilitadores de la biogénesis de proteínas de membrana externa (OMP). Esos factores de plegamiento incluyen chaperonas, proteínas catalizadoras de plegamiento y proteasas. En el periplasma se encuentran dos tipos de proteínas catalizadoras de plegamiento: las disulfuro isomerasas y las cis-trans peptidil prolil

isomerasas (PPIasas) (Mogensen y Otzen, 2005). En nuestro estudio se identificaron dos probables PPIasas en el periplasma de *A. ferrooxidans* (AFOs 117 y 3617). Como se mencionó anteriormente, las PPIasas facilitan la isomerización cis-trans de residuos de prolina facilitando el plegamiento de las proteínas. El AFO 3617 es una proteína que se encontró presente en todas las condiciones de crecimiento (tiosulfato, azufre e ión ferroso) y que se encontró asociada a la proteína P21 en condiciones nativas. El AFO 117 se encontró no sólo en células crecidas en tiosulfato, sino también en células crecidas en azufre. Esta proteína tiene similitud con SurA, que además de ser una PPIasa, es una chaperona.

Las proteínas periplásmicas y las proteínas de membrana externa a menudo contienen enlaces disulfuro. Aunque los enlaces disulfuro se pueden formar espontáneamente en el ambiente oxidante del periplasma (Anfinsen y col., 1961), la formación de enlaces disulfuro es facilitada *in vivo* por un número de enzimas especializadas en el intercambio tiol-disulfuro, las cuáles están involucradas en la formación, isomerización y reducción de enlaces disulfuro. Todas esas oxidoreductasas comparten un motivo CXXC y una estructura terciaria conocida como plegamiento tipo tioredoxina (Martin, 1995). DsbC y DsbG son disulfuro isomerasas homodiméricas que corrigen los enlaces disulfuro formados incorrectamente (Bessette y col., 1999; McCarthy y col., 2000). Estas isomerasas son mantenidas en un estado reducido por la proteína DsbD, la que es regenerada por una tioredoxina reductasa citoplásmica (Bessette y col., 1999; Rietsch, 1997). Nosotros

encontramos una proteína con similitud a DsbD (AFO 3580) y una proteína con similitud a DsbG (AFO 243) en células crecidas en tiosulfato. Por otro lado, en células crecidas en azufre se encontró otra proteína con similitud a DsbG (AFO 1767), que parece ser única de esta condición de crecimiento. Sin embargo, nosotros encontramos otra proteína (AFO 1245) que posee un dominio DsbG pero que tiene un sitio activo similar al encontrado en SoxW, una tioredoxina involucrada en la transferencia de electrones a una proteína periplásmica desconocida que pertenece al sistema de oxidación de tiosulfato (Sox) durante el crecimiento litotrófico de *Paracoccus pantotrophus* en tiosulfato (Bardischewsky y col., 2006). Interesantemente, el AFO 1245 se expresó sólo en células crecidas en tiosulfato, no así en células crecidas en azufre o hierro. Por otro lado, ni en la fracción periplásmica ni en el análisis de la secuencia completa del genoma de *A. ferrooxidans* se encontraron proteínas con similitud a DsbC. Esto sugiere que las proteínas DsbG encontradas en las diferentes condiciones de crecimiento estarían cumpliendo un importante papel como disulfuro isomerasas periplásmicas en este microorganismo.

El AFO 3614 comparte similitud con la peptidasa carboxi-terminal (CtpA). Es bien conocido que muchas proteínas extracitoplásmicas son sintetizadas inicialmente como precursores y se procesan a la forma madura mediante el clivaje catalítico de péptidos cortos ubicados en el extremo amino-terminal o en el extremo carboxi-terminal. Las Ctps son serina proteasas que utilizan una diada catalítica Ser/Lys en lugar de la conocida

triada catalítica Ser/His/Asp (Paetzel y Dalbey, 1997). Adicionalmente, en *Brucella suis* el gen *ctpA* está involucrado en la protección de las células a la presión osmótica y determina la razón de crecimiento, el tamaño de la colonia, la morfología celular y la sobrevivencia intracelular durante la fase crónica de la infección (Bandara y col., 2005). La proteína AFO 3614 se identificó en la fracción periplásmica de células crecidas en tiosulfato e ión ferroso, pero no en células crecidas en azufre, por lo cual parece estar regulada dependiendo de la condición de crecimiento.

Los AFO 387 y 2428 representan dos posibles serina proteasas de la familia DO-DeqQ. Ellas son serina proteasas típicamente periplásmicas que contienen dominios PDZ en su extremo carboxi-terminal. Estas serina proteasas pertenecen a la familia de proteínas HtrA (Kim y Kim, 2005). Las proteínas HtrA bacterianas están involucradas en diferentes procesos metabólicos, las cuáles incluyen procesamiento de las proteínas (Cavard y col., 1989), modulación de la respuesta a diferentes señales (Alba y col., 2001), resistencia a estrés por calor (Lipinska y col., 1988; Li y col., 1996; Poquet y col., 2000; Wonderling y col., 2004) y virulencia (Baumler y col., 1994; Elzer y col., 1996, Jones y col., 2001, Yorgey y col., 2001). Las proteínas de la familia HtrA normalmente contienen dos dominios conservados, uno similar al dominio quimi tripsina-proteasa y al menos un dominio carboxi-terminal, PDZ. En *E. coli*, DegP, DegQ y DegS conforman la familia de proteínas HtrA. Esas tres proteasas comparten un alto grado de identidad dentro de la secuencia del dominio proteasa. Sin embargo, DegP y

DegQ poseen dos dominios PDZ (similar a lo encontrado para los AFOs 387 y 2428), mientras que DegS posee sólo uno. En contraste a la alta similitud en secuencia entre las proteínas homólogas a HtrA en varias especies, una región específica en el dominio proteasa muestra sólo un mínimo grado de identidad. Esta región en DegP es llamada el Q-linker (Wootton y Drummond, 1989). Estructuralmente el Q-linker se ubica entre las hoja β_1 y β_2 del dominio proteasa. El Q-linker de DegP posee aproximadamente 40 aminoácidos, mientras que el Q-linker de DegQ y de otras proteínas HtrA, es de sólo 20 aminoácidos. Analizando los Q-linker encontrados en las proteínas AFO 387 y AFO 2428 se encontró que tienen una longitud similar a lo reportado para DegP, lo que permite sugerir que AFO 387 y AFO 2428 pueden ser renombrados en la anotación del genoma como proteínas tipo DegP.

Inicialmente, en *E. coli*, HtrA/DegP se identificó como una proteína requerida para la sobrevivencia de la bacteria a altas temperaturas, o para la degradación de proteínas periplásmicas anormales (Lipinska y col., 1988; Strauch y Beckwith, 1988). Se ha propuesto que la función principal de DegP es la digestión de proteínas anormales dentro del espacio periplásmico. Adicionalmente a su actividad proteolítica, DegP posee también actividad como chaperona (Spiess y col., 1999). Además del AFO 387 y AFO 2428, el genoma de *A. ferrooxidans* posee otra proteína con similitud a serina proteasas de la familia DO-DeqQ (AFE 1439), sin embargo de acuerdo a nuestros resultados, esta proteína no se encontraría en el periplasma.

El AFO 4373 tiene similitud con una chaperona que participa en el ensamblaje del pili de las familias FimC y PapD. Las chaperonas de tipo PapD asocian y estabilizan la superficie de las subunidades hasta que ellas sean ensambladas en el pili (Sauer y col., 2000). Al respecto, se ha comunicado la presencia de algunos genes relacionados con la formación del pili (Barreto y col., 2003) así como la presencia de fimbrias y apéndices tipo pili en *A. ferrooxidans* (Dispirito y col., 1982). Aún queda por dilucidar por qué el AFO 4373 se encuentra sólo en la fracción periplásmica de células crecidas en tiosulfato e ión ferroso, y no en células crecidas en azufre.

4.2.2.2. Biogénesis de la envoltura celular

El AFO 3825 (Tabla 13) es una proteína con similitud a proteínas de membrana externa de la familia OMPP1/Fad/TodX, las cuáles están involucradas en la translocación de cadenas largas de ácidos grasos a través de la membrana externa y en el catabolismo de compuestos aromáticos (Kahng y col., 2000; Black y DiRusso, 2003). El AFO 832 también pertenece a la familia de proteínas OMP1/FadL/TodX y corresponde a la proteína OMP44 aislada previamente de geles bidimensionales (Ramírez y col., 2004). Los niveles de esta proteína se encuentran aumentados en células crecidas en azufre y de acuerdo al análisis diferencial de las proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* mediante 2D-PAGE sus niveles se encuentran también incrementados en células crecidas en tiosulfato comparado con células crecidas en ión ferroso (Tabla 12). El gen que codifica para el AFO 832 se

encuentra localizado cerca de un gen que codifica para una proteína con similitud a la proteína H de unión de lipoato del sistema de clivaje de la glicina (AFO 824) (Perham, 2000). Esta proteína también la encontramos en la fracción periplásmica de células de *A. ferrooxidans* crecido en los tres sustratos energéticos. En el contexto genético de esta proteína se encuentran marcos abiertos de lectura con similitud a otras proteínas relacionadas con el metabolismo del lipoato y un complejo heterodisulfuro reductasa. La función de estas proteínas es completamente desconocida en *A. ferrooxidans*.

Río abajo del gen que codifica para el AFO 3825 se ubica el gen que codifica para el AFO 3826, una proteína con similitud a LolA, que también se encontró en la fracción de proteínas periplásmicas de *A. ferrooxidans* en todas las condiciones de crecimiento. LolA es una chaperona periplásmica involucrada en el transporte de lipoproteínas a través de la envoltura celular (Bos y Tomasen, 2004). Después del transporte, vía el sistema Sec, las lipoproteínas se asocian al transportador-ABC, LolCDE. La energía proveniente de la hidrólisis de ATP por LolD es transferida a LolC y LolE y es entonces usada para abrir la cavidad hidrofóbica de LolA en la que se asocia la lipoproteína. Cuando el complejo LolA-lipoproteína interactúa con el receptor de membrana externa LolB, la lipoproteína es transferida a LolB y de esta manera es insertada en la membrana externa (Bos y Tomasen, 2004). Analizando la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 encontramos que se encuentran proteínas con similitud a LolB, LolC y LolD,

lo que sugiere que este sistema de transporte de lipoproteínas podría ser funcional en este microorganismo.

El AFO 2347 tiene similitud con proteínas de superficie de la familia OMP85. Estas proteínas están relacionadas a antígenos de superficie en muchas bacterias patógenas. Miembros de la familia OMP85 están involucrados en el ensamblaje de OMPs, LPS, glicolípidos y fosfolípidos (Gentle y col., 2005).

El AFO 3709 sería una lipoproteína que comparte similitud con RlpB de *E. coli*, y tal como ocurre en esta bacteria se encuentra codificada río abajo del gen que codifica para una leucil-tRNA sintetasa (LeuRS) y río arriba del gen que codifica para la subunidad HolA de la DNA polimerasa III (Takase y col., 1987). Recientemente se demostró que *rlpB* es un gen esencial en *E. coli* y forma un complejo con Imp (un homólogo de Skp), proteína que tiene gran importancia en la biogénesis de OMPs y que participa en el ensamblaje del LPS (Wu y col., 2006; Braun y Silhavy, 2002). El análisis del genoma de *A. ferrooxidans* muestra que existe un gen que codifica para una posible Imp, la cual estaría codificada en una región diferente. Esta proteína junto al AFO 3709, podrían participar en el ensamblaje del LPS en *A. ferrooxidans*.

La presencia de proteínas con similitud a LolA, SurA y OMP85 en la fracción periplásmica y la presencia de los genes que codifican para proteínas con similitud a LolB, LolC, LolD y Skp en el genoma de *A. ferrooxidans* sugiere que el mecanismo para el transporte de lipoproteínas desde la membrana interna a la membrana externa propuesto en la actualidad para

E. coli (Bos y Tomasen, 2004) podría ser operativo en este microorganismo acidófilo.

4.2.2.3. Proteínas de membrana externa (OMPs)

Las OMPs son sintetizadas en el citoplasma y son translocadas a través de la membrana interna y probablemente pasan por el periplasma antes de ser insertadas dentro de la membrana externa. El paso a través del periplasma involucra algunos cambios debido a la naturaleza hidrofóbica de las OMPs (Mogensen y Otzen, 2005). En las fracciones periplásmicas se encontraron algunos precursores de proteínas de membrana externa. En general, estas proteínas se han identificado como adhesinas, proteínas estructurales, poros de difusión pasiva, receptores de sideróforos, canales de eflujo, poros para la traslocación de proteínas y enzimas (ej. lipasas, proteasas y palmitoil-transferasas), lo cual da cuenta de una gran diversidad funcional (Mogensen y Otzen, 2005).

El AFO 3918 correspondería a una proteína de membrana externa FopA del tipo OmpA, previamente identificada como la principal proteína regulada por NaCl de *A. ferrooxidans* NASF-1 (Kamimura y col., 2003). Otra proteína encontrada en el periplasma con similitud a lipoproteínas de la familia OmpA es el AFO 4269. Las proteínas de esta familia mantienen la integridad de la envoltura celular actuando como puentes físicos entre la membrana externa y el péptidoglicano (Koebnik y col., 2000). Río abajo del gen que codifica para el AFO 4269 se encuentra codificada una proteína

desconocida, pero conservada en otros microorganismos, que también se encontró en las fracciones de periplasma de *A. ferrooxidans* y que posee un péptido señal Sec (AFO 4271)

El AFO 4336 ya lo describimos, pues se identificó como una proteína asociada a la proteína P21 en condiciones nativas. Esta proteína fue descrita por Buonfiglio y col. (1999) como una proteína de membrana externa que se induce en azufre. Efectivamente, encontramos que el nivel de expresión de esta proteína es mayor en células crecidas en azufre en comparación con células crecidas en ión ferroso y su nivel de expresión es aun mayor en las células crecidas en tiosulfato.

El AFO 1134 sería una proteína de membrana externa con similitud a proteínas de la familia Slp. Se conoce que en *E. coli* Slp corresponde a una proteína de la membrana externa que se expresa en respuesta a la carencia de carbono.

El AFO 3958 tiene similitud con proteínas de membrana externa de la familia SmpA/OmlA y está posiblemente involucrada en el mantenimiento de la integridad estructural de la envoltura celular. Tal como sucede en el caso del gen *omlA* de *Pseudomonas aeruginosa*, el AFO 3958 está codificado divergente a un gen *fur* putativo (AFE 2747) (Quatrini y col., 2005).

El AFO 3773 tiene una secuencia N-terminal corta, que se ha descrito dirige la metilación de un residuo de fenilalanina conservado que a menudo se encuentra en el extremo amino-terminal de pilinas y otras proteínas involucradas en secreción. Sin embargo, la proteína completa no tiene

homólogos conocidos en la base de datos del NCBI. Esta proteína se encontró presente sólo en la fracción periplásmica de células crecidas en tiosulfato y azufre, no así en células crecidas en ión ferroso.

4.2.2.4. Proteínas de transporte y unión

A. ferrooxidans posee dos genes *pstS*, los cuáles forman parte de un aparente regulón Pho (Vera y col., 2003). Los AFOs 2372 y 1673 (Tabla 13) corresponden a las proteínas de unión de fosfato PstS1 y PstS2 respectivamente, las cuáles serían los transportadores periplásmicos de fosfato en *A. ferrooxidans*. Previamente, nuestro laboratorio había comunicado que el nivel de expresión de PstS2 aumenta cuando células de *A. ferrooxidans* son sometidas a condiciones limitantes de fosfato (Vera y col., 2003). Mediante el análisis diferencial por 2D-PAGE de los extractos periplásmicos de células de *A. ferrooxidans*, se encontró que el nivel de expresión de la proteína AFO 1673 fue mayor en células crecidas en ión ferroso que en las células crecidas en azufre o en tiosulfato (Tabla 12). Es probable que parte del fosfato del medio precipite con ión ferroso, ocasionando un estado de carencia.

Los receptores dependientes de TonB son proteínas de membrana externa que forman canales permeables a solutos grandes tal como la vitamina B₁₂ y sideróforos. Estos receptores asocian ligandos con gran afinidad y requieren la interacción con la proteína TonB (Ferguson y Deisenhofer, 2002). En las fracciones periplásmicas de *A. ferrooxidans* se

encontraron varias proteínas con similitud a receptores dependientes de TonB. El AFO 4505 se encontró presente en todas las condiciones de crecimiento. Los AFO 263 y 1538 se encontraron expresados en células crecidas en azufre y tiosulfato, no así en las células crecidas en ión ferroso. Por otro lado, los AFOs 1171, 1177 y 2296 fueron exclusivos de las células crecidas en azufre. El análisis diferencial de los extractos periplásmicos mediante 2D-PAGE demuestra que los AFOs 263 y 1538 tienen niveles de expresión más altos en células crecidas en azufre en comparación con células crecidas en ión ferroso. Esto demuestra que existe una expresión diferencial de estos receptores de acuerdo a la naturaleza del sustrato oxidable.

El AFO 3537 tiene similitud con la proteína TolC. Esta proteína es un componente común de una amplia variedad de bombas de eflujo. TolC y sus homólogos están involucrados en el transporte de moléculas químicamente muy diversas que varían desde proteínas grandes como la hemolisina a pequeños compuestos tóxicos como los antibióticos (Nikaido, 2003). Esta proteína se encontró en la fracción periplásmica de células crecidas en azufre y tiosulfato, pero no en células crecidas en ión ferroso, sugiriendo que esta proteína podría estar cumpliendo una función importante durante el crecimiento de la bacteria en compuestos de azufre reducido.

El AFO 4277 es una proteína con similitud a TolB, el componente periplásmico del sistema de transporte de biopolímeros, Tol. El sistema Tol está involucrado en la estabilidad estructural de la membrana externa

uniendo la membrana externa al peptidoglicano, y dirigiendo los componentes de membrana externa a través del periplasma. También participa en la expresión en la superficie del O-lipopolisacárido (Lloubès y col., 2001). El análisis diferencial de los extractos periplásmicos mediante 2D-PAGE (Tabla 12), demostró que en las células crecidas en azufre y tiosulfato los niveles de esta proteína son muy superiores a los encontrados en células crecidas en ión ferroso.

El AFO 2281 tiene similitud con proteínas periplásmicas de unión a compuestos que contienen hierro, pertenecientes a la superfamilia TroA. Está localizada río arriba de una permeasa de un transportador de hierro ABC de la familia FecBD, sugiriendo que en *A. ferrooxidans*, el AFO 2281 podría ser parte de un transportador de citrato/hierro III. Al parecer, esta proteína tiene un papel importante durante el metabolismo del tiosulfato ya que se encontró expresada sólo en las células crecidas en esta fuente de energía.

El AFO 3502 es una proteína con similitud a la proteína periplásmica de unión a zinc (ZnuA) de la familia TroA. Río abajo del gen que codifica para esta proteína se encontraron otros marcos de lectura abiertos que codificarían para proteínas de transporte de zinc, ZnuB y ZnuC (Patzner y Hantke, 1998). Esta posible proteína de unión a zinc se encontró en las tres condiciones de crecimiento estudiadas. Sin embargo, sus niveles de expresión fueron levemente mayores en células crecidas en tiosulfato e ión ferroso que en células crecidas en azufre.

El AFO 1240 tiene similitud con una porina selectiva para carbohidratos de la familia OprB. La porina OprB de *P. aeruginosa* es permeable a solutos de menos de 300 Da, pero muestra especificidad para monosacáridos y glucosa. El pH ácido incrementa el nivel de transcripción desde el promotor de *oprB* (Nikaido, 2003). Esta proteína se expresó sólo en las células crecidas en azufre y tiosulfato y no en células crecidas en ión ferroso.

Los AFOs 1827 y 4142 son dos proteínas con similitud a una proteína de tolerancia a tolueno (Ttg2D). El gen *ttg2D* codifica para el componente periplásmico de un sistema de transporte ABC involucrado con la resistencia a solventes orgánicos (Monaco y col., 2006). Los genes adyacentes a *ttg2D* de *A. ferrooxidans* tienen similitud con los genes *ttg2ABC*, los cuáles forman parte de un operón involucrado en la resistencia a tolueno en *P. putida* (Kim y col., 1998). Si bien, en un principio se pensó que este sistema correspondía a un sistema de exportación de tolueno, se ha demostrado que en *P. putida* se asemeja más a un sistema ABC de importe típico. Adicionalmente, en el patógeno *Xylella fastidiosa* se sugirió que un operón *ttg* putativo estaría relacionado con la captación de glutamato y otros aminoácidos polares en lugar de un sistema de resistencia a tolueno (Meidanis y col., 2002). En efecto, en *Neisseria meningitidis* se describieron proteínas con similitud a proteínas Ttg de *P. putida* y se comprobó la participación de estas proteínas en la captación de L-glutamato (Monaco y col., 2006). Es probable que en *A. ferrooxidans* este grupo de genes pueda tener una función similar. Por otro

lado, el nivel de expresión de AFO 4142 fue levemente mayor en células crecidas en tiosulfato que en células crecidas en ión ferroso.

Otras proteínas de unión a soluto encontradas en la fracción periplásmica de *A. ferrooxidans* son las tres proteínas de unión a sulfato/tiosulfato/molibdato pertenecientes a la familia ModA: ModA1 (AFO 4312), ModA2 (AFO 4306) y ModA3 (AFO 2275), que discutimos previamente.

4.2.2.5. Metabolismo energético

En la fracción periplásmica de células de *A. ferrooxidans* crecidas en tiosulfato se encontraron seis proteínas relacionadas con el metabolismo energético (Tabla 13): dos citocromos *c4* (CycA1, AFO 14 y CycA2, AFO 561), un citocromo *c* (Cyc2, AFO 4620), un citocromo *c552* (Cyc1, AFO 4621), la rusticianina (AFO 4627) y la proteína hierro oxidasa, HiPIP (AFO 551). Previamente se ha descrito que estas proteínas estarían localizadas en el periplasma de *A. ferrooxidans* (Ingledew, 1982; Rawlings, 2005a), lo cuál está en concordancia con nuestros estudios proteómicos. Se sabe que *cycA1* es codificado en el operón *petI* y *cycA2* es codificado en el operón *petII* (Brassuer y col., 2002; Levican y col., 2002). Se ha observado que a nivel transcripcional el operón *petII* se expresa más en células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre que en células crecidas en ión ferroso y que el operón *petI* se expresa más en células crecidas en ión ferroso que en células crecidas en azufre. De esta forma se ha propuesto un modelo para la oxidación del azufre y del hierro (II) por *A. ferrooxidans* (Quatrini y col., 2006). De acuerdo con

estos antecedentes, nosotros encontramos que en la fracción periplásmica de células crecidas en ión ferroso se encontró sólo la proteína CycA1, mientras que en la fracción periplásmica de células crecidas en azufre estaba presente sólo la proteína CycA2. Sin embargo, en células crecidas en tiosulfato se identificaron ambos citocromos *c4*, sugiriendo una regulación diferente a lo observado en el caso de células crecidas en azufre. Considerando que el tiosulfato es el principal intermediario en la oxidación de la pirita (FeS_2), nuestros resultados apuntan a que ambos citocromos *c4* estarían cumpliendo un papel relevante durante la oxidación del mineral.

La proteína HiPIP de *A. ferrooxidans* se ha caracterizado previamente (Fukomori y col., 1988; Kusano y col., 1992 y Cavazza y col., 1995). Se propuso que esta proteína era el primer aceptor de electrones en algunos modelos alternativos de transferencia de electrones entre el Fe (II) y el oxígeno. Sin embargo, recientemente Bruscella y col. (2005) sugirieron que esta proteína estaría involucrada en la cadena transportadora de electrones entre el complejo *bc1* y una oxidasa terminal, tal como ocurre con otras HiPIP conocidas (Bonora y col., 1999; Pereira y col., 1999). Bruscella y col. (2005) clonaron el gen que codifica para la HiPIP de *A. ferrooxidans* y lo expresaron en *E. coli*. La traslocación de esta proteína en el periplasma de *E. coli* fue dependiente de la expresión del gen *tatC*, indicando que la translocación de HiPIP es dependiente del sistema Tat. Nuestros resultados demuestran que, efectivamente, la proteína se ubica en el periplasma de *A. ferrooxidans*.

Encontramos también un grupo de proteínas no relacionadas entre ellas que tienen similitud con proteínas poco caracterizadas en otros microorganismos por lo cual se hace muy difícil inferir la función de estas proteínas en *A. ferrooxidans*. Estas incluyeron a los AFOs 1211, 1239, 1442, 1443, 1678, 2019, 2607, 3253, 3704, 3816, 4304, 4314, 4353. Al respecto, cabe señalar que dos de ellas (AFO 4304 y 4314) podrían estar cumpliendo un papel importante durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en compuestos reducidos de azufre. Ambas proteínas no tienen homólogos conocidos en las bases de datos y de acuerdo a las predicciones bioinformáticas, poseen una señal de exporte tipo Tat. Dentro del genoma de *A. ferrooxidans* el AFO 4314 se encuentra codificado por un gen adyacente a los genes que codifican para las proteínas P21 y ModA1 y se demostró que su nivel de expresión es mayor en células crecidas en tiosulfato que en células crecidas en ión ferroso. Además, como se mencionó anteriormente, esta proteína se encontró formando parte de un putativo complejo con la proteína P21. El AFO 4304 se encuentra codificado por un gen adyacente a los genes que codifican para las proteínas ModA2 y DoxDA2 de *A. ferrooxidans*. Esta proteína se identificó sólo en la fracción periplásmica de células crecidas en tiosulfato. Cabe destacar que el nivel de expresión de ModA2 fue también mucho mayor en células crecidas en tiosulfato que en células crecidas en azufre o en ión ferroso.

En la fracción periplásmica de células crecidas en tiosulfato se encontraron tres proteínas con similitud a proteínas ribosomales (S19, L11 y

L35). También se encontraron algunas en las fracciones periplásmicas provenientes de células crecidas en azufre y en ión ferroso. Algunas de estas proteínas poseen una señal de exportación predicha del tipo SecretomeP. Esto puede indicar la posibilidad de que estas proteínas sean exportadas al espacio extracelular, tal como se ha observado en otros microorganismos. Por otro lado, la presencia en la fracción periplásmica de estas proteínas como de otras pocas típicamente citoplásmicas que se identificaron en los extractos, se puede deber a lisis celular durante la preparación de las muestras, la cuál no fue evidenciada mediante inmunodetección con anti-Ef-Tu. Sin embargo algunas proteínas, entre las que se encuentran las chaperona DnaK y GroEL, la superóxido dismutasa, el factor de elongación Ef-Tu y algunas proteínas ribosomales, se han encontrado como proteínas secretadas no clásicas principalmente en bacterias Gram positivas (Bendtsen y col., 2005).

Nuestros resultados muestran que existe un grupo de proteínas que se expresan en células de *A. ferrooxidans* crecidas en las diferentes fuentes de energía, pero que sin embargo no se encuentran anotadas en la base de datos del TIGR como posibles marcos abiertos de lectura. Entre ellas identificamos algunas proteínas desconocidas, un citocromo *c*, una chaperona de cobre, CopC (AFO 675), y una “sterol carrier protein” (AFO 1450). Esta última parece cumplir una función importante durante el crecimiento de la bacteria en compuestos reducidos de azufre, ya que en todas las muestras analizadas (extractos proteicos totales y periplásmicos)

muestra niveles de expresión mayores en células crecidas en azufre y tiosulfato comparado a células crecidas en ión ferroso.

Con respecto a las proteínas sin homólogos conocidos en la base de datos, identificamos 4 proteínas desconocidas en la fracción periplásmica de células de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato que no se encuentran en las fracciones periplásmicas de células crecidas en azufre o en ión ferroso. Estas proteínas corresponden a los AFOs 205, 1546, 4205 y 4500. Además se encontraron cinco proteínas desconocidas que parecen ser exclusivas de las células crecidas en azufre y dos que parecen ser exclusivas de células crecidas en ión ferroso.

En general, muchas de las diferencias en los niveles de expresión de proteínas detectadas en esta Tesis, pueden relacionarse directamente con la utilización de los distintos sustratos energéticos. Sin embargo, existen también otros factores que podrían estar dando cuenta de algunas de estas diferencias. Entre ellos se encuentran el pH y la composición salina del medio, así como también la distinta velocidad de crecimiento de las bacterias en cada condición. Por otro lado, además de la expresión diferencial detectada entre *A. ferrooxidans* crecido en compuestos de azufre parcialmente oxidados e ión ferroso, se encontró diferencias en los niveles de expresión de algunas proteínas entre *A. ferrooxidans* crecido en azufre y en tiosulfato. En el caso de ModA2 y el AFO 4306 sus niveles de expresión fueron más altos en células crecidas en tiosulfato que en células crecidas en azufre. En el caso de la proteína ModA3 su nivel de expresión fue mayor en

células crecidas en azufre que en células crecidas en tiosulfato. Además, la expresión de los citocromos *c4* en ambas condiciones de crecimiento también mostró diferencias. Estas diferencias probablemente se deben a los diferentes sustratos empleados. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no se puede descartar la influencia de otros factores como la composición salina de los medios, pH y la adhesión de las bacterias al azufre.

5. CONCLUSIONES

- Mediante técnicas de entrecruzamiento y electroforesis en geles nativos se encontró que la proteína P21 formaría parte de un complejo multiproteico compuesto por lo menos de cuatro proteínas. Dos de las proteínas identificadas, ModA1 y una proteína desconocida, se encuentran en el contexto génico de la P21.
- Los niveles de 3 proteínas que estarían formando un complejo con la P21 se encuentran elevados en células crecidas en tiosulfato comparado con células crecidas en ión ferroso: AFO 4312 (ModA1), AFO 4314 y AFO 4336, lo que sugiere que este complejo putativo tendría un papel importante en la oxidación de compuestos reducidos de azufre.
- En la misma unidad transcripcional en la que se encuentran los genes *p21* y *modA1* se encuentra codificada una posible tiosulfato quinona oxido reductasa (DoxDA1).
- En el genoma de *A. ferrooxidans* existen dos copias de genes que codificarían para posibles tiosulfato deshidrogenasas de la familia

tiosulfato quinona oxidoreductasa (*doxDA1* y *doxDA2*). Ambos genes se expresan en células crecidas en tiosulfato, azufre e ión ferroso.

- El nivel de los transcritos de los genes *doxDA* se encuentra incrementado al menos 2 veces en células crecidas en compuestos reducidos de azufre, respecto de las células crecidas en ión ferroso. Además, *doxDA1* se expresa 10 veces más en células crecidas en piritita, con respecto a células crecidas en ión ferroso.
- Se encontró que la actividad tiosulfato deshidrogenasa está presente en todas las condiciones de crecimiento, pero es mayor en células crecidas en tiosulfato que en células crecidas en ión ferroso. Esta actividad se encontró enriquecida en fracciones periplásmicas de células crecidas en hierro, azufre y tiosulfato. Además, también se encontró actividad asociada a la fracción de membrana en células crecidas en tiosulfato, la cual podría deberse a la expresión de las proteínas DoxDA de *A. ferrooxidans*.
- Mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida se identificó un grupo de proteínas que cambiaron sus niveles de síntesis durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en tiosulfato, azufre y hierro; lo cual sugiere una regulación de la expresión de proteínas de acuerdo a la naturaleza del sustrato oxidable.

-
- *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato expresa dos tipos de citocromos c4 (CycA1 y CycA2) mientras que en azufre se expresa sólo uno (CycA2), sugiriendo que pueden existir mecanismos alternativos para la oxidación del azufre y del tiosulfato en esta bacteria.
 - La proteína identificada como ModA2 podría ser una proteína de unión a tiosulfato y considerando sus niveles de expresión parece tener un papel relevante durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en tiosulfato.
 - Se encontraron varios precursores de posibles proteínas de membrana, que parecen tener un papel relevante en la oxidación de compuestos reducidos de azufre, además de la ya conocida OMP50.
 - El análisis de los extractos periplásmicos sugiere la participación relevante de al menos cuatro proteínas de unión a sustrato (entre ellas, dos proteínas de unión a sulfato/tiosulfato), 2 proteínas de la familia de las tioredoxinas y cinco proteínas de función desconocida, durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en tiosulfato.

6. REFERENCIAS

- Acevedo, F. 2000. The use of reactors in biomining processes. *Electron J. Biotechnol.* 3:184–194.
- Acosta, M., Beard, S., Ponce, J., Vera, M., Mobarec, J.C. y Jerez, C.A. 2005. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS.* 9:13-29.
- Alba, B.M., Zhong, H.J., Pelayo, J.C. y Gross, C.A. 2001. *degS* (hhoB) is an essential *Escherichia coli* gene whose indispensable function is to provide $\sigma(E)$ activity. *Mol. Microbiol.* 40:1323–1333.
- Ames, G. F. L., Prody, C. y Kustu, S. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* 160:1181–1183.
- Amaro, A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I. y Jerez, C.A. 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 173:910–915.
- Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M. y White, F.H. Jr. 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:1309–1314.
- Appia-Ayme, C., Guiliani, N., Ratouchniak, J. y Bonnefoy, V. 1999. Characterization of an operon encoding two *c*-type cytochromes an *aa3*-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4781-4787.
- Arredondo, R., García, A. y Jerez, C.A. 1994. The partial removal of lipopolysaccharide from *Thiobacillus ferrooxidans* affects its attachment to solids. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:2846–2851.
- Avruch, J. y Fairbanks, G. 1972. Demonstration of a phosphopeptide intermediate in the Mg^{++} -dependent, Na^{+} - and K^{+} - stimulated adenosine triphosphatase reaction of the erythrocyte membrane. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69:1216–1220.
- Baker, B.J. y Banfield, J.F. 2003. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44:139–152.
- Bamford, V., Bruno, S., Rasmussen, T., Appia-Ayme, C., Cheesman, M., Berks, B. y Hemmings, A. 2002. Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. *EMBO J.* 21:5599–5610.
- Bandara, A.B., Sriranganathan, N., Schurig, G.G. y Boyle, S.M. 2005. Carboxyl-terminal protease regulates *Brucella suis* morphology in culture and persistence in macrophages and mice. *J. Bacteriol.* 187:5767–5775.

- Bardischewsky, F., Fischer, J., Höller, B. y Friedrich, C.G. 2006. SoxV transfers electrons to the periplasm of *Paracoccus pantotrophus* – an essential reaction for chemotrophic sulfur oxidation. *Microbiology* 152:465-472.
- Barreto, M., Jedlicki, E. y Holmes, D.S. 2005. Identification of a gene cluster for the formation of extracellular polysaccharide precursors in the chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2902-2909.
- Barreto, M., Quatrini, R., Bueno, S., Arriagada, C., Valdes, J., Silver, S., Jedlicki, E. y Holmes, D.S. 2003. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. *Hydrometallurgy* 71:97-105.
- Bateman, A. y Bycroft, M. 2000. The structure of a LysM domain from *Escherichia coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol.* 299:1113-1119.
- Baumler, A.J., Kusters, J.G., Stojiljkovic, I. y Heffron, F. 1994. *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect. Immun.* 62:1623-1630.
- Beller, H.R., Chain, P.S.G., Letain, T.E., Chakicherla, A., Larimer, F.W., Richardson, P.M., Coleman, M.A., Wood, A.P. y Kelly, D.P. 2006. The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *J. Bacteriol.* 188:1473-1488.
- Bendtsen, J.D., Kiemer, L., Fausboll, A. y Brunak, S. 2005. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology* 5:58.
- Berks, B.C., Ferguson, S.J., Moir, J.W.A. y Richardson, D.J. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochem. Biophys. Acta* 1232:97-173.
- Bessette, P. H., Cotto, J. J., Gilbert, H. F. y Georgiou, G. 1999. *In vivo* and *in vitro* function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J. Biol. Chem.* 274:7784-7792.
- Black, P. N. y DiRusso, C. C. 2003. Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:454-472.
- Bonora, P., Principi, I., Monti, B., Ciurli, S., Zannoni, D. y Hochkoepler, A. 1999. On the role of high-potential iron sulfur proteins and cytochromes in the respiratory chain of two facultative phototrophs. *Biochim. Biophys. Acta* 1410:51-60.
- Bos, M.P. y Tommassen, J. 2004. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:610-616.

- Buonfiglio, V., Polidoro, M., Soyer, F., Valenti, P. y Shively, J. 1999. A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* 72:85-93.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brassuer, G., Levican, G., Bonnefoy, V., Holmes, D., Jedlicki, E. y Lemesle-Meunier, D. 2004. Apparent redundancy of electron transfer pathways via *bcl* complexes and terminal oxidases in the extremely acidophilic chemoautotrophic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1656:114-126.
- Braun, M. y Silhavy, T.J. 2002. Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 45:1289-1302.
- Brierly, C.L. 1982. Microbiological mining. *Sci. Am.* 247:44-53.
- Brock, T.D., Madigan, M.T. y Martinko, J.M. 2006. *Biology of Microorganisms*. Upper Saddle River, N.J. [u.a.]: Prentice-Hall.
- Brune, D.C. 1989. Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. *Biochem. Biophys. Acta* 975:189-221.
- Bruscella, P., Cassagnaud, L., Ratouchniak, J., Brasseur, G., Lojou, E., Amils, R. y Bonnefoy, V. 2005. The HiPIP from the acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* is correctly processed and translocated in *Escherichia coli*, in spite of the periplasm pH difference between these two microorganisms. *Microbiology* 151:1421-1431.
- Brüser, T., Lens, P.N.L. y Trüper, H.G. 2000. The biological sulfur cycle. In *Environmental technologies to treat sulfur pollution*. Lens, P.N.L. (ed). London: IWA Publishing, pp. 47-76.
- Buonfiglio, V., Polidoro, M., Soyer, F., Valenti, P. y Shively, J. 1999. A novel gene encoding a sulfur-regulated outer membrane protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biotechnol.* 72:85-93.
- Cavard, C., Lazdunski, C. y Howard, S.P. 1989. The acylated precursor form of the colicin A lysis protein is a natural substrate of the DegP protease. *J. Bacteriol.* 171:6316-6322.
- Cavazza, C., Guigliarelli, B., Bertrand, P. y Bruschi, M. 1995. Biochemical and EPR characterization of a high potential iron-sulfur protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130:193-200.
- Clark, D.A. y Norris, P.R. 1996. *Acidimicrobium ferrooxidans* gen nov, sp nov: mixed culture ferrous iron oxidation with *Sulfobacillus* species. *Microbiology* 142:785-790.
- Coram, N.J. y Rawlings, D.E. 2002. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp nov dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:838-845.

- Corbin, R.W., Paliy, O., Yang, F., Shabanowitz, J., Platt, M., Lyons, C.E., Root, K., McAuliffe, J., Jordan, M.O., Kustu, S., Soupene, E. y Hunt D.F. 2003. Toward a protein profile of *Escherichia coli*: Comparison to its transcription profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:9232-9237.
- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J. y Rappuoli, R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 284:1328-1333.
- Cox, J.C. y Boxer, D.H. 1978. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron (II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochem. J.* 174:497-502.
- Dahl, C. y Trüper, H.G. 1994. Enzymes of dissimilatory sulfide oxidation in phototrophic sulfur bacteria. In *Inorganic Microbial Sulfur Metabolism*, pp. 400-421.
- Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A.S., Schulte, A., Sander, J., Lubbe, Y., Deuster, O. y Brune, D.C. 2005. Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. *J. Bacteriol.* 187:1392-1404.
- De Shazer, D., Waag, D.M., Fritz, D.L. y Woods, D.E. 2001. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *Microb. Pathog.* 30:253-269.
- Devasia, P. Natarajan, K.A., Sathyanarayana, D.N. y Rao, G.R. 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:4051-4055.
- Dispirito, A., Silver, M., Voss, L. y Tuovinen, O. 1982. Flagella and pili of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from an uranium mine in Northern Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:1196-1200.
- Drobner, E., Huber, H. y Stetter, K.O. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans*, a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2922-2923.
- Edwards, K.J., Bond, P.L., Gihring, T.M. y Bamfield, J.F. 2000. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid drainage. *Science* 279:1796-1799.
- Elbehti, A., Brasseur, G. y Lemesle-Meunier, D. 2000. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the *bcl* and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 182:3602-3606.
- Elzer, PH., Phillips, R.W., Robertson, G.T. y Roop II, R.M. 1996. The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Infect. Immun.* 64:4838-4841.

- Eng, J. K., Mc Cormack, A. y Yates, J.R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5:976-989.
- Ferguson, A.D. y Deisenhofer, J. 2002. TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* 1565:318-332.
- Fischer, G., Tradler, T. y Zarnt, T. 1998. The mode of action of peptidyl prolyl cis/trans isomerases *in vivo*: binding vs. catalysis. *FEBS Lett.* 426:17-20.
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A. y Fischer, J. 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2873-2882.
- Friedrich, C.G., Bardischewsky, F., Rother, D., Quentmeier, A. y Fischer, J. 2005. Prokaryotic sulfur oxidation. *Current Opinion Microbiol.* 8:253-259.
- Fuchs, T., Huber, H., Teiner, K., Burggraf, S. y Stetter, K.O. 1995. *Metallosphaera prunae*, sp nov, a novel metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeum, isolated from a uranium mine in Germany. *Syst. Appl. Microbiology* 18:560-566.
- Fuchs, T., Huber, H., Burggraf, S. y Stetter, K.O. 1996. 16S rDNA-based phylogeny of the archaeal order *Sulfolobales* and reclassification of *Desulfurolobus ambivalens* as *Acidianus ambivalens* comb Nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 19:56-60.
- Fukumori, Y., Yano, T., Sato, A. y Yamanaka, T. 1988. Fe(II)-oxidizing enzyme purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 50:169-172.
- Fulda, S., Huang, F., Nilsson, F., Hagemann, M. y Norling, B. 2000. Proteomics of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Identification of periplasmic proteins in cells grown at low and high salt concentrations. *Eur. J. Biochem.* 267:5900-5907.
- Gardner, M.N. y Rawlings, D.E. 2000. Production of rhodanese by bacteria present in bio-oxidation plants used to recover gold from arsenopyrite concentrates. *J. Appl. Microbiol.* 89:185-190.
- Gehrke, T., Telegdi, J., Thierry, D. y Sand, W. 1998. Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2743-2747.
- Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K. y Sand, W. 2001. The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans*- a model for structure- function relationships of attached bacteria and their physiology. *Water Sci. Technol.* 43:159-167.
- Gentle, I.E., Burri, L. y Lithgow, T. 2005. Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol. Microbiol.* 58:1216-1225.
- Golyshina, O.V., Pivovarova, T.A., Karavaiko, G.I., Kondrateva, T.F., Moore, W.R., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N., Yakimov, M.M. y Golyshin, P.N. 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen nov, sp nov, and

- acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam nov, comprising a distinct lineage of the *Archaea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:997–1006.
- Guiliani, N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M. y Bonnefoy, V. 1997. Alanine-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. Microbiology 143:2179–2187.
- Gygi, S.P., Corthals, G.L., Zhang, Y., Rochon, Y. y Aebersold, R. 2000. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:9390–9395.
- Hallberg, K.B. y Johnson, D.B. 2001. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. Adv. Appl. Microbiol. 49:37–84.
- Harneit, K., Göksel, A., Kock, D., Klock, J.-H., Gehrke, T. y Sand, W. 2006. Adhesion to metal sulfide surfaces by cells of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*. Hydrometallurgy 83:245–254.
- Ingledeu, W.J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. Biochim. Biophys. Acta 683:89–117.
- Johnson, B. y Roberto, F. 1997. Heterotrophic acidophiles and their roles in bioleaching of minerals. In: *Biomining. Theory, microbes and industrial processes*. Rawlings, D.E. (ed), Berlin, Springer, pp. 259–279.
- Jones, C.H., Bolken, T.C., Jones, K.F., Zeller, G.O. y Hruby, D.E. 2001. Conserved DegP protease in gram-positive bacteria is essential for thermal and oxidative tolerance and full virulence in *Streptococcus pyogenes*. Infect. Immun. 69:5538–5545.
- Kahng, H.Y., Byrne, A.M., Olsen, R.H. y Kukor, J.J. 2000. Characterization and role of *tbuX* in utilization of toluene by *Ralstonia picketti* PK01. J. Bacteriol. 182:1232–1242.
- Kamimura, K., Yamakado, M., Shishikado, T. y Sugio, T. 2003. Analysis of NaCl-regulated major outer membrane proteins of the acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. Resultados no publicados (Secuencia publicada en la base de datos del NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=112982645>).
- Kanao, T., Kamimura, K. y Sugio, T. 2006. Tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270. Resultados no publicados (Secuencia publicada en la base de datos del NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=29467513>).
- Kelly, D.P. y Wood, A.P. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen nov,

- Hallothiobacillus* gen nov, and *Thermithiobacillus* gen nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:511-516.
- Kelly, D. P., Shergill, J.K., Lu, W-P y Wood, A.P. 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. A. van Leeuwenhoek 71:95-107.
- Kim, D.Y. y Kim, K.K. 2005. Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. J. Biochem. Mol. Biol. 38:266-274.
- Kim, K., Lee, S., Lee, K. y Lim, D. 1998. Isolation and characterization of toluene-sensitive mutants from the toluene-resistant bacterium *Pseudomonas putida* GM73. J. Bacteriol. 180:3692-3696.
- Kletzin, A., Urich, T., Muller, F., Bandejas, T.M. y Gomes, C.M. 2004. Dissimilatory oxidation and reduction of elemental sulfur in thermophilic archaea. J. Bioenerg. Biomemb. 36:77-91.
- Koebnik, R., Locher, K. P. y Van Gelder, P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. Mol. Microbiol. 37:239-253.
- Krause, F. 2006. Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes. Electrophoresis 27:2759-2781.
- Kurosawa, N. Itoh, Y.H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T. e Itoh, T. 1998. *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen nov, sp nov, a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*. Int. J. Syst. Bacteriol. 48:451-456.
- Kusano, T., Takeshima, T., Sugarawa, K., Inoue, C., Shiratori, T., Yano, T., Fukumori, Y. y Yamanaka, T. 1992. Molecular cloning of the gene encoding *Thiobacillus ferrooxidans* Fe(II) oxidase. High homology of the gene product with HiPIP. J. Biol. Chem. 267:11242-11247.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Laundenbach, D.E., Ehrhardt, D., Green, L. y Grossman, A. 1991. Isolation and characterization of a sulfur-regulated gene encoding a periplasmically localized protein with sequence similarity to rhodanese. J. Bacteriol. 173:2751-2760.
- Lane, D.J., Harrison, A.P.J., Stahl, D., Pace, B., Giovannoni, S.J., Olsen, G.J. y Pace, N.R. 1992. Evolutionary relationships among sulfur- and iron-oxidizing eubacteria. J. Bacteriol. 174:269-278.
- Levicán, G., Bruscella, P., Guacunano, M., Inostroza, C., Bonnefoy, V., Holmes, D.S. y Jedlicki, E. 2002. Characterization of the *petI* and *res* operons of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 184:1498-501.
- Li, S.R., Dorrell, N., Everest, P.H., Dougan, G. y Wren, B.W. 1996. Construction and characterization of a *Yersinia enterocolitica* O:8 high-

- temperature requirement (*htrA*) isogenic mutant. *Infect. Immun.* 64:2088-2094.
- Lindström, E.B., Gunneriusson, E. y Tuovinen, E.H. 1992. Bacterial oxidation of refractory ores for gold recovery. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12:133-155.
- Lipinska, B., Sharma, S. y Georgopoulos, C. 1988. Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli*: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acid Res.* 16:10053-10067.
- Lloubès, R., Cascales, E., Walburger, A., Bouveret, E., Lazdunski, C., Bernadac, A. y Journet, L. 2001. The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity? *Res. Microbiol.* 152:523-529.
- Lyric, M.R. y Suzuki, I. 1970. Enzyme involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus* III. Properties of thiosulfate oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation. *Can J. Biochem.* 48:355-363.
- McCarthy, A. A., Haebel, P. W., Torronen, A., Rybin, V., Baker, E. N. y Metcalf, P. 2000. Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* 7:196-199.
- Martin, S. E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. y Marto, J. A. 2000. Subfemtomole MS and MS/MS peptide sequence analysis using nano-HPLC micro-ESI fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal.Chem.* 72:4266-4274.
- Martin, J.L. 1995. Thioredoxin – a fold for all reasons. *Structure* 3:245-250.
- Matouscheck, A., Rospert, S., Schmid, K., Glick, B.S. y Schatz, G. 1995. Cyclophilin catalyzes protein folding in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6319-6323.
- Meidanis, J., Braga, M.D. y Verjovski-Almeida, S. 2002. Whole-genome analysis of transporters in the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:272-299.
- Meulenberg, R., Pronk, J.T., Hazeu, W., van Dijken, J.P., Frank, J., Bos, P. y Kuenen, J.G. 1993. Purification and partial characterization of thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.* 139:2033-2039.
- Meulenberg, R., Pronk, J.T., Hazeu, W., Bos, P. y Kuenen, J.G. 1992. Oxidation of reduced sulphur compounds by intact cells of *Thiobacillus acidophilus*. *Arch. Microbiol.* 157:161-168.
- Mogensen, J. y Otzen, D. 2005. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* 57:326-346.
- Monaco, C., Tala, A., Spinosa, M.R., Progida, C., De Nitto, E., Gaballo, A., Bruni, C.B., Bucci, C. y Alifano, P. 2006. Identification of a meningococcal

- L-glutamate ABC transporter operon essential for growth in low-sodium environments. *Infect Immun.* 74:1725-1740.
- Muller, F.H., Bandejas, T.M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C.M. y Kletzin, A. 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate: quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* 53:1147-1160.
- Nakamura, K., Nakamura, M., Yoshikawa, H. y Amano, Y. 2001. Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* JCM7814. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:102-108.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:593-656.
- Norris, P.R., Clark, D.A., Owen, J.P. y Waterhouse, S. 1996. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp nov and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology* 142:775-783.
- Norris, P.R., Burton, N.P. y Foulis, N.A.M. 2000. Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4:71-76.
- Novo, M.T., García Jr. O. y Ottoboni, L.M. 2003. Protein profile of *Acidithiobacillus ferrooxidans* exhibiting different levels of tolerance to metal sulfates. *Curr. Microbiol.* 47:492-496.
- O'Farrel, P.Z., Goodman, H.M. y O'Farrel, P.H. 1977. High resolution two-dimensional electroforesis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12:1133-1142.
- Ohmura, N., Matsumoto, N., Sasaki, K., Nagaoka, T. y Saiki, H. 1999. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on hydrogen by the dissimilatory reduction of ferric iron under anaerobic conditions. In: *Biohydrometallurgy and the environment: toward the mining of the 21st century*. Amils, R. y Ballester, A. (ed), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 767-775.
- Olson, G.J., Brierley, J.A. y Brierley, C.L. 2003. Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:249-257.
- Oubrie, A. y Dijkstra, B. W. 2000. Structural requirements of pyrroloquinoline quinone dependent enzymatic reactions. *Protein Sci.* 9:1265-1273.
- Paetzel, M. y Dalbey, R. E. 1997. Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22:28-31.
- Patzer, S.I. y Hantke, K. 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28:1199-1210.
- Pereira, M.M., Carita, J.N. y Texeira, M. 1999. Membrane-bound electron transfer chain of the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*: characterization of the iron sulfur centers from the dehydrogenases and the investigation of the high potential iron-sulfur protein function by *in vitro* reconstitution of the respiratory chain. *Biochemistry* 38:1276-1283.

- Perham, R. N. 2000. Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: catalytic machines for multistep reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 69:961-1004.
- Petri, R., Podgorsek, L y Imhoff, J. 2001. Phylogeny and distribution of the *soxB* gene among thiosulfate-oxidizing bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 197:171-178.
- Pizza, M., Scarlato, V., Massignani, V., Giuliani, M.M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G.T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., Galeotti, C.L., Luzzi, E., Manetti, R., Marchetti, E., Mora, M., Nuti, S., Ratti, G., Santini, L., Savino, S., Scarselli, M., Storni, E., Zuo, P., Broeker, M., Hundt, E., Knapp, B., Blair, E., Mason, T., Tettelin, H., Hood, D.W., Jeffries, A.C., Saunders, N.J., Granoff, D.M., Venter, J.C., Moxon, E.R., Grandi, G. y Rappuoli, R. 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287:1816-1820.
- Poquet, L., Saint, V., Sez nec, E., Simoes, N., Bolotin, A. y Gruss, A. 2000. HtrA is the unique surface housekeeping protease in *Lactococcus lactis* and is required for natural protein processing. *Mol. Microbiol.* 35:1042-1051.
- Pott, A.S. y Dahl, C. 1998. Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* 144:1881-1894.
- Pronk, J. T., Meulenberg, R., Hazeu, W., Bos, P. y Kuenen, J.G. 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 75:293-306.
- Quatrini, R., Jedlicki, E. y Holmes, D. S. 2005. Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32: 606-414.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Ratouchniak, J., Veloso, F., Valdes, J., Lefimil, C., Silver, S., Roberto, F., Orellana, O., Denizot, F., Jedlicki, E., Holmes, D. y Bonnefoy, V. 2006. Insights into iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* 83:263-272.
- Rabilloud, T., Carpentier, G. y Tarroux, P. 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9:288-291.
- Ramírez, P., Toledo, H., Guiliani, N. y Jerez, C.A. 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1837-1845.
- Ramírez, P., Guiliani, N., Valenzuela, L., Beard, S. y Jerez, C.A. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4491-4498.

- Ramírez, P. 2002. Estudios proteómicos y genómicos del metabolismo de compuestos azufrados en el microorganismo acidófilo quimiolitotrófico *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis de Doctorado, Universidad de Chile, Chile.
- Rawlings, D.E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:65–91.
- Rawlings, D.E. 2005 a. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell. Fact.* 4:13.
- Rawlings, D.E. 2005 b. The evolution of pTF-FC2 and pTC-F14, two related plasmids of the IncQ-family. *Plasmid* 53:137–147.
- Rey, S., Acab, M., Gardy, J. L., Laird, M. R., DeFays, K., Lambert, C. y Brinkman, F. S. 2005. PSORTdb: a protein subcellular localization database for bacteria. *Nucleic Acids Res.* 33:164-168.
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G. y Beckwith, J. 1997. Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J. Bacteriol.* 179:6602–6608.
- Rodrigue, A., Chanal, A., Beck, K., Muller, M., Wu, L.F. 1999. Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial Tat pathway. *J. Biol. Chem.* 274:13223–28.
- Rohwerder, T. y 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.
- Rohwerder, T., Gehrke, T. y Sand, W. 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63:239-248.
- Saito, K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol.* 136:2443–2450.
- Salzberg, S.L., Delcer, A.L., Kasif, S. y White, O. 1998. Microbial gene identification using interpolated Markov models. *Nucleic Acids Res.* 26:2544–2548.
- Sand, W., Gehrke, T., Jozsa, P.G. y Schippers, A. 2001. (Bio)chemistry of bacterial leaching-direct vs indirect bioleaching. *Hydrometallurgy* 59:159–175.
- Sand, W., Gehrke, T., Hallmann, R., y Schippers, A. 1995. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism – a critical evaluation of bacterial leaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:961-966.
- Sauer, F. G., Knight, S. D., Waksman, G. J. y Hultgren, S.J. 2000. PapD-like chaperones and pilus biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11:27-34.
- Schägger, H., Cramer, W. y von Jagow, G. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native

- electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217:220-230.
- Schedel, M. y Trüper, H.G. 1980. Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus dinitrificans*. *Arch. Microbiol.* 124:205-210.
- Schippers, A. y Sand, W. 1999. Bacterial leaching of metal sulfides proceeds by two indirect mechanisms via thiosulfate or via polysulfides and sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:319-321.
- Schippers, A., Rohwerder, T. y Sand, W. 1999. Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:104-110.
- Scott, D.R., Weeks, D., Melchers, K. y Sachs, G. 1998. The life and death of *Helicobacter pylori*. *Gut. Suppl.* 1:S56-S60.
- Seeger, M. y Jerez, C.A. 1993. Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. *FEMS Microbiol. Rev.* 11:37-42.
- Shevchenko, A., Mann, M. y Wilm, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68:850-858.
- Shively, J., Keulen, G. y Meijer, W. 1998. Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:191-230.
- Silver, M. y Lungren, D.G. 1968. The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* 46:1215-1220.
- Spiess, C., Beil, A. y Ehrmann, M. 1999. A temperature dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97:229-347.
- Strauch, K.L. y Beckwith, J. 1988. An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1576-1580.
- Sun, C.W., Chen, Z.W., He, Z.G., Zhou, P.J. y Liu, S.J. 2003. Purification and properties of the sulfur oxygenase/reductase from the acidothermophilic archaeon, *Acidianus* strain S5. *Extremophiles* 7:131-134.
- Suzuki, I. 1999. Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45: 97-105.
- Tabita, R., Silver, M., y Lundgren, D.G. 1969. The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* 47:1141-1145.
- Takase, I., Ishino, F., Wachi, M., Kamata, H., Doi, M., Asoh, S., Matsuzawa, H., Ohta, T. y Matsushashi, M. 1987. Genes encoding two lipoproteins in the *leuS-dacA* region of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* 169:5692-5699.

- Tanaka, J., Suzuki, T., Mimuro, H. y Sasakawa C. 2003. Structural definition on the surface of *Helicobacter pylori* type IV secretion apparatus. *Cell Microbiol.* 5:395-404.
- Torma, A.E. 1983. Biotechnology applied to mining of metals. *Biotechnol. Adv.* 1:73-80.
- Urich, T. 2005. The sulfur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens*. In *Biology*. Darmstadt: Technical University, p. 151.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. y Jerez, C.A. 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 24:197-211.
- Varela, P. y Jerez, C.A. 1992. Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 77:149-153.
- Vera, M., Guiliani, N. y Jerez, C.A. 2003. Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy.* 71:125-132.
- Visser, J.M., De Jong, G.A.H., Robertson, L.A. y Kuenen, J.G. 1997. Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* 166:372-378.
- Wakai, S., Kikumoto, M., Kanao, T. y Kamimura, K. 2004. Involvement of sulfide quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68:2519-2528.
- Washburn, M. y Yates, J. (III). 2000. Analysis of the microbial proteome. *Current Opinion Microbiol.* 3:292-297.
- Washburn, M.P., Wolters, D., Yates, J.R. (III). 2001. Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19:242-247.
- Wonderling, L.D., Wilkinson, B.J. y Bayles, D.O. 2004. The *htrA* (*degP*) gene of *Listeria monocytogenes* 10403S is essential for optimal growth under stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1935-1943.
- Wootton, J. C. y Drummond, M. H. 1989- The Q-linker – a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng.* 2:535-543.
- Wu, T., McCandlish, A. C., Gronenberg, L. S., Chng, S. S., Silhavy, T. J. y Kahne, D. 2006. Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:11754-11759.
- Yarzabal, A., Appia-Ayme, C., Ratouchniak, J. y Bonnefoy, V. 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans rus* operon

encoding two cytochromes *c*, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* 150:2113-2123.

Yeo, H.-J. y Waksman, G. 2004. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. *J. Bacteriol.* 186:1919-1926.

Yorgey, P., Rhame, L.G., Tan, M.W. y Ausubel, F.M. 2001. The roles of *mucD* and *alginate* in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in plants, nematodes and mice. *Mol. Microbiol.* 41:1063-1076.

7. PUBLICACIONES GENERADAS DURANTE ESTA TESIS

- Ramírez, P., Valenzuela, L., Acosta, M., Guiliani, N. y Jerez, C.A. 2003. Expression proteomics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown in different metal sulfides: analysis of rhodanese-like proteins. 15th international Biohydrometallurgy symposium, IBS. Atenas, Grecia. Symposium Proceedings, pp: 141-151.
- Ramírez, P., Guiliani, N., Valenzuela, L., Beard, S. y Jerez, C.A. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. Appl. Environ. Microbiol. 70:4491-4498.
- Valenzuela, L., Beard, S., Guiliani, N. y Jerez, C.A. 2005. Differential expression proteomics of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown in different oxidizable substrates: study of the sulfates/thiosulfate/molybdate binding proteins. Proceedings of the 16th International Biohydrometallurgy symposium. (Harrison, S. T. L, Rawlings, D. E. and Petersen, J., eds) pp. 773-780.
- Valenzuela, L., Chi, A., Beard, S., Orell, A., Guiliani, N., Shawanowitz, J., Hunt, D. y Jerez, C.A. 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. Biotechnol. Adv. 24:197-211.
- Chi, A., Valenzuela, L., Beard, S., Mackey, A.J., Hunt, D. y Jerez, C.A. 2007. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomic analysis. Manuscrito enviado para publicación.

8. ANEXOS

Anexo 1

LISTA DE PARTIDORES

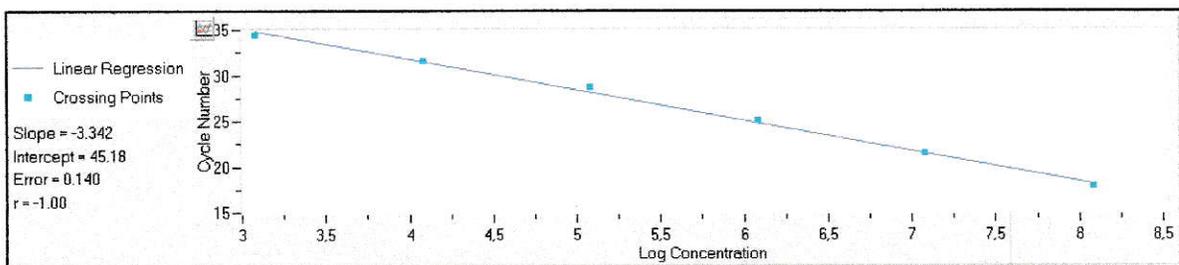
Nombre	Secuencia (5' → 3')
PopA1N2 (1)	GTAAAACGCTGCAAGTCG
PopA2N (4)	ATGGCAACGACCATGTCA
PopA2R2 (5)	CATCGCTCAAAGGCAAAG
PopA3R3 (8)	CGTCTGGTTGGATAGCTG
popA3C (9)	CCTGCGGGTTGTCATACT
SBPdir3 (108)	CAACGTCCCGATCCCCGCGA
Rhodreva (109)	GTCGTGCGCGGAGGCCACCC
PopA6N (14)	CGGATCATCAGGAGAAAG
PopA6R2 (15)	GCGCGAATTTCTTGTAGG
PopA6C (16)	TCAGCGTTGCAGGGGTAT
PopA7N (17)	TGACGAAAAGCAGCACAC
PopA7C (19)	CACTTCCCCTGGGTATAC
<i>trbDR</i>	TCATGAGGTTTGCCAAGG
<i>trbDDi</i>	AAACACGACCCGCAATCC
<i>5trbDDi</i>	GGGTATGCAGGATTTGGG
<i>trbJRT</i>	AAAAGGCTGGGGTTGTTC
<i>trbJD</i>	GCCAACACCCTGAACATG
<i>3trbER</i>	TAAAGGGACTCCGCATAG
<i>trbED</i>	CCCACCCTCATTTTGCTC
<i>putRT</i>	ATAACGAGGTGAGACTGG
<i>putR</i>	ATAACGAGGTGAGACTGG
<i>putD</i>	ACGCAAAGAGCATATGCC
<i>trbBD</i>	CTCATCGACAGGATCTCC
DoxDAfw1	TTCAAGAAGCTCGCGT
DoxDArv1	GGAGAGGGTCGAACTG
DoxDA2fw2	CGGAGGCGCTTATTCC
DoxDA2rv2	ACCAATGATGTTTGGAGG

Anexo 2

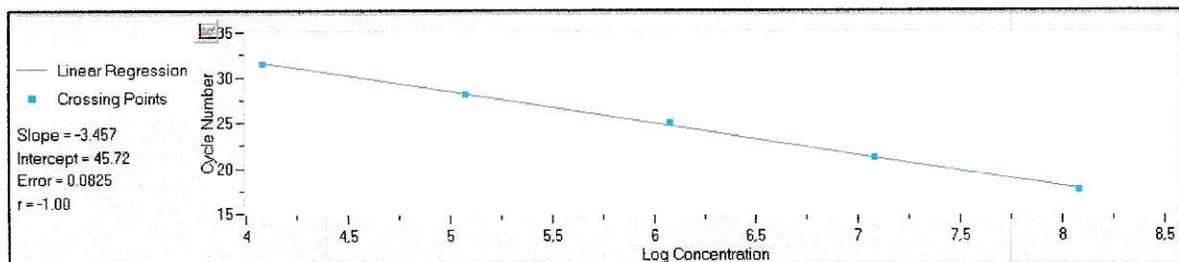
Cuantificación de los transcritos *doxDA1* y *doxDA2* mediante PCR en tiempo real

Las curvas de calibración para ambos genes se generaron a partir de diluciones seriadas de DNA genómico ($1,2 \times 10^8$ copias – $1,2 \times 10^3$ copias) amplificado en las mismas condiciones en que se hicieron los experimentos con cDNA.

1. Curva de calibración para el gen *doxDA1*. (Eficiencia de amplificación = 1,99)



2. Curva de calibración para el gen *doxDA2*. (Eficiencia de amplificación = 1,95)

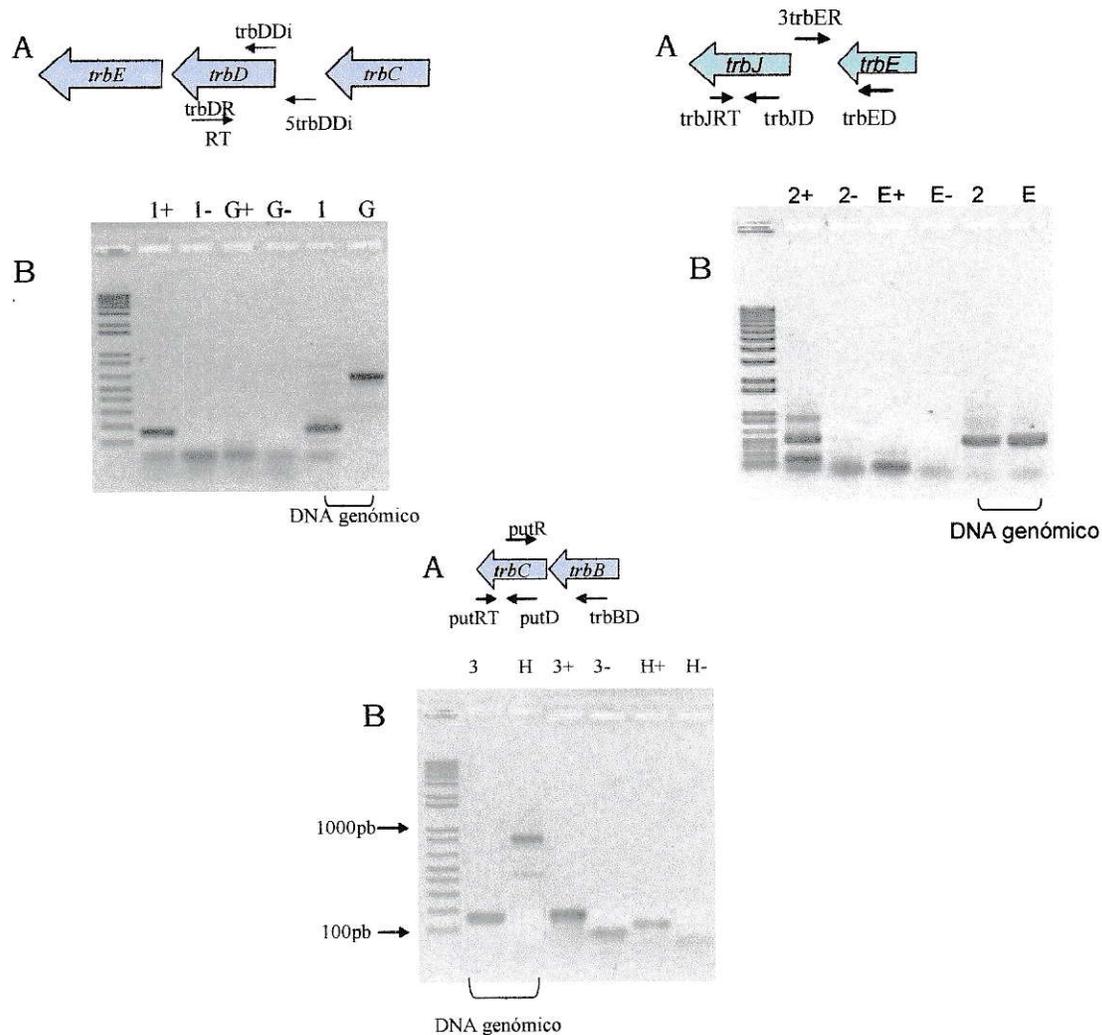


En cada uno de los experimentos de PCR en tiempo real se incluyó el respectivo control negativo (sin la transcriptasa inversa) y una dilución de uno de los estándares utilizados para la generación de la curva de calibración. Este correspondió al estándar 2 ($1,2 \times 10^7$ copias). De esta manera los resultados se interpolan directamente en la curva de calibración, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche).

Para la cuantificación de los transcritos de interés se utilizó 5 μg de RNA en el primer paso de RT-PCR. Para los experimentos de real time PCR el cDNA generado a partir de dicha reacción se diluyó 20 veces. Para cada uno de los transcritos de interés se hicieron dos réplicas biológicas que incluyeron preparaciones independientes de RNA y de cDNA.

Para la cuantificación de los transcritos de rRNA 16S se utilizó 1 μg de RNA en el primer paso de RT-PCR. Para los experimentos de real time PCR el cDNA generado a partir de dicha reacción se diluyó 200 veces. El Ct correspondiente al transcrito de rRNA 16S (eficiencia de amplificación = 1,78) se interpola en la curva de calibración correspondiente al gen de interés.

Anexo 3



Análisis de cotranscripción de los genes *trbB*, *trbJ* y *trbE* de *A. ferrooxidans* por RT-PCR. **A.** Diagrama esquemático indicando la posición de los genes. **B.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR. Las flechas indican la localización de los partidores utilizados para las reacciones de RT y de PCR. La reacción de RT se realizó utilizando 3 µg de RNA total obtenido de células crecidas en azufre. Se incluyeron reacciones de RT con (+) y sin (-) transcriptasa reversa, con el fin de excluir la contaminación de los cDNA con DNA genómico. 1: *trbDR-trbDDi*; G: *trbDR-5trbDDi*; 2: *trbJRT-trbJD*; E: *3trbER-trbED*; 3: *putRT-putD*; H: *putR-trbBD*.