

UCH-FC
Biotecnología
T 693
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

“ANÁLISIS DE LAS EXOPOLIFOSFATASAS DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* Y *Escherichia coli*”

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

CONSTANZA PAZ TORRES PARIS

Dr. Carlos A. Jerez Guevara
Director

Marzo, 2017
Santiago-Chile





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

Constanza Paz Torres Paris

“ANÁLISIS DE LAS EXOPOLIFOSFATASAS DE *Acidithiobacillus ferrooxidans* Y *Escherichia coli*”

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

Dr. Carlos A. Jerez
Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Julieta Orlando
Presidente

Dr. Ricardo Cabrera
Evaluador

Santiago de Chile, Viernes 10 de Marzo de 2017.

Para dos mujeres increíbles, Claudia y Eleonora

BIOGRAFÍA



¿Quieres saber de mí? Es complicado describirse a uno mismo, pero intentaré que te hagas una idea. A veces soy como Hermione Granger, con el pelo desordenado, preocupada y como ratón de biblioteca pegada con algo que leer. Otras veces creo que me parezco más a Martín Rivas y peco de ingenua en lugares sofisticados y complejos. Me gustaría ser un poco como Maud Fitzherbert o von Ulrich, dependiendo de cuando se la conozca, soñadora y luchadora hasta el final. Pero la verdad es que en otros aspectos me parezco más a Peeta, pues soy algo conformista, pero siento que tengo un corazón grande y soy tranquila como él. De ninguna manera soy como Lydia Bennet, nunca jamás. Preferiría que me compararas con Elizabeth o Jane, en ese caso. En quinto básico me dijeron que me parezco a Arwen, pero creo que es sólo en lo blanquita y en los ojos azules. Por otra parte, soy alguien que no quiere creer que lo que predijo Huxley en un mundo feliz es cierto, no quiero que el soma nos controle ni que cataloguemos a las personas en clases desde el nacimiento. Como Anne Elliot o Marianne Dashwood soy una romántica empedernida y quien me conoce sabe que una historia como la de Allie y Noah me saca mil quinientas lágrimas y que me encantaría conocer la catedral de Kingsbridge.

¿Te haces una idea de quien soy? Pues yo tampoco, pero con estas palabras te cuento que me gusta leer y que después de entregar este Seminario de Título espero ser Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Para más información leer: La serie de Harry Potter de J.K. Rowling; Martín Rivas de Alberto Blest Gana; La trilogía "The century" y Los pilares de la Tierra de Ken Follett; Los juegos del hambre de Suzanne Collins; Orgullos y Prejuicio, Sensatez y Sentimientos y Persuasión de Jane Austen; The notebook de Nicholas Sparks; Un mundo feliz de Aldous Huxley y el señor de los anillos de J.R.R. Tolkien.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado en esta etapa de mi vida. En primer lugar, a la Universidad de Chile y a todos los docentes y funcionarios que me ayudaron siempre. A las tías del quiosco, a las del pabellón G, a las tías de la biblioteca, a Juany, Marisol y Milton de Pregrado y a Verena de Secretaría de Estudios.

A los miembros de mi comisión por la paciencia y la dedicación con la que corrigieron mi trabajo. Al Dr. Patricio González-Hormazábal por aceptarnos en su laboratorio a Fernanda y a mí cuando sólo sabíamos lo que era un enlace covalente y darnos la oportunidad de aprender lo que es la vocación de ciencia desde ese invierno del 2011.

Al Dr. Carlos A. Jerez por aceptarme en el laboratorio cuando recién había pasado microbiología y no sabía nada del mundo, por las conversaciones a la hora del "tea time", los consejos científicos, la oportunidad de asistir a congresos y, por sobre todo, por enseñarme que en la vida se puede vivir de lo que uno ama.

Al Dr. Ricardo Cabrera y a Juan Carlos Cáceres por ayudarme en la parte más oscura y desconocida de mi tesis y enseñarme las infinitas posibilidades de crear ciencia con el computador. Gracias por las buenas energías, los consejos y por hacerme sentir bienvenida en otro lugar de la facultad.

A todos mis compañeritos del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias. A Rodrigo Castillo por enseñarme mis primeros pasos con los acidófilos, los PoliP y los consejos de tipo: "Si uno trabaja 8 horas de Lunes a Viernes, no es necesario venir los fines de semana para terminar a tiempo la tesis". A Matías Rivero que me prestaba todas sus soluciones y me respondió todos mis mails sobre protocolos de la PPX. A Pamina Contreras por darme la oportunidad de enseñar las cosas que he aprendido a alguien tan motivada y genial como tú. A Sebastián Rodríguez por las conversaciones de laboratorio y por confiar en mí en el tiempo que pasaste con nosotros. A Alejandro Araneda por esas conversaciones de 9 am sobre la vida, por las agüitas de hierbas contra todas las enfermedades y por estar siempre ahí. A Cristóbal "Nice" Martínez por las conversaciones, por sus potes gigantes de comida, por ayudarnos a abrir frascos y bajar las cosas que estaban en los estantes de más arriba. A María José "Mai" Vargas por las risas, las conversaciones de comida, de gatos y de sonicador, y por enseñarme a hacer perlas de azufre, aunque nunca volví a intentarlo. A Rodrigo "Soldado" Norambuena por hacerme reír mucho con sus "workouts" y enseñarme la complicada jerga de LOL y los niños rata. A Alejandra Recalde por mostrarnos lo diferente que puede ser el mundo, por introducirnos a nuevos sabores como el tereré, sus canelones, una comida que venía de Brasil y no me acuerdo cómo se llama, por enseñarnos las bendiciones de Sulfolobus y del RNA y por compartir mi gusto por el "Clásico" del Quiosco Norte. A Nia Oetiker por tener los mejores consejos de la vida, enseñarnos que no hay que olvidar lo importante que es la familia y que si uno quiere, siempre puede. A Claudio "F.R." Navarro por las conversaciones en "el sucucho de afuera", por tener la idea de ir al Juan Maestro/Pappa Johns cuando era necesario un momento de compartir, por esos consejos que intentaré seguir y, por sobre todo, por enseñarme que en la vida hay que perseguir nuestros sueños. A Diego Nahuel Cortez por las discusiones de los Viernes, por calentar su lasaña 5 veces, por los "quiosco time", por esas discusiones y explicaciones sobre clonamiento y proteínas y por ayudarme en la extraña y misteriosa aventura que fue cambiarnos del pET-TEV al pMAL. A Javiera "Gran Jefa, Big Boss" Ramos por ser mi mejor amiga de ciencia, por convidarme un lugarcito en el laboratorio cuando no tenía puesto, por esas tardes haciendo competentes, por crear a César y Cindy y por toda la infinidad de risas que compartimos juntas.

A mis compañeros de Biotec que estuvieron siempre conmigo a lo largo de toooooodos estos años, en las transcripciones, en las negociaciones con los profes después de los paros y en las presentaciones haciendo las preguntas fáciles. En particular, agradecer a Camilo Berríos, Pamela Cabedo, Ana María González, Macarena Kern, Franco López, Josefina Marín, Carla Rojas y Sebastián Venegas. Mención muy especial a Fernanda Cárcamo por ir al lab de Medi juntas en primero, por los almuerzos felices, por aquellas tardes de copuchas y todos los momentos lindos que vivimos juntas. También quiero agradecer a Francisco "Pancho" Osorio por guiarme en esa feria del postulante a que me viniera a Ciencias y no a Beauchef, por esos café y aquellas conversaciones profundas de la vida.

A mis ratas de alcantarilla, mis amigos del colegio, que a pesar de los años y de que yo no sea muy buena encontrando tiempo, están siempre presentes en mi vida: Tania Moraga, Cristóbal "Joey" Cartes y Álvaro Aguirre.

A la familia Armingol González, tía Dani, tío Marco, Vanessa, Estrellita y Smith, que me han acogido en su casa siempre como una más de la familia.

A mis mascotas, Eddy, Otto, Felpu, Sofí, Astrid, Cuchi, Rhea, Lessonia, por estar siempre alegres al verme. Pero por sobretodo a la pequeña Poti por estar conmigo cuando me he sentido más sola, por ser mi güatero en las noches de invierno y por enseñarme que uno puede querer a una perrita como si fuera tu propia hija.

No puedo dejar de agradecer a mi familia, que es grande, poco convencional y lo más importante en mi vida. A Lili, Mati y Lucas por enseñarme que las segundas oportunidades sí existen. A la Abuelita Vicha por regalarme tanto. A mi papá por perdonarme la inmadurez y mis decisiones precipitadas y siempre quererme tanto. A la Oli por nuestra relación entre abuela y mamá, por estar siempre presente y querernos incondicionalmente. A José Antonio, Félix y Emi por regalarme una nueva familia muy distinta, relajada y feliz. A mis hermanos, Neni y Tamara, por estar en todas, por ser mis compañeros de vida. A mi mamá por ser una mujer increíble y enseñarme que los únicos límites que existen son los que uno mismo crea y, por lo tanto, está en nosotros soñar y hacer de lo imposible, posible.

A Erick por estar conmigo por tantos años, por aguantarme en las buenas y en las malas, por escuchar mis reclamos, mi desesperación, mi enojo descontrolado y mis llantos y aún así querer seguir estando conmigo. Muchas gracias, payaso, por amarme tal y como soy.

Finalmente, muchas gracias Oma por tu compañía, por recibirme siempre en tu casa, por apoyarme incondicionalmente en todas y lo almuerzos de los domingos. Creo que no hay día en que no me acuerde de ti, pero sé que siempre andas conmigo y que antes que nos demos cuenta, pasarán los días, las semanas, los meses y los años y nos vamos a volver a encontrar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MINERÍA EN CHILE	1
1.2 ACIDÓFILOS EN BIOMINERÍA	1
1.3 MECANISMOS DE RESISTENCIA A METALES	3
1.3.1 <i>Sistemas de transporte de iones</i>	3
1.3.2 <i>Polifosfatos inorgánicos</i>	4
1.4 EXOPOLIFOSFATASA	6
1.5 OBJETIVO GENERAL	8
1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1 CEPAS, PLASMIDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	9
2.2 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	10
2.2.1 <i>Extracción de DNA genómico</i>	10
2.2.2 <i>Cuantificación del DNA</i>	10
2.2.3 <i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</i>	11
2.2.4 <i>Diseño de oligonucleótidos</i>	11
2.2.5 <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	12
2.2.6 <i>Purificación de plasmidios y de fragmentos de DNA obtenidos por PCR</i>	12
2.2.7 <i>Digestión de DNA</i>	12
2.2.8 <i>Ligación de fragmentos de DNA</i>	13
2.2.9 <i>Preparación de E. coli quimiocompetentes</i>	13
2.2.10 <i>Transformación de E. coli quimiocompetentes</i>	13
2.2.11 <i>Clonamiento del gen ppx de E. coli en el vector pET28aTEV y del gen ppx de A. ferrooxidans en los vectores pET28aTEV y pMAL-c5X</i>	14
2.3 TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	15
2.3.1 <i>Cuantificación de proteínas</i>	15
2.3.2 <i>Obtención de los extractos proteicos totales, soluble e insoluble</i>	16
2.3.3 <i>Purificación de proteínas</i>	16
2.3.4 <i>Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida</i>	18
2.4 MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	19
2.4.1 <i>Análisis de proteínas</i>	19
2.4.2 <i>Modelamiento de proteínas</i>	20
2.4.3 <i>Docking molecular</i>	20

3. RESULTADOS	21
3.1 CLONAMIENTO DE LOS GENES <i>PPX</i> DE <i>A. FERROOXIDANS</i> Y <i>E. COLI</i> Y EXPRESIÓN DE SUS PROTEÍNAS EN <i>E. COLI</i>	21
3.1.1 Clonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>E. coli</i> en el vector <i>pET28aTEV</i>	21
3.1.2 Clonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en el vector <i>pET28aTEV</i>	22
3.1.3 Clonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en el vector <i>pMAL-c5X</i>	24
3.2 PURIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES <i>PPX</i> DE <i>A. FERROOXIDANS</i> Y <i>E. COLI</i>	25
3.2.1 Purificación de la <i>PPX</i> recombinante de <i>E. coli</i>	25
3.2.2 Purificación de la <i>PPX</i> recombinante de <i>A. ferrooxidans</i>	26
3.3 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS <i>PPXS</i> DE <i>A. FERROOXIDANS</i> Y <i>E. COLI</i>	27
3.3.1 Comparación de las estructuras de <i>PPXS</i> cristalizadas en la base de datos <i>PDB</i>	27
3.3.2 Comparación de las <i>PPXS</i> de microorganismos del consorcio biominero	30
3.3.3 Modelamiento de la <i>PPX</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	34
3.3.4 Predicción de un posible sitio activo de <i>PPX_{Af}</i> mediante <i>Docking</i> molecular	40
4. DISCUSIÓN	44
4.1 PURIFICACIÓN DE LA <i>RPPX_{Af}</i> Y FORMACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN	44
4.2 CLASIFICACIÓN DE LAS <i>PPXS</i> DE ACIDÓFILOS	46
4.3 CARACTERÍSTICAS DE LA POSIBLE ESTRUCTURA DE <i>PPX_{Af}</i>	47
4.3.1 Posible sitio de inhibición por fosfato	51
4.3.2 Posible sitio de unión a metales	52
4.3.3 Modelo propuesto para el papel de <i>PPX_{Af}</i> en la activación temprana de los mecanismos de resistencia a metales	53
5. CONCLUSIONES	56
6. BIBLIOGRAFÍA.....	57
7. MATERIAL COMPLEMENTARIO	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.	9
Tabla 2. Plasmidios utilizados.	10
Tabla 3. Partidores utilizados para clonar los genes <i>ppx</i> de <i>E. coli</i> y <i>A. ferrooxidans</i> ..	11
Tabla 4. Características de las PPXs cristalizadas y depositadas en la base de datos PDB.	28
Tabla 5. Características de los modelos de las PPXs obtenidas a partir de cristales en comparación con la PPX _{Af}	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo del posible papel de los PoliP en los mecanismos de resistencia a metales propuestos para <i>A. ferrooxidans</i>	3
Figura 2. Estructura cristalográfica de la PPX de <i>E. coli</i> (PDB ID: 1U6Z).....	7
Figura 3. Clonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>E. coli</i> en el vector pET28aTEV	22
Figura 4. Clonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en el vector pET28bTEV	23
Figura 5. Clonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en el vector pMAL-c5X.....	24
Figura 6. Purificación de rPPX _{Ec} a partir del vector pET28aTEV con el gen <i>ppx</i> de <i>E. coli</i> mediante cromatografía de afinidad por Ni inmovilizado.....	25
Figura 7. Purificación de rPPX _{Af} a partir de pET28bTEV con el gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i> mediante cromatografía de afinidad por Ni inmovilizado	26
Figura 8. Purificación de rPPX _{Af} a partir del vector pMAL-c5X con el gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i> mediante cromatografía de afinidad por amilosa	27
Figura 9. Estructura y superficie electrostática de las PPXs cristalizadas depositadas en Protein Data Bank	29
Figura 10. Alineamiento de un segmento de las secuencias de las PPXs de microorganismos acidófilos del consorcio biomínero	31
Figura 11. Árbol filogenético de las PPXs de acidófilos del consorcio biomínero	32
Figura 12. Comparación entre el modelo de PPX _{Af} y el modelo 1U6Z de PPX _{Ec}	36
Figura 13. Sitio activo de la PPX _{Af}	37
Figura 14. Residuos que componen los 2 tipos de túneles presentes en PPX _{Af}	38
Figura 15. Niveles de conservación de los residuos de PPX _{Af} en relación a otras PPXs	38
Figura 16. Posible sitio de unión a metales de PPX _{Af}	40
Figura 17. Posible sitio de unión a PoliP de PPX _{Af} modelado por Docking molecular..	42
Figura 18. Modelo propuesto para explicar el fenómeno de hidrólisis temprana de los PoliP en presencia de un estrés por Cu ²⁺ en <i>A. ferrooxidans</i>	53
Figura S1. Esquema del vector pET-28aTEV	63
Figura S2. Esquema del vector pMAL-c5X	64
Figura S3: Estructura secundaria del dominio PPX/GppA de los monómeros de las PPX cristalizadas depositadas en Protein Data Bank.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

A₂₆₀: absorbancia a 260 nm

ATCC: Colección Americana de Cultivos por Tipo, por sus siglas en inglés "American Type Culture Collection"

BSA: albúmina de suero de bovino por sus siglas en inglés "Bovine Serum Albumin"

dNTP: nucleósitos trifosfato de desoxirribosa por sus siglas en inglés "deoxyribose nucleoside triphosphate"

DO₆₀₀: densidad óptica medida a 600 nm

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético por sus siglas en inglés "ethylenediaminetetraacetic acid"

GppA: guanosina pentafosfato fosfohidrolasa

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

NCBI: Centro nacional de información biotecnológica por sus siglas en inglés "National Center for Biotechnology Information"

MBP: proteína de unión a maltosa por sus siglas en inglés "Maltose Binding Protein"

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés "Polymerase Chain Reaction"

PDB: Banco de datos de proteínas por sus siglas en inglés "Protein Data Bank"

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo por sus siglas en inglés "phenylmethylsulfonyl fluoride"

PoliP: polifosfato inorgánico

PoliP₁₅: polifosfato inorgánico de 15 residuos de fosfato de longitud

PoliP₇₀₀: polifosfato inorgánico de 700 residuos de fosfato de longitud



PPK: polifosfato quinasa

PPX: exopolifosfatasa

PPX_{Af}: exopolifosfatasa de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

PPX_{Ec}: exopolifosfatasa de *Escherichia coli*

RND: resistencia, nodulación y división celular

rpm: revoluciones por minuto

rPPX_{Af}: exopolifosfatasa recombinante de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

rPPX_{Ec}: exopolifosfatasa recombinante de *Escherichia coli*

str: cepa por el inglés "strain"

substr: subcepa derivada de la cepa original por el inglés "substrain"

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

RESUMEN

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria acidófila que forma parte del consorcio biominero y que es capaz de vivir en ambientes con altas concentraciones de metales. Esta bacteria acumula gránulos de polifosfatos inorgánicos (PoliP) que son polímeros lineales de residuos de ortofosfato unidos entre sí por enlaces fosfoanhídrido, a los cuales se les ha asignado múltiples funciones. Una de éstas es un posible papel en los mecanismos de resistencia a metales en bacterias y arqueas. Estudios previos de nuestro laboratorio han comprobado que cuando *A. ferrooxidans* se somete a un estrés por altas concentraciones de cobre, los niveles de PoliP disminuyen abruptamente en las primeras 4 h, sugiriendo que la degradación de éstos podría ser activada por el metal. La hidrólisis de los PoliP en *A. ferrooxidans* se lleva a cabo por la enzima exopolifosfatasa (PPX), la cual no se ha estudiado bioquímicamente y cuya estructura no se ha cristalizado o modelado previamente. El objetivo principal de este Seminario de Título fue caracterizar la PPX de *A. ferrooxidans* (PPX_{Af}) tanto bioquímica como bioinformáticamente.

En primer lugar, se clonó el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en los vectores de expresión pET28aTEV y pMAL-c5X y el gen *ppx* de *E. coli* en el plasmidio pET28aTEV. A pesar de que el clonamiento fue exitoso en todos los casos, la PPX_{Af} recombinante (rPPX_{Af}) se encontró formando cuerpos de inclusión, por lo que no se pudo purificar en el tiempo asignado para este Seminario de Título. Al comparar los dos sistemas de expresión, se obtuvo una mayor proporción de proteína soluble con la fusión entre la PPX_{Af} y la proteína de unión a maltosa. Por el contrario, la PPX de *Escherichia coli* recombinante (rPPX_{Ec}) se expresó de manera soluble y se purificó exitosamente mediante cromatografía de afinidad por níquel.

Luego, se realizó un estudio bioinformático de la PPX_{Af}. Se analizaron *in silico* las PPX de distintos organismos y se concluyó que éstas pueden diferir mucho, tanto en tamaño, carga de superficie como en estequiometría de sus subunidades. A continuación, se desarrolló un modelo por homología del dímero de la PPX_{Af}, el cual mostró un posible canal básico en la interfaz entre los dos monómeros. La PPX_{Af} tiene 4 dominios y su sitio activo se encontraría entre los dominios I y II, al igual que lo descrito para la PPX_{Ec}. Además, la PPX_{Af} aparentemente posee dos túneles que la atraviesan en la mitad del canal, uno de los cuales podría ser esencial para la unión del PoliP a la PPX_{Af} y el otro podría permitir el ingreso del posible cofactor metálico al sitio activo. El residuo His379 sería clave en la mantención de la estructura del túnel que atravesaría la proteína y podría también participar en un sitio adicional de unión a metales. Estos resultados y los antecedentes previos para la PPX_{Ec}, sugieren que los PoliP presentes en *A. ferrooxidans* se podrían unir a la PPX_{Af} a lo largo del canal básico, pasando a través del túnel para alcanzar el sitio catalítico e hidrolizar los PoliP en este microorganismo.

ABSTRACT

Acidithiobacillus ferrooxidans is an acidophilic bacterium that belongs to the bioleaching microbial consortia and is able to live in environments with high metal concentrations. These bacteria accumulate inorganic polyphosphate granules (PolyP) which are linear polymers of orthophosphate residues linked by phosphoanhydride bonds. Many different functions have been assigned to these polymers, such as a possible role in metal resistance mechanisms of bacteria and archaea. It has been previously shown in our laboratory that when *A. ferrooxidans* is shifted to the presence of a high Cu^{+2} concentration, PolyP levels decrease sharply in the first 4 h, suggesting that the degradation of PolyP could be activated by Cu^{+2} . PolyP hydrolysis in *A. ferrooxidans* is carried out by the enzyme exopolyphosphatase (PPX), which has not been biochemically characterized so far and it has not been crystallized or modelled yet. The main goal of this seminar was to characterize *A. ferrooxidans* PPX (PPX_{Af}) biochemically and bioinformatically.

First, the *ppx* gene of *A. ferrooxidans* was cloned into pET28aTEV and pMAL-c5X expression vectors and the *ppx* gene of *E. coli* was cloned in plasmid pET28aTEV. Although the cloning process was successful in all cases, the recombinant PPX_{Af} (rPPX_{Af}) formed inclusion bodies when expressed, preventing its purification during the allotted time for this Seminar. The cloning system that yield the greatest proportion of soluble rPPX_{Af} was the fusion protein between the enzyme and maltose binding protein. On the contrary, the recombinant PPX_{Ec} (rPPX_{Ec}) was expressed in a soluble form and was successfully purified by Ni-binding affinity chromatography

Then, the PPXs belonging to different organisms were analyzed *in silico* and it was concluded that PPXs can differ very much in terms of length, surface charge and the stoichiometry of its subunits. Subsequently, a homology model of a possible dimer was constructed for PPX_{Af} . This model had a basic groove along the interface between the

two monomers. As described for PPX_{Ec}, PPX_{Af} has 4 domains and its active site is situated between domains I and II. Additionally, PPX_{Af} is apparently crossed by two tunnels in the middle of the groove, one of them could be essential for PolyP binding and the other could allow the entrance of the metal cofactor to the active site. His379 could be a key aminoacid to maintain the structure of this tunnel across the protein and could also participate in an additional metal binding site. These results and the previous studies about PPX_{Ec} suggest that the PolyP molecules present in *A. ferrooxidans*, could bind to PPX_{Af} through the basic channel and across a possible tunnel in order to reach the catalytic site and hydrolyze PolyP in this microorganism.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Minería en Chile

Chile y Perú son los principales productores de cobre a nivel mundial (Schippers y cols, 2014). El segundo trimestre de 2016, el sector minero contribuyó en un 12,4% al producto interno bruto de Chile (Banco Central de Chile, 2016). En particular, un 90,5% de esos ingresos corresponden a la minería del cobre (Banco Central de Chile, 2016). La extracción de este metal se realiza tradicionalmente mediante pirometalurgia e hidrometalurgia. Una alternativa a estos procesos es la biolixiviación, la cual consiste en la solubilización de los minerales mediante oxidación biológica (Jerez, 2011). Esto ocurre como consecuencia del metabolismo de algunos microorganismos extremófilos, los que pueden utilizar las moléculas constituyentes de los minerales sulfurados como dadores de electrones para obtener energía. La biominería realizada en pilas es más ventajosa que la minería tradicional porque no requiere adición de energía externa, no produce emisiones gaseosas dañinas para la salud, permite obtener cobre a partir de minerales de baja ley y, por lo tanto, el costo asociado a este tipo de minería es menor (Rawlings, 2005; Jerez, 2011; Harrison, 2016). Sin embargo, la biolixiviación es un proceso más lento y puede producir contaminación con ácido y metales pesados en el sector donde se realiza, en forma de drenaje ácido de minas (Jerez, 2011; Jerez, 2012; Baker-Austin y Dopson, 2007; Johnson, 2014; Harrison, 2016).

1.2 Acidófilos en biominería

Los microorganismos que participan en el consorcio biominero son arqueas o bacterias, termófilas o mesófilas, que viven en condiciones extremas de pH (entre 1 y 3) y en altas concentraciones de metales (Jerez, 2012; Dopson y Holmes, 2014). A nivel metabólico, pueden ser autótrofos o heterótrofos, y generalmente son capaces de obtener electrones

a partir de minerales de hierro, de derivados oxidados del azufre o a partir de ambos (Rawlings, 2005; Johnson, 2014). Además, estos microorganismos se desarrollan en ambientes con altas concentraciones de metales como el cobre, las que pueden alcanzar de 30 a 90 mM en las pilas de biolixiviación y de hasta 300 mM cuando el proceso se realiza en tanques aireados (Orell y cols, 2010; Dopson y Holmes, 2014).

La diversidad de microorganismos que compone el consorcio varía según las condiciones en que se lleva a cabo el proceso de biolixiviación (Rawlings, 2005; Hedrich y Schippers, 2016). Se ha descrito que algunos de los géneros bacterianos presentes son *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*, *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* y *Sulfobacillus*. Por otra parte, en el caso de las arqueas, se encuentran de los géneros *Sulfolobus*, *Metallosphaera*, *Acidianus* y *Sulfisphaera* (Orell y cols, 2010; Dopson, 2016, Johnson, 2016).

Acidithiobacillus ferrooxidans es la bacteria más estudiada del consorcio biominero. Esta es una γ -proteobacteria gram-negativa, quimiolitautótrofa, mesófila y acidófila capaz de oxidar minerales de hierro y azufre (Valdés y cols, 2008). Se ha descrito que, a pesar de vivir en condiciones ácidas de pH, el citoplasma de la bacteria tendría un pH cercano a 6,5. La diferencia de pH entre el medio extracelular y el citoplasma permite que exista una fuerza protón motriz natural para los procesos energéticos de la célula (Baker-Austin y Dopson, 2007). Un aspecto destacable de este microorganismo es que se han aislado cepas capaces de vivir en ambientes con altas concentraciones de metales, por ejemplo, la concentración mínima inhibitoria máxima reportada para el Cu^{+2} es de 800 mM, para el Zn^{+2} de más de 1 M y para el Cd^{+2} de 500 mM (Navarro y cols, 2013); y se han reportado distintos mecanismos moleculares que podrían dar cuenta de estos fenotipos (Navarro y cols, 2009; Navarro y cols, 2013; Martínez-Bussenius y cols, 2016).

1.3 Mecanismos de resistencia a metales

1.3.1 Sistemas de transporte de iones

En *A. ferrooxidans* se han propuesto mecanismos de resistencia a metales relacionados con la expulsión de ellos de la célula (Orell y cols, 2010). Uno de ellos son los sistemas del tipo RND (Figura 1), los cuales consisten en un complejo proteico que actúa como un antiporter de protones y metales entre el citoplasma o el periplasma y el espacio extracelular (Kim y cols, 2011). En *A. ferrooxidans* se han descrito genes que codificarían para este tipo de transportadores relacionados con la resistencia a cobre (Navarro y cols, 2009) y cadmio (Gallardo, 2014; Chen y cols, 2015).

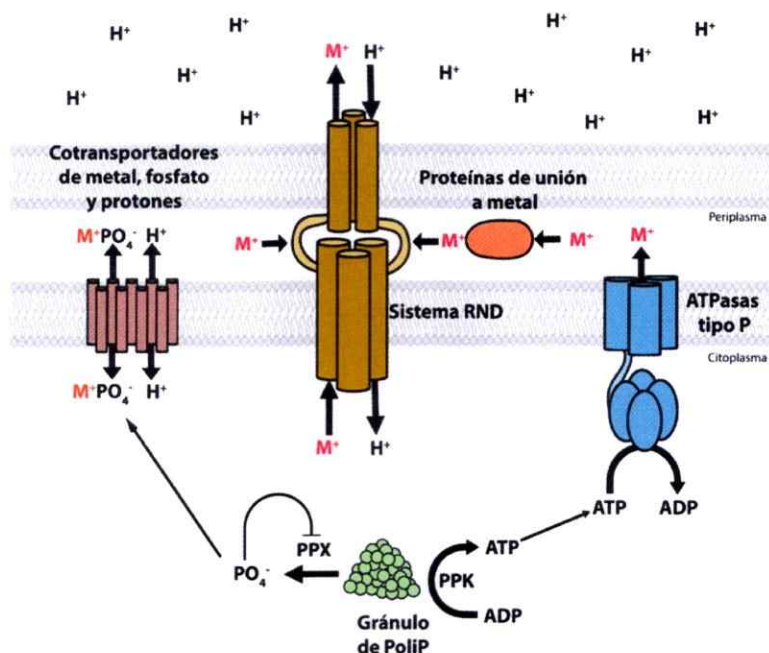


Figura 1. Modelo del posible papel de los PolIP en los mecanismos de resistencia a metales propuestos para *A. ferrooxidans*. La PPK forma ATP en presencia de exceso de ADP, que se puede utilizar por las ATPasas de tipo P. Por otra parte, la hidrólisis del PolIP por la PPX libera fosfato inorgánico que se podría usar por cotransportadores de metal y fosfato para movilizar el metal desde el citoplasma al periplasma. Los transportadores del tipo RND permiten el paso de metales tanto del citoplasma como del periplasma hacia el medio extracelular. Existen chaperonas periplasmáticas que pueden entregar los metales del periplasma al transportador RND o secuestrar los metales en el periplasma. Esta es una figura modificada a partir de Orell y cols (2012).

Un segundo determinante de resistencia a metales son las ATPasas (Figura 1) que utilizan la energía de hidrólisis del ATP en ADP para permitir el transporte de iones metálicos desde el citoplasma al periplasma (Argüello, 2003; Navarro y cols, 2009; Chan y cols, 2010; Raimunda y cols, 2011; Gallardo, 2014). Otra proteína que permite el paso de iones metálicos entre estos espacios subcelulares son los cotransportadores de fosfato y protones que acoplan el paso de estos últimos a través de la membrana interna con el paso de complejos de metales con fosfato inorgánico (Figura 1). En algunas especies, como *E. coli* (van Veen y cols, 1994) o *Metallosphaera sedula* (McCarthy y cols, 2014), se ha descrito que el transportador de fosfato inorgánico PitA constituiría un ejemplo de este tipo de proteínas. *A. ferrooxidans* no posee un gen ortólogo a *pitA*, sin embargo, posee un gen con alta identidad al que codifica para el transportador de fosfato PHO84 en *Saccharomyces cerevisiae* (Bun-Ya y cols, 1991), por lo que se ha propuesto que este posible Pho84 podría cumplir esa función en *A. ferrooxidans* (Álvarez y Jerez, 2004).

1.3.2 Polifosfatos inorgánicos

Un mecanismo adicional de resistencia a metales es aquel en el que participan los polifosfatos inorgánicos (PoliP). Éstos son polímeros lineales de residuos de ortofosfatos unidos por enlaces fosfoanhídrido que se han encontrado en organismos pertenecientes a todos los dominios de la vida (Kulaev y Vagabov, 1983). Estas moléculas se sintetizan enzimáticamente mediante la polifosfato quinasa (PPK) que cataliza la adición reversible del fosfato terminal del ATP a una molécula de pirofosfato o de PoliP ya existente, lo que forma un PoliP con un residuo más de largo (Rao y cols, 2008). Por otra parte, la degradación de los PoliP ocurre por la hidrólisis progresiva de los mismos mediante la enzima exopolifosfatasa (PPX) que libera residuos de fosfato inorgánico. Algunos microorganismos como *A. ferrooxidans* son capaces de acumular estas moléculas en

forma de gránulos en su citoplasma (Álvarez y Jerez, 2004; Orell y cols, 2012). La acumulación de PoliP también se ha correlacionado con la capacidad que tendrían algunos microorganismos para vivir en condiciones con altas concentraciones de cobre, como *Sulfolobus solfataricus*, *A. ferrooxidans*, *Sulfolobus metallicus* o *Sulfolobus acidocaldarius* (Álvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y cols, 2006; Orell y cols, 2012).

En nuestro laboratorio se comprobó que los niveles de estas moléculas en *A. ferrooxidans* ATCC 23770 disminuyen rápidamente al enfrentar a la bacteria a un estrés por 40 mM de CuSO_4 (Álvarez y Jerez, 2004). En el caso de la cepa ATCC 53993 del mismo microorganismo, se encontró un efecto análogo dentro de la primera hora al someterla a un estrés por 100 mM del mismo metal (Castillo, 2013). Más aún, al parecer la hidrólisis de los PoliP en un extracto total del microorganismo se activa al añadir entre 1 y 10 μM de CuSO_4 en la preparación (Álvarez y Jerez, 2004). Se ha propuesto un modelo donde los PoliP estarían involucrados entre los mecanismos de resistencia a metales antes mencionados (Figura 1). En primer lugar, en presencia de exceso de ADP, los PoliP podrían degradarse por la reacción reversa de la PPK. Esto formaría ATP que podría suplir de energía a las ATPasas de metales presentes en la membrana interna del acidófilo. Adicionalmente, los PoliP se podrían hidrolizar para liberar fosfato inorgánico, el cual podría formar un complejo con cationes divalentes como Cu^{2+} o Cd^{2+} y ser extruido al periplasma por PitA o PHO84. Éste último mecanismo podría ocurrir si la concentración de fosfato libre intracelular aumentara tanto que permitiera hacer favorable el eflujo al periplasma de los iones metálicos aún a expensas del gradiente natural de protones existente en el acidófilo. Finalmente, los iones metálicos podrían liberarse al medio extracelular desde el periplasma o el citoplasma gracias a los sistemas RND. Este modelo se propuso inicialmente para el cadmio en *E. coli* (Keasling, 1997) y para el cobre en *A. ferrooxidans* (Orell, y cols, 2010) y aún queda por comprobarse. Sin

embargo, recientemente, se demostró que los PoliP y el transportador de fosfato PitA constituyen un sistema funcional de resistencia a cobre en *E. coli* (Grillo-Puertas y cols, 2014).

1.4 Exopolifosfatasa

La PPX (EC:3.6.1.11) es una enzima que se caracteriza por contener el dominio PPX/GppA fosfatasa y que pertenece a la superfamilia de las quinasas de azúcares/actina/hsp70 (Reizer y cols, 1993). El gen que codifica para esta enzima se ha anotado en los genomas de múltiples especies. Estas fosfatasas podrían diferir mucho en términos de longitud y, por lo tanto, existen distintos tipos de PPXs (Albi y Serrano, 2014). La PPX que se ha estudiado más ampliamente es la de *E. coli* (PPX_{Ec}). En términos bioquímicos, las condiciones óptimas de catálisis de esta enzima requieren de 1 mM de Mg²⁺ y 175 mM de K⁺ (Akiyama y cols, 1993) y se ha descrito que la enzima se inhibiría *in vitro* por 20 mM de fosfato (Akiyama y cols, 1993). La PPX_{Ec} forma homodímeros en solución y se ha analizado la estructura tridimensional de su monómero cristalizado (Alvarado y cols, 2006; Rangarajan y cols, 2006). Cada monómero consta de 4 dominios (Figura 2A) y el sitio activo de la enzima se encontraría entre los dominios I y II. El dominio III sería el encargado de la dimerización de los monómeros. En términos de la interacción entre el PoliP y la enzima se han propuesto 2 modelos. El primero consiste en la unión del PoliP a lo largo de un canal básico que se forma en la interfaz entre los dos monómeros (Figura 2B), de tal manera, que la molécula alcance el sitio activo desde esa región (Rangarajan y cols, 2006). El segundo modelo, se basa en la presencia de un túnel ubicado en la interfaz de los monómeros, en particular, cerca del sitio activo (Figura 2C). El PoliP podría no sólo unirse a la enzima en el sector del túnel, sino que además podría atravesarla por allí y aproximarse al sitio activo por la parte

contraria al canal básico, en la interfaz entre los dominios I y II (Alvarado y cols, 2006; Boetsch y cols, 2016). Otros estudios han sugerido que la interacción entre la PPX y los PoliP sería por mecanismos similares a los que utilizan proteínas que se unen a ácidos nucleicos de hebra simple (Bolesch y Keasling, 2000a). Se ha descrito que, además de liberar residuos de fosfato inorgánico, la PPX_{Ec} podría producir moléculas de 2, 14 o 50 residuos de fosfato inorgánico (Bolesch y Keasling, 2000b). Esto sugiere que hay al menos 3 sitios donde el PoliP podría interactuar con la enzima, que estarían a 3, 15 y 50 residuos de fosfato de distancia del sitio activo. Además, la afinidad por el PoliP de cada sitio sería distinta, siendo el sitio de unión más fuerte el que estaría a 50 residuos de distancia del sitio activo.

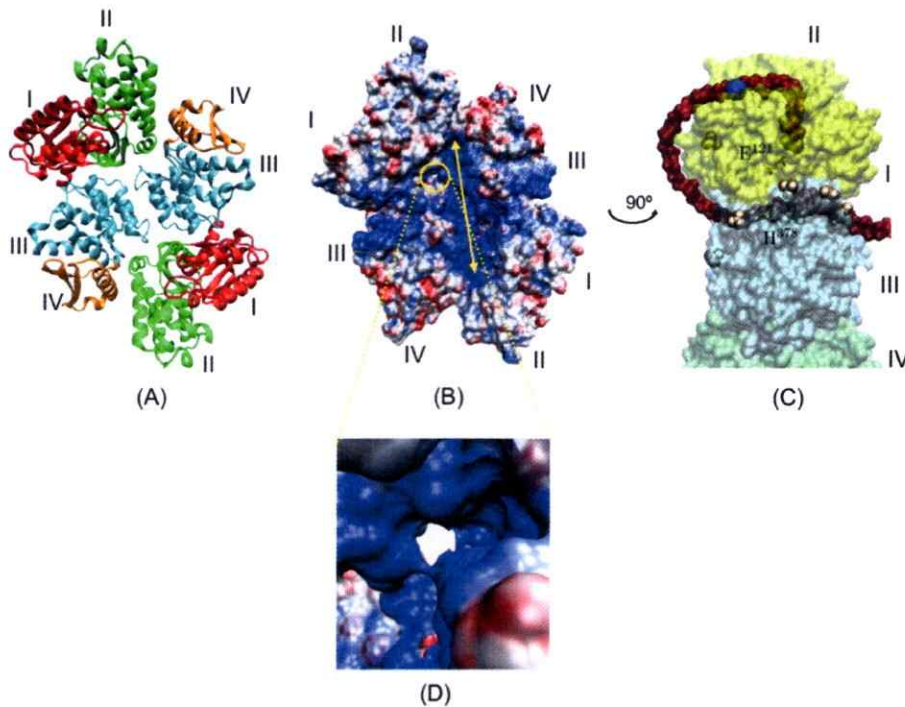


Figura 2. Estructura cristalográfica de la PPX de *E. coli* (PDB ID: 1U6Z). La PPX_{Ec} es un homodímero con 4 dominios cada uno, indicados con números romanos (A). En la interfaz entre los monómeros, el dímero de la PPX_{Ec} forma un canal básico, el que se indica en azul en la proteína y se resalta con una flecha amarilla (B), y también se forma un túnel que la atraviesa cerca del sitio activo (círculo amarillo en B y se detalla en D). Uno de los posibles mecanismos de unión del PoliP a la enzima sería a través de este túnel (C). El PoliP rodearía a la enzima y finalmente, la catálisis se llevaría a cabo en una cavidad entre los dominios I y II en el sector opuesto al canal básico de la enzima. La Figura 2C se modificó a partir de Boetsch y cols, 2016.

Se han caracterizado bioquímicamente las PPXs de las arqueas *S. solfataricus* (Cardona y cols, 2002) y *M. sedula* (Rivero, 2016). La temperatura óptima de las PPXs de estos hipertermófilos es de 65°C para *M. sedula* y entre 50°C y 60°C para *S. solfataricus*. En términos del requerimiento de iones, se obtuvo una actividad máxima de la PPX de *S. solfataricus* en presencia de 10 mM de MgCl₂ y, para la PPX de *M. sedula*, de 20 mM de MgCl₂. Sorprendentemente, se observó que la PPX de *M. sedula* se inhibía *in vitro* por fosfato a una concentración menor que la PPX_{Ec}. Además de estos 2 acidófilos, a pesar de que se ha descrito actividad PPX en otras bacterias y arqueas acidófilas (Vera y cols, 2003; Orell y cols, 2012), la enzima PPX no se ha caracterizado en otras especies de similares características.

En el caso particular de la PPX_{Af}, no se ha reportado ni su caracterización bioquímica ni algún modelo de la proteína que permitan entender mejor tanto los mecanismos de resistencia a metales como la regulación de los mismos en esta bacteria. Además, comprender las diferencias entre esta enzima y su homóloga en *E. coli* podría ayudar a entender las diferencias que existen entre los organismos acidófilos y neutrófilos con respecto al metabolismo de los PoliP.

1.5 Objetivo General

Caracterizar la actividad de la enzima exopolifosfatasa de *A. ferrooxidans* y compararla con la de *E. coli*.

1.6 Objetivos específicos

1. Clonar los genes *ppx* de *A. ferrooxidans* y *E. coli* en vectores de expresión.
2. Expresar y purificar las PPXs recombinantes de *A. ferrooxidans* y *E. coli*.
3. Analizar la actividad de las enzimas PPXs de *A. ferrooxidans* y *E. coli*.
4. Analizar las PPXs de *A. ferrooxidans* y *E. coli* bioinformáticamente.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas, plasmidios y condiciones de cultivo

Se utilizaron la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 y las cepas de *E. coli* TOP10, DH5 α y BL21(DE3) (Tabla 1). La primera se creció a 30°C con agitación a 150 rpm en medio 9K con hierro (0,4 g/L MgSO₄·7H₂O, 0,1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,04 g/L K₂HPO₄·3H₂O, 33,33g/L FeSO₄·7H₂O, pH 1,45). Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (5 g/L NaCl, 10 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura) a 37°C, tanto en cultivo líquido con agitación a 125 rpm como en placas, añadiendo al medio agar al 1,5%.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Nombre	Características	Referencia
<i>A. ferrooxidans</i>	ATCC 53993	ATCC
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 α	F- Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ - <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>fhuA2</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> <i>gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHI</i> Δ <i>EcoRI-B</i> <i>int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)</i> <i>i21</i> Δ <i>nin5</i>	New England Biolabs

Según los plasmidios utilizados (Tabla 2), se añadió al medio LB distintos antibióticos: 100 μ g/mL ampicilina, 100 μ g/mL carbenicilina y 50 μ g/mL kanamicina. El crecimiento de *A. ferrooxidans* se evaluó por recuento celular con una cámara Petroff-Hausser en un microscopio de contraste de fases y, en el caso de *E. coli*, por la medición de la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 6 (Thermo).



Tabla 2. Plasmidios utilizados.

Nombre plasmidio	Características	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de subclonamiento, Amp ^R	Promega
pET28aTEV	Vector de expresión, Km ^R	Novagen
pET28aTEV_ppx12	pET28a(+)-TEV con el gen <i>ppx</i> de <i>E. coli</i>	Este trabajo
pET28aTEV_ppxAfe	pET28a(+)-TEV con el gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	Este trabajo
pMAL-c5X	Vector de expresión, Amp ^R	New England Biolabs
pMAL-c5X_ppxAfe	pMAL-c5X con el gen <i>ppx</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	Este trabajo

2.2 Técnicas de biología molecular

2.2.1 Extracción de DNA genómico

Para la extracción del DNA de *A. ferrooxidans*, se creció la cepa ATCC 53993 hasta alcanzar la fase exponencial tardía. Las células se colectaron por centrifugación en frío durante 15 min a 3200 x g y se lavaron 2 veces con 700 µL de agua ácida a pH 1,45 y otras 2 veces con 700 µL de 10 mM citrato de sodio pH 7.

En el caso de *E. coli*, se crecieron las células de la cepa TOP10 en medio LB líquido por toda la noche. Se colectaron las células por centrifugación a 4°C y a 3200 x g por 15 min y se descartó el sobrenadante.

La extracción de DNA, en ambos casos, se realizó mediante Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.2 Cuantificación del DNA

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) con una placa para microvolúmenes Take3 (Biotek) en un espectrofotómetro para microplacas Epoch (Biotek).

2.2.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La electroforesis se desarrolló en geles con agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3) y se utilizó GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) para teñirlos. Se mezclaron las muestras con amortiguador de carga de DNA 6X (0,03% de azul de bromofenol, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6) en una proporción de 5:1 y posteriormente se aplicaron al gel. Como estándares de peso molecular se utilizaron los marcadores 1 kb (New England Biolabs), 1kb plus (New England Biolabs) o GeneRuler 1 kb plus (ThermoScientific). La electroforesis se llevó a cabo a 100 mV por tiempos de entre 20 y 45 min. Los geles se visualizaron mediante luz ultravioleta a 320 nm.

2.2.4 Diseño de oligonucleótidos

Para amplificar los genes de interés a partir del DNA genómico, se diseñaron partidores (Tabla 3) en base a las secuencias de los genomas de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (NCBI ID: NC_011206) y *E. coli* str. K-12 substr. MG1655 (NCBI ID: NZ_CP012868).

Tabla 3. Partidores utilizados para clonar los genes *ppx* de *E. coli* y *A. ferrooxidans*. Las secuencias subrayadas indican los sitios de restricción añadidos que pueden ser *XhoI* (rojo), *NheI* (verde), *NdeI* (azul), *NcoI* (rosado) y *BamHI* (morado)

Nombre partidor	Secuencia
PPXAfe reve	<u>CTCGAG</u> TTACCACTGCAGATGGAAATCCGGCGTGATCCA
PPXAfe fwe	<u>CCATGGG</u> TAGCAGAATCCGCAGCCACAG
Ppx12 TEVsen	<u>CATAIG</u> CCAATACACGATAAATCCCC
Ppx12 TEVanti	<u>CTCGAG</u> TTAAGCGGCGATTCTGGTG
pMAL_PPX_F	<u>CCATGC</u> AAATGGCAGAATCCGCAGCAACAGCAGGGCTCGAAAATTTCTGGCG
pMAL_PPX_R	<u>GGATCC</u> TTACCACTGCAGATGGAAATCCGGCGTGATCC ATTCCTG

Se utilizaron los software Geneious R9 (Kearse y cols, 2012) y Oligoanalyzer Versión 3.1 (IDT Oligo Analyzer, 2016) para su diseño. Los partidores se sintetizaron en la empresa

IDT (Integrated DNA Technology, www.idtdna.com). A los partidores se les añadió en el extremo 5' una secuencia de restricción para facilitar el clonamiento.

2.2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los genes *ppx* de *A. ferrooxidans* y *E. coli* se realizó en volúmenes de 50 μ L para el paso inicial de clonamiento y en 10 μ L para la verificación de la presencia de inserto. Para cada reacción se utilizaron 200 μ M de dNTP, 0,2 μ M de cada partidor, menos de 1 ng de templado, ya sea de DNA plasmidial o genómico, como lo recomiendan los fabricantes de la Taq polimerasa; un décimo del volumen de reacción de solución amortiguadora 10X y 25 U/mL de reacción de Taq DNA polimerasa (New England Biolabs). El programa que se utilizó fue de 94°C por 5 min inicialmente, seguido por 30 ciclos de 94°C por 20 s, 58°C o 51°C por 20 s, dependiendo de si se amplificaban las *ppx* de *A. ferrooxidans* o de *E. coli*, respectivamente; y 72°C por 1 min 40 s. Posteriormente, se finalizó con una extensión final a 72°C por 10 min.

2.2.6 Purificación de plasmidios y de fragmentos de DNA obtenidos por PCR

La purificación de los plasmidios se realizó utilizando GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific) o E.Z.N.A. Plasmid Miniprep kit I (Omega Bio-Tek). La purificación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR se llevo a cabo con E.Z.N.A. Gel Extraction kit (Omega Bio-Tek) o con UltraClean 15 DNA Purification kit (MoBio), siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

2.2.7 Digestión de DNA

Para digerir un fragmento de DNA se realizaron reacciones en volúmenes finales de hasta 50 μ L en los que se mezclaron entre 0,2 y 1,0 μ g de DNA, ya sea plasmidial o amplificados de PCR, con 1 μ L de la enzima de interés (New England Biolabs) y el amortiguador correspondiente a cada una. La mezcla de reacción se incubó durante 1 h

a 37°C y los resultados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. En el caso de digestión con más de una enzima, se realizó en tándem, es decir, se agregó la primera enzima y se dejó reaccionar por 1 h antes de añadir la segunda por 1 h también.

2.2.8 Ligación de fragmentos de DNA

En primer lugar, se cuantificó la concentración de los productos a ligar y se calculó la cantidad a agregar de cada uno con el programa NEBiolcalculator v1.5.0 con la herramienta Ligation Calculator (2016). En todos los casos se eligió la razón 1:3 entre vector e inserto. Se mezclaron los fragmentos a ligar con 1 µL de la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs), 1 µL de su solución amortiguadora respectiva y se completaron los 10 µL de reacción con agua. La reacción se incubó por 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C.

2.2.9 Preparación de *E. coli* quimiocompetentes

Se crecieron células de *E. coli* TOP10, DH5α o BL21(DE3) en 100 mL de medio LB a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. Posteriormente, las células se colocaron en un baño de hielo por 10 min y se centrifugaron a 2500 x g por 10 min a 4°C para colectar las células. A continuación, éstas se resuspendieron en 50 mL de 100 mM CaCl₂ estéril y se incubaron en hielo por 20 min. Luego, se centrifugó la muestra a 1500 x g por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 10 mL de 100 mM CaCl₂ con 20% de glicerol. Finalmente, las células se alicuotaron y almacenaron a -80°C.

2.2.10 Transformación de *E. coli* quimiocompetentes

La transformación de *E. coli* se realizó por el método del shock térmico. Éste consistió en mezclar 50 µL de células quimiocompetentes con 5 µL de un producto de ligación o de plasmidios y, luego, se incubó por 20 min en hielo. A continuación, se colocó la

muestra a 42°C por 45 s e inmediatamente se dejó en hielo por 5 min. Luego, se recuperaron las células con 900 µL de medio LB y se incubaron por 1 h a 37°C con agitación. Finalmente, se procedió a seleccionar las células. Para transformar las bacterias con un producto de ligación, se utilizaron placas de LB-agar conteniendo el antibiótico al cual el microorganismo se hace resistente cuando se ha transformado con el plasmidio en cuestión. En el caso del vector pGEM-T Easy (Promega) también se añadió 2 mM de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y 40 µg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal). Por el contrario, en el caso de transformaciones con plasmidios puros, éstos se seleccionaron en medio LB líquido con el antibiótico respectivo.

2.2.11 Clonamiento del gen *ppx* de *E. coli* en el vector pET28aTEV y del gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en los vectores pET28aTEV y pMAL-c5X

En primera instancia se ligaron amplificadores de los genes *ppx* de ambas especies en el vector lineal pGEM-T Easy, independientemente. Los productos de ligación se utilizaron para transformar cepas quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 o DH5α. De los clones obtenidos tras la transformación, se escogieron 4 a los que se les extrajo el DNA plasmidial. Con el fin de conocer la orientación que tenía el fragmento insertado en el vector, se realizó una digestión con *NdeI*, en el caso del clonamiento de la *ppx* de *E. coli* en el vector pET28aTEV, o con *NcoI*, para el caso de la *ppx* de *A. ferrooxidans* en el vector pMAL-c5X. De manera alternativa, la presencia del inserto en clones transformados con la *ppx* de *A. ferrooxidans* se comprobó mediante el protocolo OneStep, que consistió en resuspender las colonias transformantes en 40 µL de una solución que contenía sacarosa al 6%, 50 mM de Tris y una punta de espátula de azul de bromofenol. Luego, se agregaron 17 µL de fenol-cloroformo básico (fenol saturado

básico al 50%, cloroformo al 48% y alcohol isoamílico al 2%), seguidamente se aplicó vórtex vigorosamente por 15 s y se centrifugó por 2 min a 16100 x g. Posteriormente, el resultado se visualizó tras una electroforesis en geles de agarosa.

Se escogieron 3 clones transformantes de los pGEM-T Easy con el gen *ppx* de interés para cada una de las variantes a clonar. Los plasmidios se digirieron con enzimas de restricción para liberar al gen de interés y así poder ligarlo al vector final, previamente digerido con las mismas enzimas. En el caso de la *ppx* de *A. ferrooxidans*, se utilizaron las enzimas *NheI* y *XhoI* para el clonamiento en el vector pET28aTEV y *NcoI* y *BamHI* para pMAL-c5X. Por otra parte, se utilizaron las enzimas *XhoI* y *NdeI*, en el caso del gen *ppx* de *E. coli*. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en geles de agarosa y las bandas correspondientes a los productos deseados se extrajeron del gel. Los fragmentos digeridos de los genes *ppx* y de los vectores se ligaron y se transformaron en *E. coli* DH5 α o TOP10. Se purificaron los plasmidios de los clones transformantes y se comprobó la presencia del gen *ppx* por OneStep, por amplificación del mismo por PCR, utilizando las mismas condiciones con las que se amplificó inicialmente cada gen, y por digestión con las enzimas de restricción que se añadieron a los partidores.

2.3 Técnicas de análisis de proteínas

2.3.1 Cuantificación de proteínas

La medición de la concentración de proteínas se realizó con el método de Bradford (Bradford, 1976). Se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro de microplacas Epoch (Biotek). Se comparó la absorbancia de la muestra con la cuantificada para muestras de albúmina de suero de bovino (BSA) de concentración conocida.

2.3.2 Obtención de los extractos proteicos totales, soluble e insoluble

Para la producción de proteínas, se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3) con el plasmidio de interés y se seleccionaron por toda la noche con el antibiótico respectivo (100 mg/mL de ampicilina, 100 mg/mL de carbenicilina o 50 mg/mL de kanamicina). Posteriormente, se inoculó 1 mL de células por cada 100 mL de medio LB o medio LB con 0,2% de glucosa, para el caso del sistema de expresión con los vectores pMAL, hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. Se añadió 1 mM de IPTG y se incubó por 4 h antes de coleccionar las células por centrifugación por 15 min a 2000 x g a 4°C.

Luego, se resuspendieron las células en un décimo del volumen de cultivo inicial en solución amortiguadora de unión de PPX (20 mM Tris-HCl, 20 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM $MgCl_2$, 175 mM KCl, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pH 7) en el caso de las proteínas que contenían cola de histidina, o en solución amortiguadora pMAL (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) cuando la proteína a purificar consistía en la fusión de la PPX con la proteína de unión a maltosa (MBP). Las células en suspensión se rompieron por sonicación en un baño de hielo con un equipo Q500 sonicador (QSonica) por 20 a 40 min, con una amplitud del 30%, en pulsos de 20 s de sonicación y 40 s de descanso. Posteriormente, se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 3200 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante resultante de ese paso se denominó "extracto total". A continuación, se separaron las fracciones solubles e insolubles por centrifugación a 16100 x g por 20 min a 4°C. El sobrenadante resultante se denominó "extracto total soluble" y las proteínas sedimentadas se denominaron "extracto total insoluble" o "cuerpos de inclusión".

2.3.3 Purificación de proteínas

La purificación de proteínas se realizó mediante 2 métodos, según el sistema de clonamiento utilizado.

En primer lugar, se realizó cromatografía por afinidad a níquel para la PPX_{Ec} y la PPX_{Af} cuyos genes se encontraban clonados en el vector pET28aTEV. Se utilizó 1 mL de la resina Profinity IMAC Ni-charged resin (Biorad) y la columna Prepacked Gravity Flow Columns for Ion Exchange (Biorad). Se equilibró la columna con 10 volúmenes de solución amortiguadora de unión de PPX sin PMSF y, al verificar que la resina se encontrara bien empacada se aplicó el extracto total de proteínas solubles. Luego, se añadieron a la columna 10 volúmenes de solución amortiguadora de unión de PPX sin PMSF. Finalmente, se añadieron 5 volúmenes de solución de elución PPX (20 mM Tris-HCl pH 7, 500 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂, 175 mM KCl) y se colectaron fracciones por cada 250 µL que se elúan de la columna. Se cuantificaron las proteínas de cada fracción y se juntaron todas aquellas que tuvieran una concentración mayor a 0,1 mg/mL.

Por otra parte, se purificó la PPX_{Af} mediante cromatografía por afinidad a amilosa, ya que el gen de esta enzima se clonó en el vector pMAL-c5X que permite la expresión de la proteína de interés con la proteína de unión a maltosa (MBP), la que se retiene en una columna de amilosa. Se utilizó 1 mL de resina de amilosa (New England Biolabs) en las mismas columnas descritas para la cromatografía por afinidad de níquel. Inicialmente, se empacó y equilibró la resina al aplicar 5 volúmenes de solución amortiguadora pMAL sin PMSF. A continuación, se aplicó el extracto total soluble y se lavó la columna con 12 volúmenes del mismo amortiguador. Finalmente, se añadieron 5 mL de solución amortiguadora de elución pMAL (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltosa) y se colectaron las fracciones eluidas de la misma manera que en el caso anterior. En todos los casos, se añadió glicerol en un 50% a las eluciones para evitar que se agregaran las proteínas y se almacenaron a -20°C.

2.3.4 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). En primera instancia, éstas se mezclaron en una proporción de 3:1 con amortiguador de carga de proteínas 4X (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 50% glicerol, 15% β -mercaptoetanol y 0,02% de azul de bromofenol), se calentaron a 90°C por 10 min, se incubaron en hielo por 3 min y se centrifugaron a 10000 x g por 5 s para sedimentar lo que aún permaneciera insoluble antes de aplicar la muestra en el gel. Se aplicaron entre 10 y 15 μ g de proteínas totales por muestra en cada carril del gel.

El gel de corrida contenía 0,1 mL de glicerol al 50%, 1,25 mL de buffer de corrida (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 y SDS al 9,4%), 1,2 mL o 1,65 mL de acrilamida-bisacrilamida 30:0,8, dependiendo si el gel era al 7% o al 10%; 2,5 μ L de TEMED, 25 μ L de persulfato de amonio al 10% y agua destilada hasta completar un volumen de 5 mL. El gel concentrador, a su vez, estaba formado por 1,45 mL de agua bidestilada, 0,63 mL de buffer concentrador (Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8 y SDS al 0,4%), 0,43 mL de acrilamida-bisacrilamida 30:0,8, 4 μ L de TEMED y 15 μ L de persulfato de amonio al 10%. Se utilizó el marcador de peso molecular Perfect Protein (Novagen).

La electroforesis se llevó a cabo a 75 V por 45 min o hasta que el colorante del amortiguador de carga ingresara al gel de corrida y luego se corrió a 150 V hasta que el indicador llegara al final del gel. Posteriormente, los geles se fijaron por 30 min con solución de fijación de proteínas (40% de etanol y 10% de ácido acético) y se tñeron toda la noche con solución de tinción con azul de Coomassie G250 (1,28 M sulfato de amonio, 0,5% de ácido acético, 34% de metanol, 1 g/L azul de Coomassie G250). Finalmente, los geles se destñeron con agua destilada.

2.4 Métodos bioinformáticos

2.4.1 Análisis de proteínas

La búsqueda de las estructuras de proteínas se realizó utilizando la base de datos PDB (Berman y cols, 2000). Dentro de las características anotadas en esa base de datos se encuentran el número de aminoácidos, la estequiometría de oligomerización de las proteínas, el detalle de la unión de ciertas moléculas a las estructuras y la resolución cristalográfica de los modelos. Para buscar proteínas homólogas se utilizó el programa BLASTp (Johnson y cols, 2008).

La comparación y alineamiento entre varias secuencias de proteínas se realizó con ClustalX (Larkin y cols, 2007). La misma aplicación se usó también para construir árboles filogenéticos, utilizando el algoritmo Neighbor-Joining (Saltou y Nie, 1987), que se visualizaron con el software Dendroscope (Huson y Scornavacca, 2012). La búsqueda de dominios en las proteínas se hizo con la base de datos Pfam (Finn y cols, 2016).

La visualización de los resultados se realizó con el programa VMD (Humphrey y cols, 1996). Se utilizó la herramienta MultiSeq y en particular la opción STAMP del software VMD para realizar alineamiento estructural múltiple entre distintas secuencias (Roberts y cols, 2006). La carga electrostática de superficie se calculó con la plataforma PDB2PQR (Dolinsky y cols, 2004) en conjunto con el software APBS (Baker y cols, 2001). Los cálculos se realizaron con el campo de fuerza AMBER, suponiendo que el ambiente donde se encuentra la proteína tiene pH 7. Este software utiliza la herramienta PROPKA (Olsson y cols, 2011) para calcular los valores pKa de las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína.

Para evaluar el grado de conservación evolutivo que tienen las proteínas, se utilizó el programa ConSurf (Ashkenazy y cols, 2016). Esta herramienta permite asignar un valor de 1 a 9 a cada aminoácido según cuán conservado se encuentra, donde 1 significa que

esa posición es muy variable y 9 que casi siempre el mismo aminoácido se encuentra allí. Para ello, esta herramienta busca en la base de datos las 200 proteínas más similares a la secuencia de interés mediante BLASTp (Johnson y cols, 2008), las alinea y calcula el nivel de conservación de cada aminoácido.

La búsqueda de sitios de unión a metales se llevó a cabo con la plataforma MetalDetector v2 (Passerini y cols, 2011).

2.4.2 Modelamiento de proteínas

El modelamiento de PPX_{Af} se realizó con el programa Modeller v9.16 (Webb y Sali, 2016). Se fijó la posición de los aminoácidos Asp146, Gly148, Ser151 y Glu153 de PPX_{Af} y sus homólogos en 1U6Z en el alineamiento correspondiente y se eliminaron los aminoácidos de esa posición en el modelo 2FLO. Como los templados 1U6Z y 2FLO comenzaban en el aminoácido 12 de la proteína, la PPX_{Af} modelada comenzaba en el residuo 12 de la misma. Los modelos generados de PPX_{Af} se revisaron con el software Verify3d (Bowie y cols, 1991; Lüthy y cols, 1992), donde el mejor resultado obtenido tenía un 95,53% de los aminoácidos en una conformación aceptada en comparación con las proteínas que se encontraban en la base de datos del programa.

2.4.3 Docking molecular

Uno de los requisitos que se necesitan para realizar docking es tener la estructura de los posibles ligandos. En primer lugar, se buscó en la base de datos PubChem (Kim y cols, 2016) la existencia de ácido trifosfórico (PubChem CID: 983). No se pudo encontrar moléculas de PoliP de más de 3 residuos de fosfato inorgánico, por lo que se dibujaron las moléculas de PoliP de 15 residuos con el software ChemDraw (2015).

Para realizar el docking, se utilizó la interfaz gráfica AutoDockTools basada en Python (Sanner, 1999) y los programas autogrid, autodock y autodockvina 1 (Trott y Olson, 2010).

3. RESULTADOS

3.1 Clonamiento de los genes *ppx* de *A. ferrooxidans* y *E. coli* y expresión de sus proteínas en *E. coli*.

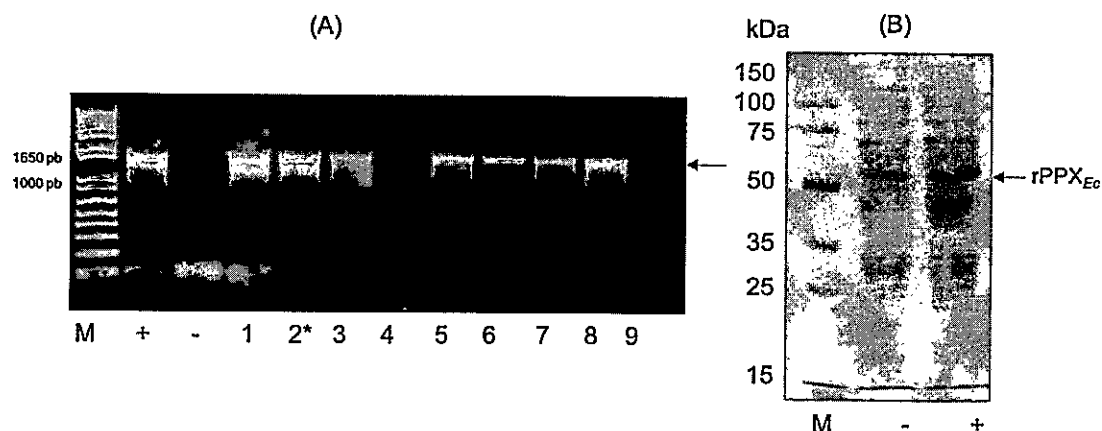
Para caracterizar bioquímicamente y comparar las enzimas PPX_{Af} y PPX_{Ec}, se realizó el clonamiento de los genes de las mismas con el fin de expresarlos y purificar las enzimas recombinantes.

3.1.1 Clonamiento del gen *ppx* de *E. coli* en el vector pET28aTEV.

La PPX_{Ec} se ha sobreexpresado en distintos vectores y purificado exitosamente en trabajos previos (Akiyama y cols, 1993; Alvarado y cols, 2006; Rangarajan y cols, 2006; Boetsch y cols, 2016) por lo que se utilizó una estrategia similar a la planteada en esos trabajos. El vector en el cual se clonó el gen *ppx* de *E. coli* fue el pET28aTEV (Figura S1 del Material Complementario), el cual permite comandar la expresión del gen de interés con el promotor T7 e inducir su expresión mediante IPTG. Además, al clonar en este vector se añadió una secuencia que codificaba para 6 histidinas en tándem al gen de interés, lo que permite la purificación de la enzima por cromatografía de afinidad por níquel inmovilizado.

Luego del clonamiento, se obtuvieron 9 clones a los cuales se les analizó la presencia del inserto correspondiente mediante PCR, utilizando partidores que flanqueaban al gen de interés (Figura 3A). Se consideró que la amplificación de un fragmento de 1545 pb correspondía al vector pET28aTEV con el gen de la *ppx* de *E. coli*. Posteriormente, se analizó la expresión de la proteína. Para ello se transformó el vector en cepas de *E. coli*

BL21(DE3), las cuales se crecieron hasta una DO_{600} de 0,6 a 37°C y luego se incubaron por 3 h a la misma temperatura con 1 mM de IPTG. Las células se lisaron mediante sonicación y las proteínas se visualizaron en el extracto total por electroforesis en geles de poliacrilamida (Figura 3B). Se observó que los extractos totales de las células que



contenían el vector en cuestión presentaban una proteína de 58 kDa que no se encontraba en los extractos de células con el vector pET28aTEV vacío. Estos resultados sugieren que esta estrategia fue exitosa para lograr la expresión de $rPPX_{Ec}$.

Figura 3. Clonamiento del gen *ppx* de *E. coli* en el vector pET28aTEV. (A) Verificación por PCR de la presencia del gen *ppx* de *E. coli* en los plasmidios pET28aTEV con el gen clonado. Se utilizó como control positivo el mismo amplificado obtenido para realizar el clonamiento (+) y como control negativo se utilizó agua en lugar de DNA molde (-). Se empleó el marcador de tamaño 1 kb plus (Invitrogen). Los números representan distintos clones analizados, el asterisco indica el clon que se utilizó para continuar con los análisis y la flecha indica el tamaño esperado del gen *ppx* de *E. coli*. (B) Expresión de $rPPX_{Ec}$ en la cepa de expresión de *E. coli* BL21 transformada con los clones de pET28aTEV con el gen de la proteína respectiva. Los carriles corresponden a los extractos obtenidos a partir de células transformadas con el vector pET28aTEV sin inserto (-) y con el gen *ppx* de *E. coli* (+). El marcador de peso molecular que se utilizó fue el Perfect Protein® Marker (Merck).

3.1.2 Clonamiento del gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en el vector pET28aTEV.

No existen en la actualidad herramientas de biología molecular efectivas en *A. ferrooxidans*, por lo que se decidió sobreproducir la PPX_{Af} por expresión heteróloga en *E. coli*. En la literatura, no se encuentran antecedentes exitosos del clonamiento y purificación de esta enzima. Por el contrario, se han reportado casos donde la proteína

sobreproducida se encontraba insoluble en cuerpos de inclusión (Álvarez y Jerez, 2004). Se clonó el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en el vector pET28aTEV (Figura 4). Se obtuvieron 8 clones que presentaban el inserto deseado comprobado mediante PCR, obteniéndose en cada caso la amplificación de un fragmento de 1525 pb (Figura 4A).

Al analizar la expresión de la proteína, en el extracto total de proteínas solubles apenas se observó la presencia de la rPPX_{Af}, ya que la gran mayoría se encontraba insoluble, formando cuerpos de inclusión (Figura 4B). Considerando que la insolubilidad de la rPPX_{Af} se puede deber a que ésta se encuentra mal plegada, era muy probable que no tuviera actividad detectable. Por lo tanto, se decidió utilizar una estrategia distinta para optimizar la solubilidad de la enzima.

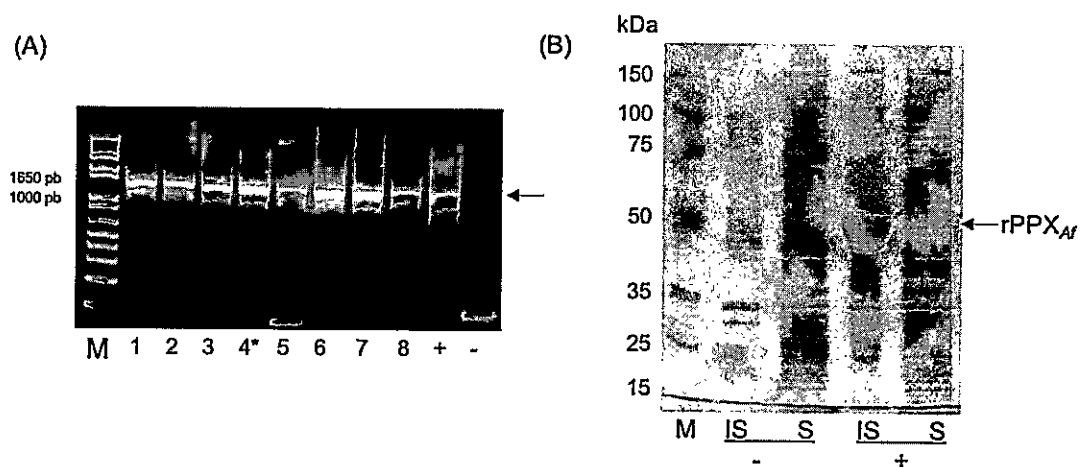


Figura 4. Clonamiento del gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en el vector pET28bTEV. (A) Verificación por PCR de la presencia del gen en los plasmidios pET28aTEV con el gen clonado. Se utilizó como control positivo el mismo amplificado obtenido para realizar el clonamiento (+) y como control negativo se utilizó agua en lugar de DNA molde (-). Se empleó el marcador de tamaño 1 kb plus (Invitrogen). Los números representan distintos clones analizados, el asterisco indica el clon que se utilizó para continuar con los análisis y la flecha indica el tamaño esperado del gen *ppx* de *A. ferrooxidans*. (B) Expresión de rPPX_{Af} en la cepa de expresión de *E. coli* BL21 transformada con los clones de pET28aTEV con el gen de la proteína respectiva. Los carriles corresponden a los extractos obtenidos a partir de células transformadas con el vector pET28aTEV sin inserto (-) y con el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* (+). Con S se indica la fracción de proteínas soluble y con IS se indica la que se encontraba insoluble. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el Perfect Protein® Marker (Merck).

3.1.3 Clonamiento del gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en el vector pMAL-c5X

Para evitar la formación de cuerpos de inclusión en la producción de proteínas recombinantes se han desarrollado múltiples estrategias (Rosano y Ceccarelli, 2014). Una de ellas consiste en construir una proteína de fusión entre la proteína de interés y la proteína de unión a maltosa (MBP), ya que se ha reportado que esta última promueve la solubilidad de la primera (Kapust y Waugh, 1999). Cabe mencionar que previamente se han logrado expresar las dos PPX-GppA de *Mycobacterium tuberculosis* con este sistema (Choi y cols, 2012).

Con esos antecedentes, se clonó el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en el vector pMAL-c5X (Figura S2 del Material Complementario), el cual permite crear una proteína de fusión entre la rPPX_{Af} y la MBP. Además, la expresión de esta fusión se dirige bajo el promotor *tac* y su expresión se induce con IPTG. Se obtuvieron 2 clones del vector pMAL-c5X que contenían el gen de interés, lo que se comprobó mediante PCR (Figura 5A).

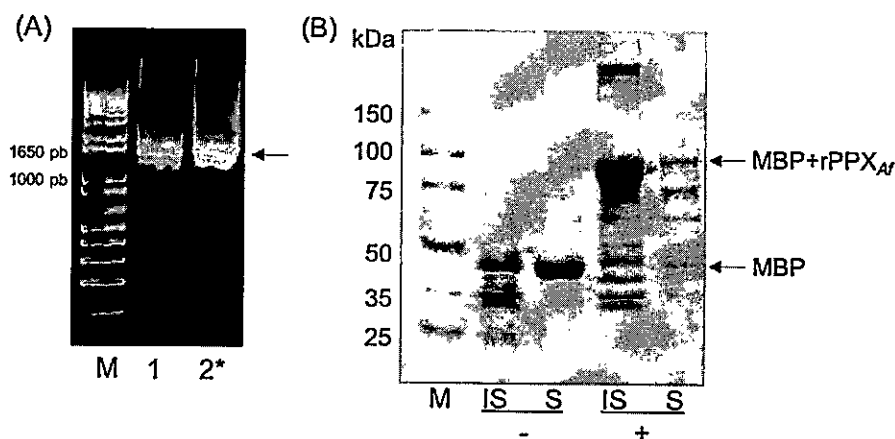


Figura 5. Clonamiento del gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en el vector pMAL-c5X. (A) Verificación por PCR de la presencia del gen *ppx* de *A. ferrooxidans* en los plasmidios pMAL-c5X. Se utilizó el marcador de tamaño 1 kb plus (Invitrogen). Los números representan distintos clones analizados y en asterisco se indica el clon que se utilizó para continuar con los análisis. (B) Expresión de rPPX_{Af} en la cepa de expresión de *E. coli* BL21 transformada con los clones de pMAL-c5X_ *ppx*Afe. Los carriles corresponden a los extractos obtenidos a partir de células transformadas con el vector pMAL-c5X sin inserto (-) y con el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* (+). Con S se indica la fracción de proteínas soluble y con IS se indica la que se encontraba insoluble. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el Perfect Protein® Marker (Merck).

Por otra parte, a pesar de que al evaluar la expresión de la proteína soluble en este sistema se observaba una fracción mayor comparando con el caso del vector pET28aTEV, la gran mayoría de la rPPX_{Af} también se encontraba insoluble en los cuerpos de inclusión (Figura 5B). Por lo tanto, la fusión entre la MBP y la PPX_{Af} no es suficiente para que la segunda proteína se mantenga soluble.

3.2 Purificación de las enzimas recombinantes PPX de *A. ferrooxidans* y *E. coli*

3.2.1 Purificación de la PPX recombinante de *E. coli*

A continuación, se procedió a purificar la rPPX_{Ec} mediante cromatografía por afinidad por níquel inmovilizado (Figura 6). A partir de 100 mL de cultivo de *E. coli* BL21(DE3) con el plasmidio pET28aTEV que contiene la *ppx* de *E. coli*, se obtuvieron 3,23 mg de proteínas. En el eluido de la columna, se observó la presencia mayoritaria de sólo una proteína con el peso molecular correspondiente a rPPX_{Ec} (58 kDa).

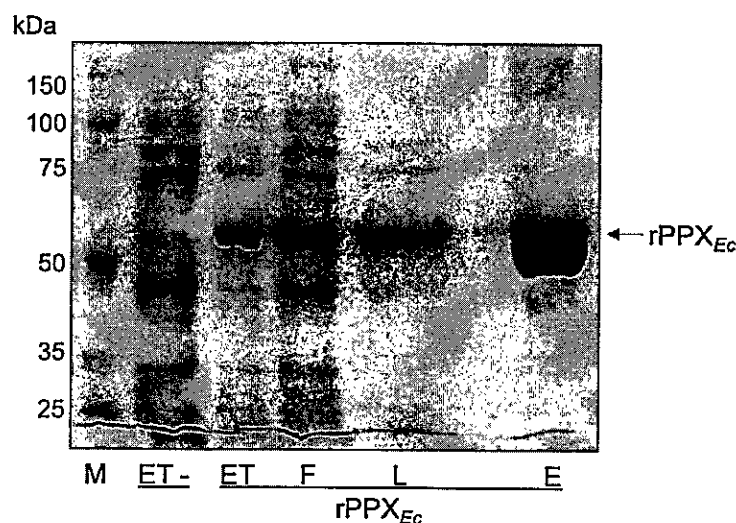


Figura 6. Purificación de rPPX_{Ec} a partir del vector pET28aTEV con el gen *ppx* de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad por Ni inmovilizado. Los carriles indican, de izquierda a derecha, el marcador de peso molecular Perfect Protein® (Merck), el extracto total soluble obtenido de células transformadas con el vector pET28aTEV (ET -), el extracto total soluble obtenido de células transformadas con el vector pET28aTEV con el gen de interés (ET rPPX_{Ec}), el frente obtenido luego de pasar la muestra por la columna (F), el lavado de la columna (L) y finalmente, la elución de la misma (E).

3.2.2 Purificación de la PPX recombinante de *A. ferrooxidans*

En el caso de la PPX_{Af} se especuló que, como al parecer no toda la proteína se encontraba formando cuerpos de inclusión, se podía obtener enzima pura a partir de mayores volúmenes de cultivo (500 mL). Para purificar la enzima se utilizó el constructo del gen *ppx* en el vector pET28aTEV y se realizó, al igual que en el caso de la $rPPX_{Ec}$, mediante cromatografía de afinidad por níquel inmovilizado. A pesar de que se logró purificar una cantidad muy baja de $rPPX_{Af}$, ésta co-eluyó junto con al menos 5 proteínas y no era la más abundante entre ellas (Figura 7). Las proteínas que co-eluyeron podrían tener una serie de histidinas en tándem que emulen naturalmente a la cola de histidina o podrían tener afinidad por la $rPPX_{Af}$.

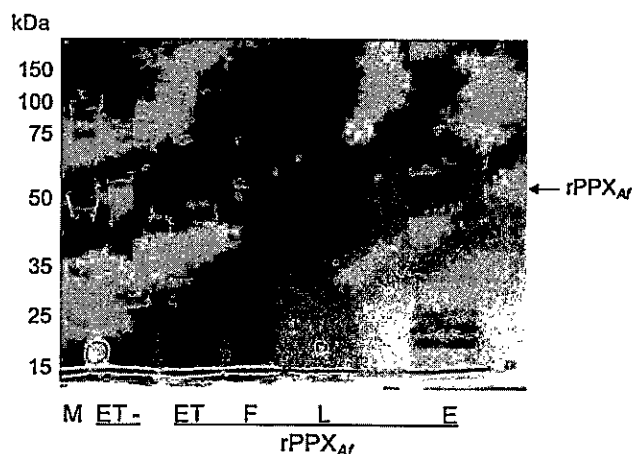


Figura 7. Purificación de $rPPX_{Af}$ a partir de pET28bTEV con el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* mediante cromatografía de afinidad por Ni inmovilizado. Los carriles indican, de izquierda a derecha, el marcador de peso molecular Perfect Protein® (Merck) (M), el extracto total soluble obtenido de células transformadas con el vector pET28aTEV (ET -), el extracto total soluble obtenido de células transformadas con el vector pET28aTEV con el gen de interés (ET $rPPX_{Af}$), el frente obtenido luego de pasar la muestra por la columna (F), el lavado de la columna (L) y finalmente, la elución de la misma (E).

Posteriormente, se intentó purificar la $rPPX_{Af}$ desde *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector pMAL-c5X con el gen en cuestión. En este caso, se utilizó cromatografía de afinidad por amilosa para realizar la purificación. Con este vector, se obtuvo una mayor cantidad de $rPPX_{Af}$ en la fracción eluída y también se obtuvieron otras proteínas que co-

eluyeron, aunque en este caso la razón entre la proteína deseada y las demás llegó a ser cercana a la mitad (Figura 8). Además, se observó una banda de proteínas que coeluyeron de aproximadamente 50 kDa, las que podrían corresponder a la MBP y a la rPPX_{Af}, es decir, a productos de degradación de la proteína de fusión. Las estrategias utilizadas en este trabajo para purificar la rPPX_{Af} no fueron exitosas en su totalidad, por lo que se requerirán análisis más exhaustivos para lograr este objetivo completamente.

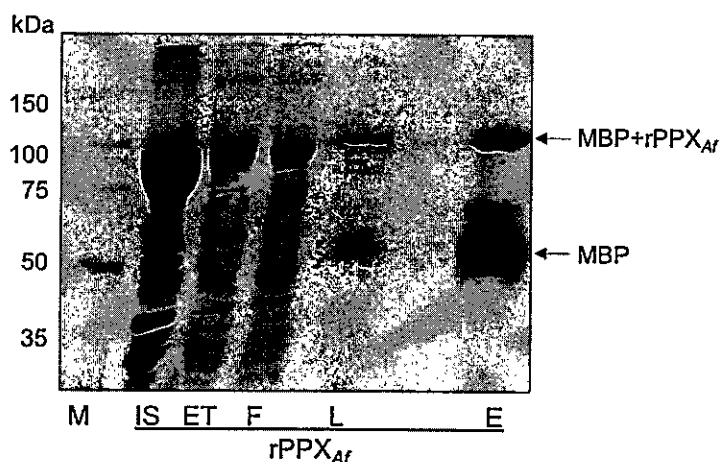


Figura 8. Purificación de rPPX_{Af} a partir del vector pMAL-c5X con el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* mediante cromatografía de afinidad por amilosa. Los carriles indican, de izquierda a derecha, el marcador de peso molecular Perfect Protein® (Merck) (M), el extracto insoluble total obtenido de células transformadas con el vector pMAL-c5X con el gen de interés (IS), el extracto total soluble de las mismas (ET), el frente obtenido luego de pasar la muestra por la columna (F), el lavado de la columna (L) y finalmente, la elución de la misma (E).

3.3 Análisis bioinformático de las PPXs de *A. ferrooxidans* y *E. coli*

Dadas las complicaciones de la purificación y para cumplir con el tiempo asignado para el Seminario de Título, se decidió realizar un estudio bioinformático detallado de la estructura de la PPX_{Af}.

3.3.1 Comparación de las estructuras de PPXs cristalizadas en la base de datos PDB

En primera instancia, se buscaron en la base de datos Protein Data Bank (Berman y cols, 2000) todas las estructuras cristalizadas existentes hasta la fecha de PPXs. Se

encontraron solamente 13, provenientes de 8 especies distintas, anotadas como PPXs en la base de datos (Tabla 4). La mayoría de estas proteínas son de origen bacteriano. De hecho, solamente se encontraron depositadas 3 PPXs de origen eucarionte provenientes de *S. cerevisiae* (PDB ID: 2QB6, 2QB7 y 2QB8).

Tabla 4. Características de las PPXs cristalizadas y depositadas en la base de datos PDB.

Código PDB	Código Uniprot	Especie	Número de aminoácidos estructura depositada	Estequiometría	Posición dominio PPX/GppA	Presencia Canal Básico	Presencia agujero
4PY9	Q64PD9	<i>Bacteroides fragilis</i>	343	Monómero	No	No	Sí
3RF0	Q7CJK2	<i>Yersinia pestis</i>	209*	Monómero	27-309	No	No
3MDQ	Q11YA9	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	315	Monómero	19-308	No	No
3HI0	A9CJF9	<i>Agrobacterium fabrum</i>	508	Dímero	35-308	"Bolsillos"	No
3CER	Q8G5J2	<i>Bifidobacterium longum</i>	343	Monómero	22-323	No	No
2QB6	P38698	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	397	Monómero	1-397	No	No
2QB7	P38698	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	397	Monómero	1-397	No	No
2QB8	P38698	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	397	Monómero	1-397	No	No
2FLO	P0AFL8	<i>Escherichia coli</i>	524	Dímero	26-309	Sí	Sí
1U6Z	P0AFL6	<i>Escherichia coli</i>	513	Dímero	26-309	Sí	Sí
2J4R	O67040	<i>Aquifex aeolicus</i>	308	Monómero	24-309	No	Sí
1T6C	O67040	<i>Aquifex aeolicus</i>	315	Monómero	24-309	No	Sí
1T6D	O67040	<i>Aquifex aeolicus</i>	315	Monómero	24-307	No	No

*La PPX de *Y. pestis* contiene 514 aminoácidos, sin embargo, la estructura depositada contiene sólo 209 aminoácidos que no forman parte del dominio PPX/GppA de la proteína.

Además, no todas las PPXs cristalizadas tienen la misma estequiometría de asociación, ni la misma cantidad de aminoácidos. Las PPXs de *E. coli* (PDB ID: 1U6Z y 2FLO) y de *Agrobacterium fabrum* (PDB ID: 3HI0) tienen alrededor de 500 aminoácidos y son dímeros, mientras que las enzimas de *Bacteroides fragilis* (PDB ID: 4PY9), *Yersinia pestis* (PDB ID: 3RF0), *Cytophaga hutchinsonii* (PDB ID: 3MDQ), *Bifidobacterium longum* (PDB ID: 3CER) y *Aquifex aeolicus* (PDB ID: 1J4R, 1T6C y 1T6D) tienen entre 200 y 350 aminoácidos y están anotadas como monómeros (Tabla 4). En el caso de *S. cerevisiae*, las proteínas tienen alrededor de 400 aminoácidos y también se han descrito

como monómeros en la base de datos. Previamente, los autores de los trabajos de cristalografía de la PPX_{Ec} habían propuesto que esta enzima tenía un largo canal básico que se formaba en la interfaz de las dos subunidades del dímero (Rangarajan y cols, 2006) y que tenía un túnel en la mitad del canal por donde podría pasar el PoliP (Alvarado y cols, 2006; Boetsch y cols, 2016). Sin embargo, en el caso de la estructura cristalográfica de la PPX de *S. cerevisiae* no se había observado la misma característica (Ugochukwu y cols, 2007). Es por ello que, en vista de las diferencias encontradas en las PPXs de la base de datos, surge la pregunta de si el mecanismo por el cual se unen éstas al PoliP es el mismo que el propuesto para la PPX_{Ec}. Para ello, se calculó la carga de la superficie de cada una de las PPXs mediante el servidor PDB2PQR (Dolinsky y cols, 2004) y se colorearon las estructuras según este parámetro (Figura 9).

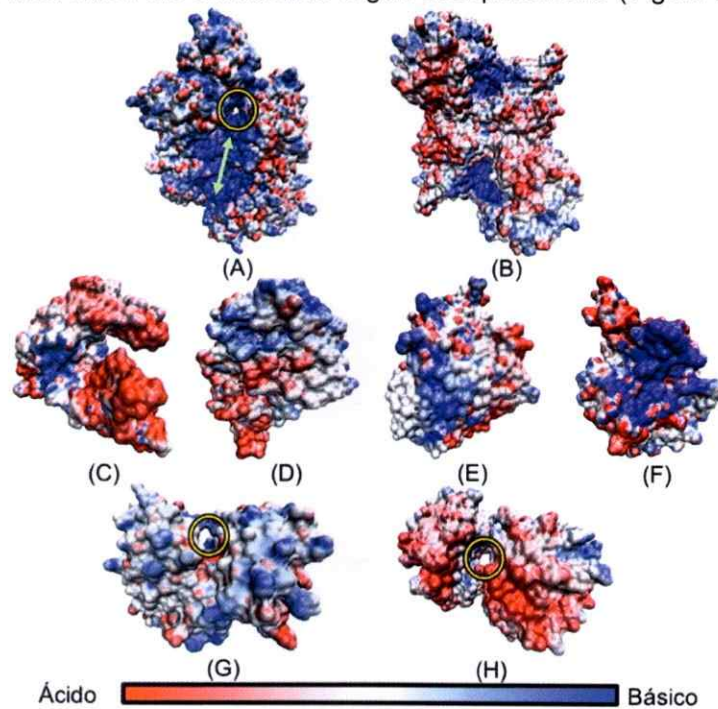


Figura 9. Morfología y carga de superficie de las PPXs cristalizadas depositadas en Protein Data Bank. Las proteínas corresponden a las PPXs de *E. coli* (A), *A. fabrum* (B), *B. longum* (C), *Y. pestis* (D), *C. hutchinsonii* (E), *S. cerevisiae* (F), *A. aeolicus* (G) y *B. fragilis* (H). Los colores indican la carga de superficie electrostática, mientras más rojo más ácido y mientras más azul más básico. Los círculos amarillos destacan la estructura tipo túnel que tienen algunas PPXs y la flecha verde indica el canal básico en la PPX_{Ec}.

Contrario a lo que se esperaba, la morfología de las enzimas fue muy variable. Ni siquiera fue posible alinear estructuralmente la zona que las bases de datos catalogaban como el dominio PPX/GppA (Figura S3), ya que los algoritmos no los identificaban como similares. En términos de la presencia de un canal básico, éste sólo se encontró en la PPX_{Ec} (Figura 9A). En el caso de la proteína de *A. fabrum*, se encontró que presentaban zonas mayoritariamente básicas en los extremos de la proteína, los cuales podrían cumplir la función de unir el PolIP (Figura 9B). Por otro lado, se observó que la presencia de un túnel que atravesara la proteína se encontraba más conservado, ya que las PPXs de *E. coli* (Figuras 3A), *A. aeolicus* (Figuras 3G) y *B. fragilis* (Figuras 3H) tenían una estructura de ese tipo.

Es interesante destacar que al hacer una búsqueda del dominio PPX/GppA en las proteínas con la base de datos Pfam (Finn y cols, 2016) se encontró que la PPX de *B. fragilis* no contenía el dominio característico PPX/GppA (Tabla 4), sino que tenía un dominio DHH solamente. Este dominio se encuentra en proteínas que catalizan reacciones de tipo fosfoesterasa, como por ejemplo, algunas que se unen a ácidos nucleicos (Marchler-Bauer y cols, 2015). Estos resultados sugieren que la supuesta PPX de *B. fragilis* podría catalizar reacciones tipo fosfoesterasa distintas a los de una PPX.

3.3.2 Comparación de las PPXs de microorganismos del consorcio biominero

Ya que las enzimas PPXs difieren mucho en sus estructuras, se analizó si aquellas diferencias disminuían entre las PPXs de los organismos que viven en condiciones similares, como lo son los del consorcio biominero. Se descargaron 27 secuencias aminoacídicas de las PPXs pertenecientes a 22 acidófilos, 15 pertenecientes a bacterias y 7 a arqueas, a partir de la base de datos del NCBI. Las secuencias se alinearon con ClustalX (Larkin y cols, 2007) y se construyó un árbol filogenético que se visualizó con

el software Dendroscope (Huson y Scornavacca, 2012). Se identificó una zona con un alto grado de conservación (Figura 10) que podría corresponder al sitio de unión a algún cofactor metálico divalente como Mg^{2+} , Ca^{2+} o Mn^{2+} como se sugirió para las PPXs de *A. aeolicus* (Kristensen y cols, 2004) y de *E. coli* (Rangarajan y cols, 2006).

Acidithiobacillus_ferrivorans	YPLEIVAGREEARLVYLGVAHS-LAVDANERRRLVADIGGGSTELIAGRG-
Acidithiobacillus_ferrooxidans	YPLEIVAGREEARLVYLGVAHS-LAVDARERRRLVVDIGGGSTELIAGQG-
Acidithiobacillus_thiooxidans	FPLEIVAGREEARLVYLGVAHS-LAVDADERRLVVDIGGGSTELIVGQG-
Acidithiobacillus_caldus	FPVEIVAGREEARLIYLGVAHS-LAVDARERRRLVVDIGGGSTELIAGTG-
Thiomonas_arsenitoxidans	FPIEVIAGREEARLVYIGAAHS-VSVVQ-GKRLVVDIGGGSTELIIGQG-
Thiomonas_intermedia	FPIEVIAGREEARLVYIGAAHS-VSVVQ-GKRLVVDIGGGSTELIIGQG-
Methylacidiphilum_infernorum1	HQIDVISGHEEARLIYLGVAHS-MEDDG-QKRLVVDIGGGSTELILGEG-
Ferroplasma_acidarmanus2	VPMEVIDGETEARLTYLGALQ--DMEGLTPPYLVLDIGGGSTELIFGESR
Leptospirillum_ferriphilum2	VPMEVIDGETEARLTYLGALQ--DMEGLTPPYLVLDIGGGSTELIFGESR
Leptospirillum_ferrooxidans2	VPLEVIGGETEAIWYHGALG--NLFDLTPPYLVLDIGGGSTELIYGETL
Ferroplasma_acidarmanus1	YKIEVLSGEEAFYSYFGVKN--SLD--LDDGVVFDVGGGSTEFSVRK-
Leptospirillum_ferriphilum1	YKIEVLSGEEAFYSYFGVKN--SLD--LDDGVVFDVGGGSTEFSVRK-
Leptospirillum_ferrooxidans1	FPIEVLSGEDEAFYSYFGVRT--SIN--IRDGLVFDVGGGSTELIRIQD-
Sulfolobus_islandicus	NEVRVISGEEEGRYAALGILN--TLP--ISEGVFTELGGGSLIEAEVSS-
Sulfolobus_solfataricus	NEVRVISGEEEGSYAALGMLN--TLP--IPDGIFTELGGGSLIEAEVTS-
Sulfolobus_tokodaii	YEMKISGEEEGRFSGIGILN--TLP--VSNGLFTELGGGSLIEIEVNE-
Sulfolobus_acidocaldarius	VKMRVLTGEEEGEMSAVGVLN--TLP--VDSGAMFDLGGGSLIEVVYFDS-
Sulfolobus_metallicus	YDLRISGDEEGKFSVGVLN--TLP--INDGLIFDLGGGSLIELVSVKD-
Metallosphaera_sedula	HDIRIIPGEEEGRLAALGSIN--SLP--FTDGVIFELGGGSLIELVYVRG-
Ferrimicrobium_acidiphilum	VKVQVISGHEEASLVFDAIRA--ACHLGSRPVLGADLGGGSLIELMLGDQ-
Acidimicrobium_ferrooxidans	VHVRILTGHEEASTIFSAVRS--AGSIGQVPVVVADLGGGSLIELALGTQ-
Acidiphilium_cryptum2	LPIETISPREEICLAMESCAS--LITQAERRALLFDIGGGSTEIAWVRVP
Acidobacterium_capsulatum	WEIEIISGLEEGRLIHHGVVS--TEQGAAGRCLLMDLGGGSCIEITLSEQR
Alicyclobacillus_acidocaldarius	LRFRILTGEEEARYGFLGVN---TMPIQNAVIFDIGGASSIEIALMRDR
Sulfobacillus_thermosulfidooxidans	LTVEILSGDEEARIGFLAVQE---TIALSRGWTVDVGGGSTEIVAYEDG
Methylacidiphilum_infernorum2	HKILLLSGDDAKIIRGVCSDDLQQAASPLTVVDVGGGSSIEWIQGKEK
Acidiphilium_cryptum1	LKVIILSGEQEARLSAEGVLCG---IPGADGILADLGGGSLIELVRLSEG

Figura 10. Alineamiento de un segmento de las secuencias de las PPXs de microorganismos acidófilos del consorcio biominero. Se destacan en rojo los aminoácidos que forman parte del sitio activo. Hacia el amino terminal se destaca el Glu catalítico y, hacia el carboxilo terminal, se muestran los cuatro aminoácidos que estabilizarían al catión divalente necesario para la catálisis. Estos aminoácidos se encuentran 100% conservados, con excepción del Asp, el cual es reemplazado por Glu en algunas PPXs de arqueas. La secuencia consenso

de esa zona es $\begin{matrix} D & X & G & G & T \\ E & & A & & S \\ & & & & S \end{matrix} L E$.

Utilizando la secuencia de *A. ferrooxidans* como referencia, existen 4 aminoácidos que se encuentran casi totalmente conservados: Asp146, Gly148, Ser151 y Glu153. Es interesante mencionar que el Asp146 se encuentra sustituido en algunas especies de arqueas por un Glu, sin embargo, al ser muy similares ambos aminoácidos se espera que cumplan la misma función (Cardona y cols, 2002). Otro aminoácido que destaca por

su grado de conservación es Glu122, que se ha descrito como el aminoácido catalítico esencial de esta enzima (Kristensen y cols, 2004).

Las proteínas de la familia PPX/GppA se habían dividido previamente en 6 categorías dependiendo del tamaño de la proteína, los dominios que contiene y las reacciones que pueden catalizar (Albi y Serrano, 2014). En el caso particular de las PPXs de acidófilos del consorcio biominero, se puede observar en el árbol filogenético que estas enzimas se podrían clasificar en al menos 5 grupos (Figura 11).

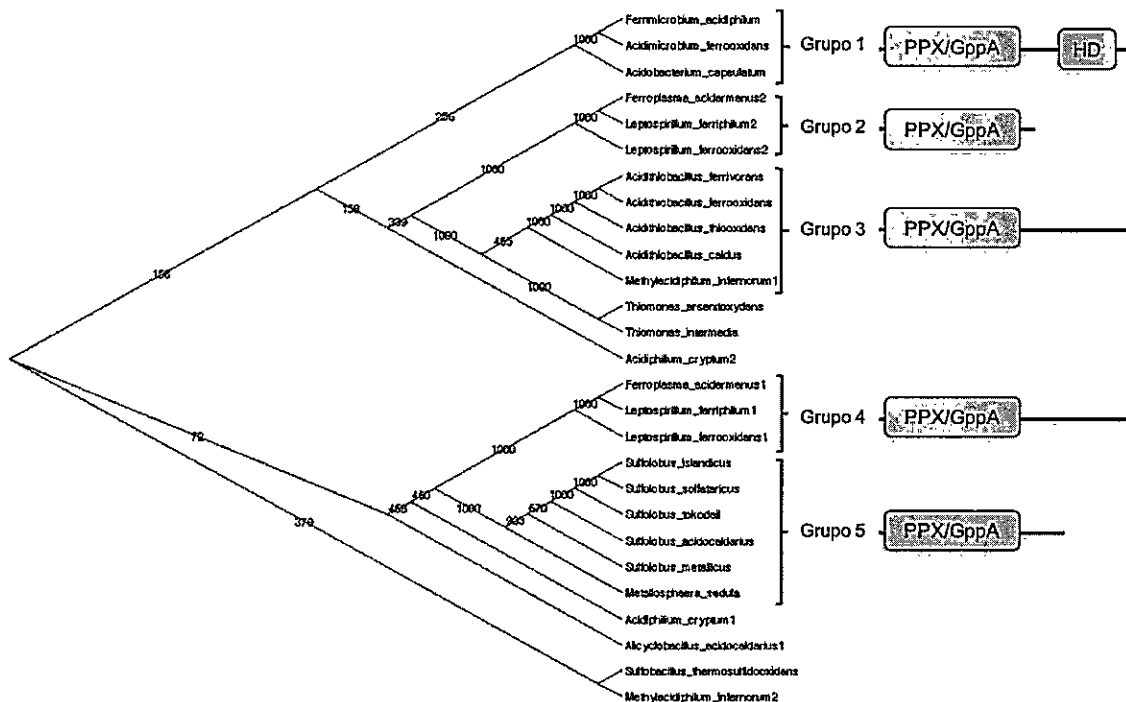


Figura 11. Árbol filogenético de las PPXs de acidófilos del consorcio biominero. Se identificaron al menos 5 grupos en las que se puede agrupar a las PPXs por el algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Los números que se observan en las bifurcaciones corresponden a valores de bootstrap. A la derecha, se esquematizan los dominios presentes en cada grupo de PPXs.

Los grupos 1, 3 y 4 corresponden a enzimas de alto peso molecular, es decir, tienen más de 500 aminoácidos. Las enzimas del grupo 1 corresponderían a las PPXs que tienen 2 dominios identificables: el dominio PPX/GppA en el extremo N-terminal y el dominio HD en el extremo C-terminal. Este último dominio es característico de fosfotransferasas que

están involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos o en vías de transducción de señales en procariontes, eucariontes y arqueas (Aravind y Koonin, 1998). Las PPXs pertenecientes a este grupo tendrían mayor afinidad por PoliP largos (Albi y Serrano, 2014). Las PPXs pertenecientes al grupo 3, por su parte, son aquellas que incluyen a la PPX_{Af} y formarían parte de la categoría de polifosfatasas tipo GppAsas, ya que éstas son enzimas de alrededor de 500 aminoácidos con el dominio PPX/GppA en el extremo N-terminal y una región C-terminal que no conforma ningún dominio conocido. En este grupo también se encuentra la PPX_{Ec} y la GppA de ese mismo microorganismo (Keasling y cols, 1993). Las PPXs pertenecientes a este grupo tendrían tanto actividad PPX, con preferencia de PoliP largos como sustrato, como actividad GppA (Albi y Serrano, 2014). A su vez, las enzimas del grupo 4, también son PPXs con el dominio PPX/GppA en el extremo N-terminal y un extremo C-terminal sin caracterizar y de una longitud de más de 500 aminoácidos. Las enzimas que se encuentran en esta categoría provienen de arqueas, como la euryarchaeota *Ferroplasma acidarmanus*, y de bacterias del filo *Nitrospirae*.

Un caso diferente representan las PPXs del grupo 2. Éstas son enzimas de aproximadamente 300 aminoácidos. Como ninguna de las 3 enzimas que se encuentran en esta categoría se ha caracterizado, no se puede especificar si pertenecerían al grupo de aquellas con actividad dual tripolifosfatasa o hidrolasa de nucleótidos trifosfato o a aquellas cuya preferencia de sustrato son los PoliP de cadena larga (Albi y Serrano, 2014).

El grupo 5 lo componen exclusivamente PPXs provenientes de especies de arqueas del filo *Crenarchaeota* y tienen entre 410 y 420 aminoácidos de longitud. Albi y Serrano (2014), clasificaron a la PPX de *S. solfataricus* presente en este grupo como una

polifosfatasa de bajo peso molecular que sería cercana a las enzimas de señalización eucariontes RTG2 (Albi y Serrano, 2014; Liao y Butow, 1993).

En algunos casos, algunos genomas bacterianos tenían anotadas más de una secuencia como posible PPX, es por ello que la más corta se anotó como "1" y la más larga como "2". Es interesante recalcar que en los casos de *F. acidarmanus*, *Leptospirillum ferriphilum* y *L. ferrooxidans*, los cuales tenían 2 PPXs diferentes, éstas se ubicaron en zonas distintas del árbol (grupos 2 y 4) lo que indicaría que estas proteínas podrían cumplir funciones distintas en las células.

3.3.3 Modelamiento de la PPX de *A. ferrooxidans*

Con el fin de estudiar con más detalle las características estructurales de PPX_{Af}, se realizó un modelo por homología. Para ello, se analizaron posibles moldes en la base de datos Protein Data Bank, la que busca exclusivamente entre las proteínas con estructura conocida, y se identificó la cobertura y la identidad que esas secuencias tenían con la de PPX_{Af} (Tabla 5) mediante BLASTp (Johnson y cols, 2008).

Se eligieron como molde las estructuras de las PPX_{Ec} PDB ID: 1U6Z y 2FLO, ya que tenían una cobertura de un 95% y la identidad entre éstas y PPX_{Af} era de 37%. Se alinearon las secuencias de estas dos proteínas con la de la PPX_{Af} con ClustalX (Larkin y cols, 2007). Previo al modelamiento, los archivos de las proteínas usadas como molde se modificaron con el software MAESTRO (2016). Los cambios realizados consistieron en agregar hidrógenos, cambiar las selenometioninas del archivo original por metioninas, crear puentes disulfuro y eliminar las moléculas de agua que estuvieran a una distancia menor a 5 Å de la proteína. Para realizar el modelo, se fijó la posición de los 4 aminoácidos que podrían estar formando el sitio de unión al cofactor metálico (Asp146, Gly148, Ser151 y Glu153). En vista de la similitud entre PPX_{Af} y PPX_{Ec}, se decidió modelar la estructura como un dímero. Otro factor a considerar es que como los moldes

no contenían los primeros 12 aminoácidos que serían los homólogos a los primeros de PPX_{Af}, se modeló a partir de Asn12. Sin embargo, todas las posiciones en la proteína a las que se hace mención en este Seminario de Título, son con respecto a la numeración original de las respectivas proteínas.

Tabla 5. Características de los modelos de las PPXs obtenidas a partir de cristales en comparación con la PPX_{Af}

Código PDB	Especie	Resolución (Å)	PPX <i>A. ferrooxidans</i>	
			Identidad	Cobertura
4PY9	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,25	26%	53%
3RFO	<i>Yersinia pestis</i>	1,8	39%	58%
3MDQ	<i>Cytophaga hutchinsonii</i>	1,5	22%	58%
3HI0	<i>Agrobacterium fabrum</i>	2,3	40%	7%
3CER	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,4	27%	53%
2QB6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,8	23%	59%
2QB7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,6	23%	59%
2QB8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,9	23%	59%
2J4R	<i>Aquifex aeolicus</i>	2,71	26%	18%
2FLO	<i>Escherichia coli</i>	2,2	37%	95%
1U6Z	<i>Escherichia coli</i>	1,9	37%	95%
1T6C	<i>Aquifex aeolicus</i>	1,53	26%	18%
1T6D	<i>Aquifex aeolicus</i>	2,15	26%	18%

Según el modelo obtenido, el monómero de PPX_{Af} estaría compuesto por 4 dominios (Figura 12A) y en general la estructura sería muy similar a la de *E. coli* (Figura 12B). Al calcular la carga de superficie electrostática, se observó que PPX_{Af} también tenía un canal básico en la interfaz entre los dos monómeros de la proteína (Figura 12C). Sin embargo, a pesar que los aminoácidos que se encontró que conformaban el canal eran básicos, éstos no eran los mismos que los descritos por Alvarado y cols (2006) y Rangarajan y cols (2006) para la PPX_{Ec}. El sitio activo de la enzima se encontraría entre los dominios I y II (Figura 13) y estaría conformado por el aminoácido catalítico Glu122 y los grupos que ayudarían a la estabilización de un posible cofactor metálico: Asp146,

Gly148, Ser151 y Glu153. La diferencia más destacable que se encontró entre PPX_{Af} y PPX_{Ec} fue en un sector de la superficie de los dominios I y II, justo en el lado opuesto donde se supone que se encontraría el sitio activo. Ésta consiste en una carga electrostática mayoritariamente positiva en casi toda la superficie en el caso de PPX_{Af} (Figura 12E), mientras que solo una sección acotada presenta esta característica en PPX_{Ec} (Figura 12F). Como en el centro de ese sitio hay una cavidad hacia el interior de la proteína que conecta con el sitio activo, se postula que diversas moléculas pequeñas con carga negativa, como el fosfato inorgánico, podrían quedar adheridas a la proteína en este sitio e interferir de alguna manera con la catálisis de la enzima. Sin embargo, debido a la naturaleza meramente electrostática de esta posible interacción, se espera que este efecto sea general para la interacción con moléculas con carga negativa.

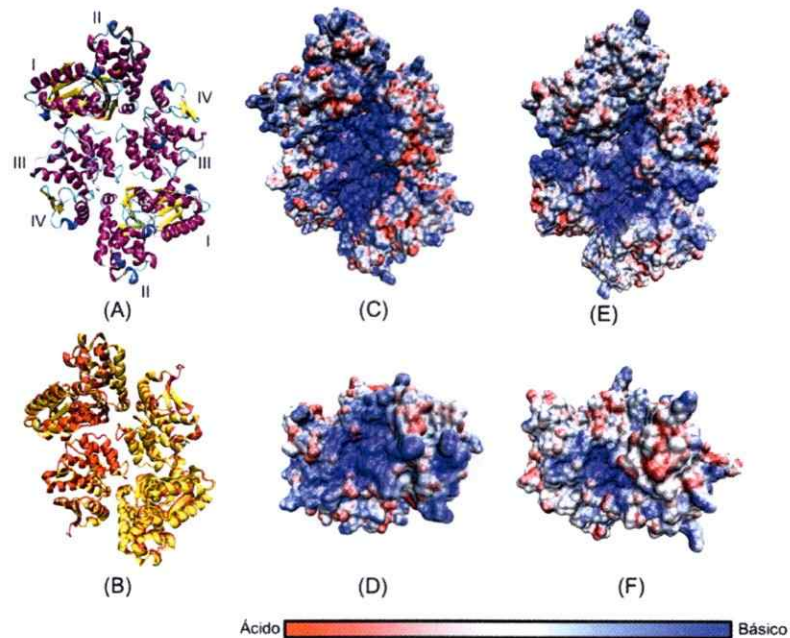


Figura 12. Comparación entre el modelo de PPX_{Af} y el modelo 1U6Z de PPX_{Ec}. (A) Estructura secundaria de PPX_{Af} donde los colores indican conformaciones distintas de estructura secundaria y los números indican los dominios. (B) Alineamiento estructural entre PPX_{Af} (amarillo) y 1U6Z (rojo). Se muestra también la carga de superficie electrostática de PPX_{Af} en su vista frontal (C) y superior (D) y de 1U6Z, vista frontal (E) y superior (F).

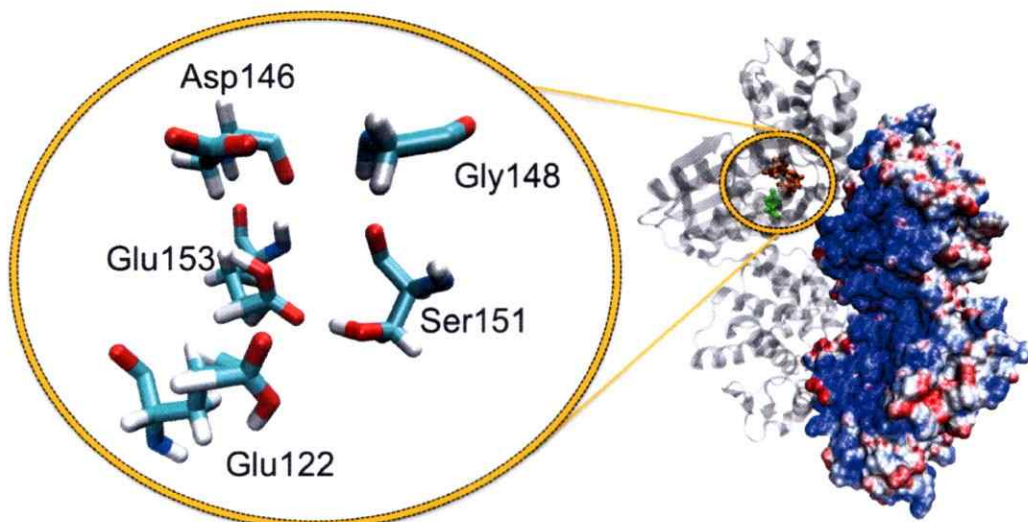


Figura 13. Sitio activo de la PPX_{Af}. La imagen a la derecha muestra la posición de los residuos importantes en la estructura de la proteína y la ampliación del lado izquierdo indica el detalle de los aminoácidos que se encuentran en el sitio catalítico. En verde está el Glu122 (aminoácido catalítico) y en naranja se muestran los que estarían coordinando al cofactor.

Similar a lo descrito por Alvarado y cols (2006), se encontró que al dimerizar se formaban 2 túneles en la interfaz de los monómeros (Figura 14B). Uno de estos dos túneles se formaba exclusivamente por las cadenas laterales polares de ciertos aminoácidos de ambos monómeros (Figura 14, derecha), lo que sugiere que alguna molécula polar podría interactuar con la proteína a ese nivel. Por otra parte, el otro túnel se formaba principalmente por la cadena principal de algunos aminoácidos (Figura 14, izquierda). Se destaca en este último túnel el residuo Glu121, el cual se encuentra muy conservado en las PPXs de microorganismos del consorcio biominero (Figura 10) y que se encuentra inmediatamente al lado del aminoácido catalítico Glu122 (no se muestra en la Figura 14). A continuación, se evaluó la relación entre los aminoácidos más conservados entre las PPXs almacenadas en las bases de datos y la estructura modelada de PPX_{Af}. En primer lugar, se utilizó el programa ConSurf (Ashkenazy y cols, 2016) para generar un valor para cada aminoácido de PPX_{Af} que indicara qué tan evolutivamente conservado se

encontraba en relación a las PPXs almacenadas en las bases de datos. Posteriormente, se coloreó cada aminoácido de PPX_{Af} según ese índice (Figura 15).

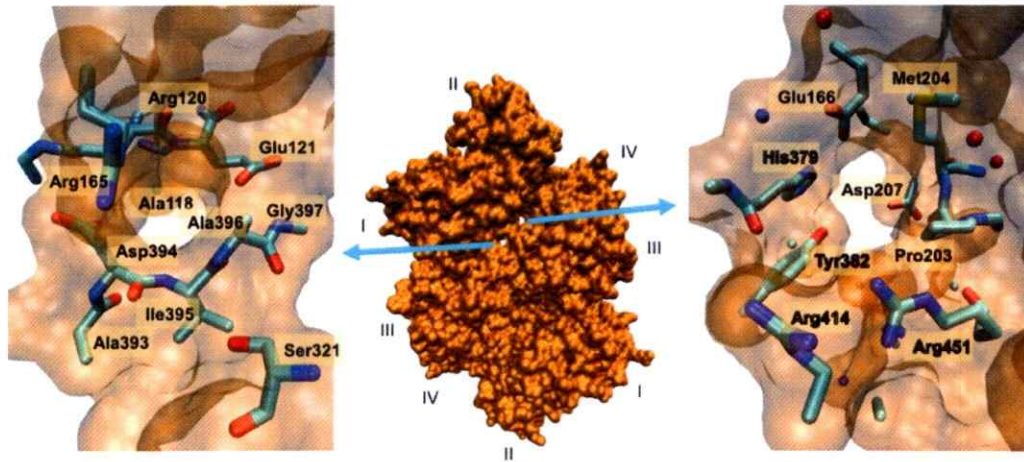


Figura 14. Residuos que componen los 2 tipos de túneles presentes en PPX_{Af}. Esta proteína tiene 4 túneles que se forman al dimerizar los monómeros. En el centro, se muestra la posición de los túneles en la proteína y a la izquierda y derecha se muestra el detalle de los aminoácidos que conforman cada túnel. Los aminoácidos en negrita pertenecen a monómeros distintos. Los números romanos indican los dominios de la proteína.

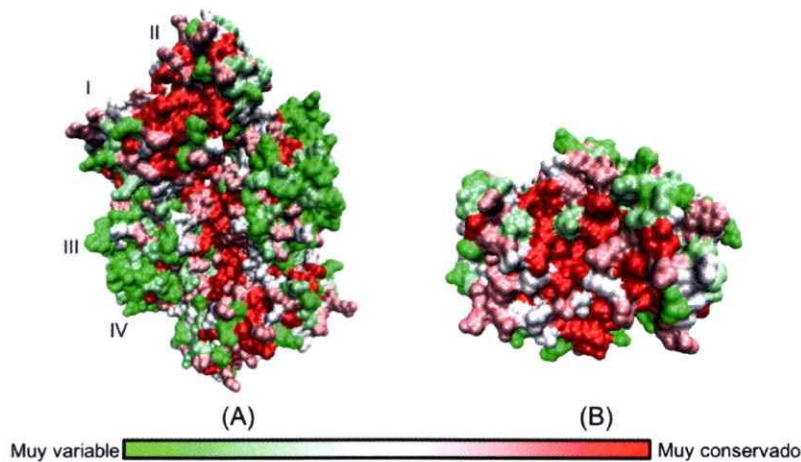


Figura 15. Niveles de conservación de los residuos de PPX_{Af} en relación a otras PPXs. Se muestran la vista frontal de la proteína (A) y la vista superior (B). Los colores indican los grados de conservación: mientras más verde, los residuos son muy variables y mientras más rojos, están muy conservados. Los números romanos indican los dominios de la proteína.

En general, se observó que los dominios I y II se encontraban más conservados que los dominios III y IV, lo cual se puede explicar porque el dominio de plegamiento tipo PPX/GppA se encuentra en esa zona en PPX_{Af} (Figura 15A). Además, esa variación en los dominios III y IV podría deberse a la variación en el número de aminoácidos que presentan estas enzimas, ya que esta PPX es una de las más largas con 503 aminoácidos. Por otra parte, el canal básico de la enzima (Figura 15A) no sería una característica de todas estas enzimas ya que existen zonas del canal, pertenecientes a los dominios III y IV, que no se encuentran conservadas. Por el contrario, la región donde se encuentra el túnel de la Figura 14 (izquierda) se encuentra bastante conservada por lo que podría ser una zona importante para la catálisis de la enzima. El otro túnel (Figura 14, derecha), sin embargo, no presentaba indicios de tan alta conservación. Inesperadamente, la parte superior de los dominios I y II donde se propuso que podría haber un sitio de unión a moléculas cargadas negativamente, presentó un grado de conservación alto (Figura 15B). Es interesante destacar que en la zona donde los dominios III de las dos cadenas del dímero se contactan en la mitad del canal pareciera existir un grado alto de conservación (Figura 15A).

Seguidamente, se buscó un indicio estructural de un posible rol de PPX_{Af} en los mecanismos de resistencia a metales. Con ese fin, se utilizó el software MetalDetector (Passerini y cols, 2011), el cual permite detectar posibles sitios de unión para metales formados por histidinas o cisteínas en proteínas sin conocer su estructura. Los resultados predijeron un posible sitio formado por His379, His383 e His385. Estos aminoácidos se encuentran en el dominio III de PPX_{Af}, justo en la zona de la interfaz entre los monómeros y forman parte del posible canal básico de la enzima (Figura 16A). La His383 y la His385 se encuentran en el segmento final de una alfa hélice, mientras que la His379 se encuentra en un loop que continúa inmediatamente después de la

hélice (Figura 16B y 10C). La distancia entre His383 e His385 es de aproximadamente 8,2 Å (Figura 16C) y entre éstas y la His379, es aún mayor. Al analizar la conservación de estos residuos en las PPXs de otros microorganismos, entre los cuales se encontraban todos aquellos analizados en la Figura 10 y las estructuras que se encontraban cristalizadas, se observó que estas histidinas solo se encontraban presentes en PPX_{Af} y PPX_{Ec}. La orientación espacial de estas histidinas sugiere que éste no sería un sitio de unión a metales, ya que se encuentran muy lejos entre sí. Sin embargo, teniendo en cuenta que el modelo no se realizó en presencia de un ion metálico y que el molde no contenía ningún átomo de ese tipo, no es descartable la presencia de un sitio de estas características.

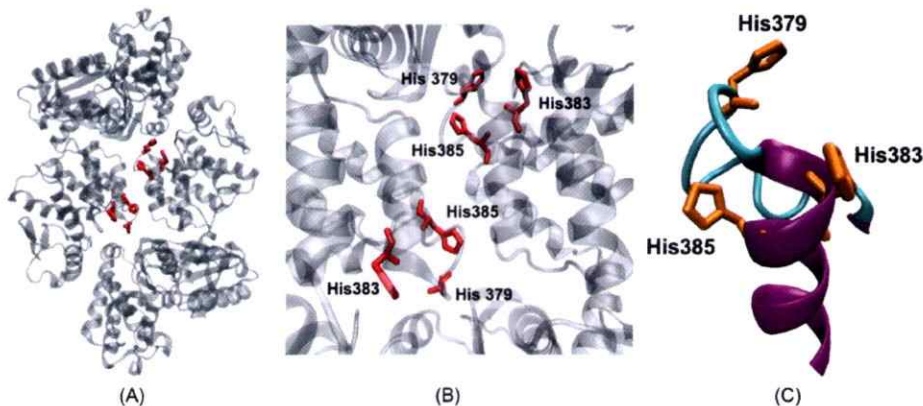


Figura 16. Posible sitio de unión a metales de PPX_{Af}. Este sitio se encuentra en el dominio III (A, B) formado por His379, que se encuentra en un loop, y las His383 e His385, que se encuentran en una alfa hélice con distancias de 8,16 y 8,67 Å entre sus átomos de nitrógeno del anillo (C).

3.3.4 Predicción de un posible sitio activo de PPX_{Af} mediante Docking molecular

Finalmente, el último objetivo de los análisis bioinformáticos fue predecir la existencia de posibles sitios de unión al sustrato en la PPX_{Af}. Para ello se utilizó un PoliP de 15 residuos (PoliP₁₅) como sustrato y el programa AutoDock Vina 1 para el docking molecular (Trott y Olson, 2010).

En el caso de la interacción entre la PPX_{Af} y el PoliP₁₅ se analizaron 2 posibles conformaciones (Figura 17). En la primera, el PoliP₁₅ se uniría a la proteína entre los dominios I y II, ingresando al sitio activo por una cavidad que se forma en esa zona. Es interesante destacar que ese mismo lugar es donde la carga electrostática de superficie es principalmente básica (Figura 12D y Figura 17B). La segunda conformación que se analizó fue una donde el PoliP₁₅ se encontraba estirado dentro de la cavidad que corresponde al canal básico de la enzima (Figura 17D), la cual correspondía a una de las hipótesis sugeridas por Rangarajan y cols. (2006). Las energías de afinidad que se predijeron con el mismo software fueron de -8,9 kcal/mol para la primera y -8,3 kcal/mol para la segunda, por lo que en términos energéticos ambas conformaciones son posibles, sin embargo, la primera conformación sería más estable.

A continuación, se evaluaron los residuos de la proteína que podrían estar interactuando con el PoliP₁₅ (Figura 17C y 11E) mediante puentes de hidrógeno y aquellos que lo harían por contacto cercano y que podrían corresponder a interacciones electrostáticas o de tipo van der Waals, entre otras. En el caso de la conformación de la Figura 17A, se observan interacciones electrostáticas entre los residuos de fosfato del PoliP₁₅ y varias argininas, serinas, histidinas y lisinas, como se indica en la Figura 17C. Cabe destacar que los residuos Gly148, Gly149 y Gly150 también interactúan de manera electrostática con el sustrato. Estos residuos se encuentran conservados ampliamente en la mayoría de las PPXs (Figura 10) y podrían dar cuenta del sitio activo de la enzima (Rangarajan y cols, 2006). Más aún, el residuo Gly150 se encuentra adicionalmente formando puentes de hidrógeno con los residuos de fosfato del PoliP₁₅. En este caso, todos los aminoácidos que interactúan con el sustrato forman parte de la misma cadena polipeptídica, lo que sugiere que el monómero presentaría actividad exopolifosfatasa en caso de ser ésta la conformación en que se realiza la catálisis.

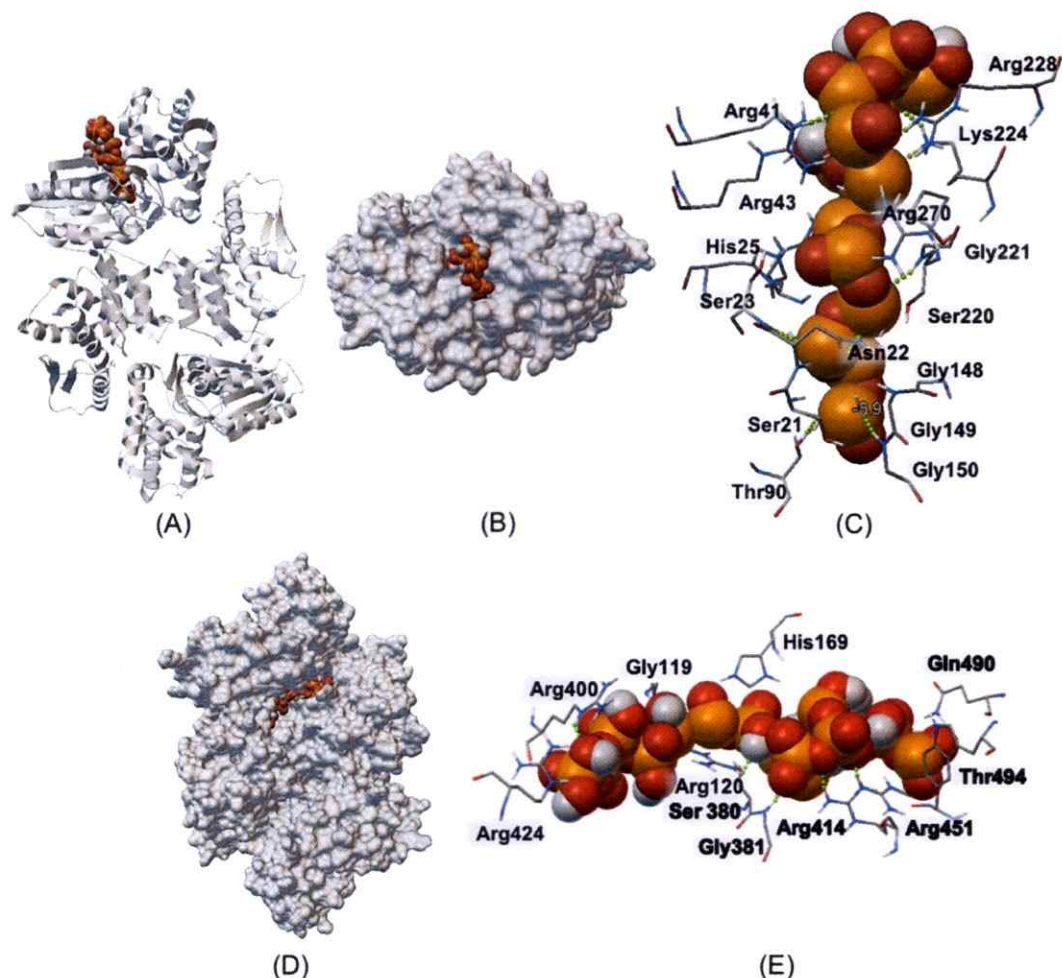


Figura 17. Posible sitio de unión a PoliP de PPX_{Af} modelado por Docking molecular. Se utilizó un PoliP de 15 residuos como posible sustrato. Se muestran las conformaciones más estables con vista frontal (A) y desde arriba (B) y aquella donde el PoliP se encontraba estirado dentro del canal básico (D). Se indican también las interacciones entre PPX_{Af} y PoliP en las dos conformaciones escogidas para el análisis. Se muestran los puentes de hidrógeno como un enlace de esferas pequeñas verdes. En el caso de la conformación más estable (C), los residuos que interaccionan por enlaces puente de hidrógeno son Asn22, Ser23, Arg43, Thr90, Gly150, Gly221, Lys224, Arg228 y Arg301. Por otra parte, aquellos que se encuentran muy cercanos al sustrato son Ser21, Asn22, His25, Arg41, Arg43, Thr90, Gly148, Gly149, Gly150, Ser220, Gly221, Lys224, Arg228, Arg270 y Arg301. Por otro lado, en el caso de la conformación con el PoliP estirado en el canal (E), los aminoácidos que interaccionan por enlaces puente de hidrógeno son Gly119, Arg120, **Ser380**, **Gly381**, **Arg400** y **Arg414**, donde los aminoácidos en negrita pertenecen a monómeros distintos. En el caso de los aminoácidos muy cercanos se encuentran Gly119, Arg120, His169, Arg400, Arg424, **Ser380**, **Gly381**, **Arg414**, **Arg451**, Gln490, Trp494.

Por otro lado, la segunda conformación escogida (Figura 17E) presentó residuos que formaban tanto enlaces por puentes de hidrógeno como algunos que estarían interaccionando por contacto de ambas cadenas simultáneamente. Luego, para unir al PoliP₁₅ de esta manera, sería necesario que la proteína existiera como dímero. En este caso, nuevamente, la mayoría de las interacciones serían de tipo electrostático entre los residuos de argininas, glicinas, asparaginas y lisinas y el PoliP₁₅.

4. DISCUSIÓN

4.1 Purificación de la rPPX_{Af} y formación de cuerpos de inclusión

La caracterización bioquímica *in vitro* de la PPX_{Af} fue el objetivo inicial de este trabajo. En primera instancia, se decidió clonar el gen en el vector pET28aTEV, el cual añadía la secuencia de 6 His en el extremo N-terminal de la proteína para permitir su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel. En el laboratorio se ha purificado la PPX de *M. sedula* con este mismo método, por lo que parecía ser un buen sistema de expresión (Rivero, 2016). A pesar de que se logró clonar el gen *ppx* de *A. ferrooxidans* exitosamente, en ensayos posteriores de expresión se descubrió que la mayoría de la rPPX_{Af} se encontraba insoluble en la fracción de los cuerpos de inclusión (Figura 4B). Los cuerpos de inclusión son agregados proteicos que se forman principalmente en bacterias que expresan proteínas recombinantes en altas tasas, probablemente debido a la limitada cantidad de chaperonas que se encuentran en la célula (Carrió y Villaverde, 2002). Existen casos donde las proteínas en los cuerpos de inclusión se pueden purificar en condiciones desnaturizantes en presencia de agentes caotrópicos como urea o clorhidrato de guanidinio (Tsumoto y cols, 2003). Sin embargo, el proceso de renaturación puede ser engorroso y muchas veces poco efectivo. La PPX de *S. solfataricus* se expresó en cuerpos de inclusión, se purificó y se caracterizó parcialmente (Cardona y cols, 2002). En el caso de la rPPX_{Af} esta opción no se consideró, ya que no se contaba con equipos para medir difracción circular o controles adecuados que permitieran asegurar el correcto repliegamiento de la proteína posterior a la purificación. Cabe destacar que se intentó aumentar la solubilidad de la enzima mediante la optimización de las condiciones de cultivo, de la cantidad de inductor añadido en el medio y del tiempo de inducción, sin encontrar resultados satisfactorios.

Una de las alternativas propuestas para evitar la agregación de las proteínas recombinantes es crear una fusión entre ellas y alguna proteína que mejore su solubilidad, como la MBP (Kapust y Waugh, 1999; Rosano y Ceccarelli, 2014). Con ese fin se utilizó el sistema de expresión pMAL-c5X, el que expresa la proteína de fusión en el citoplasma de la bacteria. En este caso, también se logró clonar exitosamente el gen *ppx* de *A. ferrooxidans*. Aún cuando la mayor parte de la proteína se encontró insoluble, se logró producir en forma soluble una fracción mucho mayor que con el sistema anterior (Figura 5B). Además, cuando se intentó obtener la proteína pura por cromatografía de afinidad a amilosa (Figura 8), los resultados obtenidos fueron mejores que los obtenidos por la cromatografía de afinidad a níquel utilizada con el sistema pET (Figura 7). No obstante, no se obtuvo un nivel de pureza alto, ya que en la fracción de la elución se observaron al menos 2 proteínas adicionales a la de 100 kDa que corresponde a la proteína de fusión deseada (Figura 8). Una de las bandas no deseadas que se observó tenía un tamaño aproximado de 50 kDa y podría corresponder a la misma rPPX_{Af} (58 kDa) o a la MBP libres (42 kDa), es decir, podría haberse hidrolizado espontáneamente el péptido que las mantenía fusionadas en el proceso. Para obtener la proteína en un mayor grado de pureza una alternativa sería añadir pasos posteriores de purificación como cromatografía de intercambio catiónico.

Otro factor que hay que considerar es la estequiometría de asociación de la PPX_{Af} y cómo ésta podría influir en su actividad. En vista que el túnel por donde se supone que pasa el PolIP se encuentra formado por aminoácidos de los 2 monómeros, se espera que la dimerización de la proteína sea esencial para la catálisis. Luego, considerando que la PPX_{Af} tiene un tamaño de 50 kDa y la MBP de 42 kDa, existe la posibilidad de que no sólo la MBP impida el acceso al sustrato por impedimento estérico, sino que también evite la dimerización de la proteína. Sin embargo, dado que no se evaluó la

actividad de la rPPX_{Af} por no estar ésta pura, no se pudo corroborar esta hipótesis. Como proyección a este Seminario de Título, se podría cortar la proteína de fusión mediante el factor Xa, que es una proteína que corta una secuencia de aminoácidos que se encuentra entre la MBP y la proteína de interés, con el fin de liberar la rPPX_{Af}. Cabe destacar que posterior a eso, habría que añadir un paso de separación de la rPPX_{Af} de la MBP y del factor Xa, el cual se podría realizar por cromatografía de intercambio catiónico o por cromatografía de exclusión molecular. Finalmente, no se pudo caracterizar bioquímicamente la rPPX_{Af} puesto que nunca se logró purificar exitosamente durante el desarrollo de este Seminario de Título.

Para cumplir con el plazo máximo de un año para el Seminario de título, se dejó esta purificación para estudios posteriores y se realizó un análisis estructural bioinformático de la PPX_{Af}.

4.2 Clasificación de las PPXs de acidófilos

Los análisis realizados a las PPXs con estructura conocida, mostraron que la diversidad de estas enzimas en términos de plegamiento y estructura es muy amplia, tanto a nivel de tamaño, cantidad de subunidades y carga de superficie.

El tamaño de los monómeros de las PPXs de microorganismos acidófilos varió entre las distintas especies y se encontró que según su secuencia se podían clasificar en 5 grupos distintos. En general, todas las PPXs presentaban el dominio PPX/GppA en su extremo N-terminal y su extremo C-terminal podía variar en longitud y presencia de otros dominios adicionales, como el dominio HD.

En términos de la estequiometría de sus componentes, se encontró que algunas PPXs formarían dímeros en solución y otras formarían monómeros. Además de las enzimas reportadas previamente, se encontró que la exopolifosfatasa putativa de *Zymomonas mobilis*, por ejemplo, sería un dímero según experimentos de cromatografía de exclusión

molecular (Zhang y cols, 2016). Algunas especies, como *Chlorobium tepidum* (Albi y Serrano, 2014), *M. tuberculosis* (Choi y cols, 2012) o *Corynebacterium glutamicum* (Lindner y cols, 2009) codifican en su genoma más de un tipo de PPX que difieren en la estequiometría de sus componentes, el largo del PoliP de preferencia, o en las reacciones adicionales que puede catalizar la enzima. Este podría ser el caso de las PPXs de *F. acidarmanus*, *L. ferriphilum* y *L. ferrooxidans* que tienen 2 PPXs distintas por genoma y que no se agrupan en el mismo clado en el árbol filogenético (Figura 11), por lo que se consideran proteínas parálogas dentro de la misma especie.

A pesar de la diferencia estructural, morfológica y filogenética entre las PPXs estudiadas, es interesante destacar que los aminoácidos del sitio activo se conservan (Figura 10), incluso cuando el plegamiento del dominio PPX/GppA no es el mismo (Figura S3). Luego, dos criterios que podrían dar cuenta de que una proteína hipotética pueda ser una PPX, son la presencia del dominio PPX/GppA y la presencia del Glu catalítico del sitio activo situado entre 18 y 20 aminoácidos antes de la secuencia consenso de aminoácidos que estabilizarían el cofactor metálico conformada por Glu/Asp-X-Gly-Gly-Gly/Ala-Ser-Thr/Leu/Ser-Glu.

4.3 Características de la posible estructura de PPX_{Af}

La primera decisión que se debió tomar para hacer el modelo fue determinar a cuál enzima de estructura conocida sería similar la PPX_{Af}. En términos de identidad de secuencia, se encontró que la PPX_{Af} presentaba un 37% de identidad de secuencia con la PPX_{Ec} y un 40% con la PPX de *A. fabrum* (Tabla 5). Además, PPX_{Af} es una enzima de 503 aminoácidos y las 2 PPXs antes mencionadas tienen 513 y 508 aminoácidos, respectivamente (Tabla 4). Considerando que estas dos enzimas forman dímeros en solución, todas estas características en común sugieren que la PPX_{Af} podría tener esa misma estequiometría. Por otra parte, para hacer el modelo se eligió como molde a la

PPX_{Ec} por 3 razones. La primera fue el alto porcentaje de identidad que existía entre esta enzima y la PPX_{Af}, ya que se considera que sobre un 30% de identidad es suficientemente alto para hacer un modelamiento por homología (Xiang, 2006). La segunda razón fue porque la cobertura de este modelo con respecto a la PPX de interés era de un 95%, por lo que casi toda la proteína tenía un aminoácido en el templado que permitió encontrar su posición con respecto al resto de la proteína. El 5% de los aminoácidos que no estaban cubiertos correspondieron a los 11 primeros aminoácidos de la secuencia y a algunos residuos al interior de la proteína. A pesar de que se intentó dilucidar la estructura que podían tener esos primeros residuos, no se logró obtener resultados concordantes entre los distintos programas computacionales utilizados y, debido a que estos aminoácidos se encontraban lejos del sitio activo, se decidió no considerarlos para el modelamiento. La tercera razón por la que se escogió la PPX_{Ec} como molde fue que en la base de datos existían 2 estructuras cristalográficas depositadas (PDB ID 1U6Z y 2FLO), cuyo análisis se encontraba publicado (Alvarado y cols, 2006; Rangarajan y cols, 2006) y que tenían una resolución muy alta, de 1,9 Å y 2,2 Å, respectivamente.

Un aspecto que también se analizó fue el posible mecanismo de acción de la PPX_{Af}. Hasta el momento no se ha logrado cristalizar ninguna estructura de PPX con su sustrato. En el caso de la PPX_{Ec}, se ha propuesto que esta enzima tendría al menos 3 sitios donde interactuaría con el PoliP, ya que al hacer una hidrólisis parcial de los PoliP, en condiciones distintas a las óptimas para la enzima en las cuales no es procesiva, se obtenían polímeros de 3 tamaños distintos: 50, 14 y 3 residuos de fosfato inorgánico (Bolesch y Keasling, 2000b). Con la cristalización de la PPX_{Ec}, se propusieron 2 modelos de interacción entre el PoliP y la enzima. El primero consistía en que el PoliP se unía a la enzima en el canal básico que se encontró en la interfaz entre los monómeros del

dímero (Rangarajan y cols, 2006). La PPX_{Af}, al igual que su símil en *E. coli*, tendría un canal básico en el mismo sector. Sin embargo, las otras PPXs cristalizadas no presentan esta característica (Figura 9), lo que sugiere que la presencia del canal básico no sería esencial para la actividad PPX, pero podría dar cuenta de la especificidad por PoliP de cadena más larga de algunas PPX como la de *E. coli* (Rangarajan y cols, 2006).

El otro modelo propuesto (Figura 2C) se basó en la evidencia de una serie de sulfatos presentes en una de las estructuras cristalográficas de la PPX_{Ec} (PDB ID: 2FLO) y consistía en que el PoliP se uniría primero en el canal básico y luego pasaría a través de un túnel que existe en la estructura de la PPX, enrollándose en ella, antes de llegar al sitio activo (Alvarado y cols, 2006). Boetsch y cols (2016) ensayaron esta teoría *in silico* y concluyeron que lo que gatillaba que el PoliP se uniera a la enzima era el estado de protonación del residuo His378 de la PPX_{Ec} (His379 en PPX_{Af}), ya que al estar desprotonado permite la formación del túnel, cuyo grado de electropositividad varía gradualmente a lo largo de él, conectando el sector del canal básico de la proteína con el lado posterior de ella. La presencia de túneles o semitúneles electropositivos o básicos se había asociado a proteínas de unión a PoliP como las PPK de *E. coli*, *Porphyromonas gingivalis*, *Dictyostelium discoideum* y *S. cerevisiae* o la PPX de *A. aeolicus* (Wei y cols, 2015). En el caso de la PPX_{Af}, se encontró la presencia de 2 túneles (Figura 14). Uno de estos túneles tendría las características de túnel electropositivo y tendría, además, a la His379 formando parte de su estructura (Figura 14, derecha). Este túnel se formaría sólo en caso de que la His379 se encuentre desprotonada. En caso contrario, se ha predicho en la PPX_{Ec} que la protonación de este aminoácido provocaría un cambio conformacional que desestabilizaría la presencia del túnel y no permitiría el paso del PoliP a través de ella (Boetsch y cols, 2016). Por lo tanto, el estado de protonación de esta histidina, tanto

en la PPX_{Ec} como en la PPX_{Af}, podría permitir la unión y la liberación del PoliP con la PPX.

Por otra parte, en el otro túnel encontrado en PPX_{Af} se encuentra el residuo Glu121 (Figura 14, izquierda), el cual es el residuo continuo al aminoácido catalítico Glu122. A diferencia del otro túnel que está formado principalmente por cadenas laterales de aminoácidos, éste se encuentra constituido por carbonos alfa de la cadena principal. No se ha descrito previamente alguna estructura con estas características, pero postulamos que ésta podría ser una estructura transitoria que se formaría por movimientos de los residuos de la proteína y que por eso no se observaría en los cristales de PPX_{Ec}. La función de este túnel podría ser permitir el ingreso al sitio activo del catión divalente o de la molécula de agua, necesarios para la hidrólisis del PoliP.

En relación al sitio activo, los análisis de docking realizados indicaron que en la PPX_{Af}, el PoliP ingresaría al sitio activo desde la parte posterior y superior de la PPX, entre los dominios I y II (Figura 17A), ya que la energía libre de afinidad entre la enzima y el sustrato fue menor en esta conformación que la encontrada cuando el PoliP₁₅ se encontraba dentro del canal básico (Figura 17). Además, en esta conformación se encontró que los residuos Gly148, Gly149 y Gly150 estarían interaccionando con el PoliP₁₅ debido a su proximidad con él. Más aún, el residuo Gly150 formaría enlaces tipo puente de hidrógeno con el sustrato. En la estructura cristalográfica de la PPX de *A. aeolicus* se determinó que el cofactor metálico de esa enzima (Ca²⁺) se encontraba heptacoordinado por 2 moléculas de agua, los grupos carbonilos del Asp141, Gly143 y Ser146 y por las cadenas laterales del Glu148 y la Ser146 (Kristensen y cols, 2004). La Gly143 de *A. aeolicus* corresponde a la Gly148 de PPX_{Af} y se determinó que las Gly149 y Gly150 también se encuentran conservadas en todas las PPXs que se estudiaron en este Seminario de Título (Figura 10). Por lo tanto, los resultados anteriores y el hecho

que los aminoácidos homólogos a los que conforman ese sitio de unión a metales se encuentran en una posición muy similar en la PPX_{Af} (Figura 13) y en la PPX de *A. aeolicus* (Kristensen y cols, 2004), sugieren que el sitio activo de esta enzima se encontraría entre los dominios I y II en el sector del canal básico y estaría conformado por el residuo Glu122, como aminoácido catalítico, y por los residuos Asp146, Gly148, Ser151 y Glu153 como posibles coordinadores del cofactor metálico (Figura 13).

4.3.1 Posible sitio de inhibición por fosfato

Dentro de los mecanismos de regulación que se habían descrito para la PPX se encontraba la inhibición de esta enzima por uno de sus productos, el fosfato inorgánico. En el caso de *E. coli* se determinó que esta inhibición ocurría *in vitro* a 20 mM de fosfato (Akiyama y cols, 1993). En el caso de *M. sedula* se especuló que se produciría una posible inhibición alostérica de esta PPX cuando se añadían 5 mM de fosfato (Rivero, 2016). Hasta ahora, no se ha reportado ningún sitio alostérico específico para fosfato inorgánico en las PPXs. A pesar de que la inhibición por fosfato no se ha demostrado *in vitro* para la PPX_{Af}, en este trabajo se deseaba poder determinar esa posible característica tanto *in vitro* como *in silico*. En primera instancia, se encontró una zona de mayor electropositividad en la región donde el PoliP ingresaría al sitio activo de la PPX_{Af} con respecto a la PPX_{Ec} (Figuras 6D y 6F) y se encontró que los residuos de esta zona se encontrarían relativamente conservados en otras PPXs (Figura 15B). Considerando estas características se propone que en esta zona se podría adherir electrostáticamente el fosfato inorgánico producto de la hidrólisis de los PoliP, provocando un aumento local de su concentración. Aunque no contamos con ninguna evidencia, se puede especular que los residuos que podrían unirse al PoliP podrían estar obstruidos por las moléculas de fosfato inorgánico. En ese caso, se esperaría que la unión del PoliP con la enzima fuera más débil al tener unidos los fosfatos inorgánicos, lo que finalmente conllevaría a

que el sustrato se pudiera liberar de la PPX y, con ello, ocurriría la inhibición de la actividad de la enzima. Cabe destacar que este posible mecanismo podría ocurrir de igual manera mediante otro tipo de moléculas pequeñas con carga negativa, como por ejemplo los iones sulfato, y que este tipo de inhibición sería más bien de carácter competitivo que alostérico. Sin embargo, para probar esta hipótesis sería necesaria la caracterización de la PPX_{Af} a nivel bioquímico.

4.3.2 Posible sitio de unión a metales

Por otra parte, en nuestro laboratorio se determinó que la actividad PPX aumentaría en presencia de concentraciones del orden micromolar de cobre en extractos celulares de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Álvarez y Jerez, 2004). En este Seminario de Título se propone un sitio de unión a metales en la PPX_{Af} que estaría compuesto por los residuos His379, His383 e His385 (Figura 16C). Luego, en el dímero se encontrarían 2 de estos sitios, uno en cada monómero (Figura 16B). La His es un aminoácido que puede unir Cu²⁺ mediante los electrones no enlazantes de los átomos de nitrógeno que se encuentran en el anillo imidazol de su cadena lateral (Rubino y Franz, 2012). Es importante destacar que en el caso de los sitios de unión a cobre también hay que considerar la distancia entre los residuos y la geometría del sitio que coordina al metal (Rubino y Franz, 2012). En el caso del nuevo posible sitio de unión a metales encontrado en la PPX_{Afi}, las His383 e His385 estarían a 8 Å de distancia en la parte final de una α -hélice y la His379 se encuentra en un loop, lo que sugiere que tendría un mayor grado de flexibilidad que los otros residuos para generar el sitio. Además, como se discutió anteriormente, la His379 tendría un papel relevante como “puerta” para mantener la estructura del túnel por donde atraviesa el PoliP hacia la enzima, dependiendo de su grado de protonación. Proponemos que la coordinación de un ion metálico en este sitio

podría estabilizar la conformación desprotonada de la enzima y así permitir que el PoliP transite de manera más eficiente por el túnel, lo que a nivel bioquímico se reflejaría en el aumento de la actividad de la enzima.

4.3.3 Modelo propuesto para el papel de PPX_{Af} en la activación temprana de los mecanismos de resistencia a metales

Los análisis bioinformáticos llevados a cabo en este Seminario de Título permitieron desarrollar un modelo (Figura 18) que podría explicar la hidrólisis rápida que sufren los PoliP cuando se encuentran en presencia de Cu²⁺ en *A. ferrooxidans* (Álvarez y Jerez, 2004; Castillo, 2013).

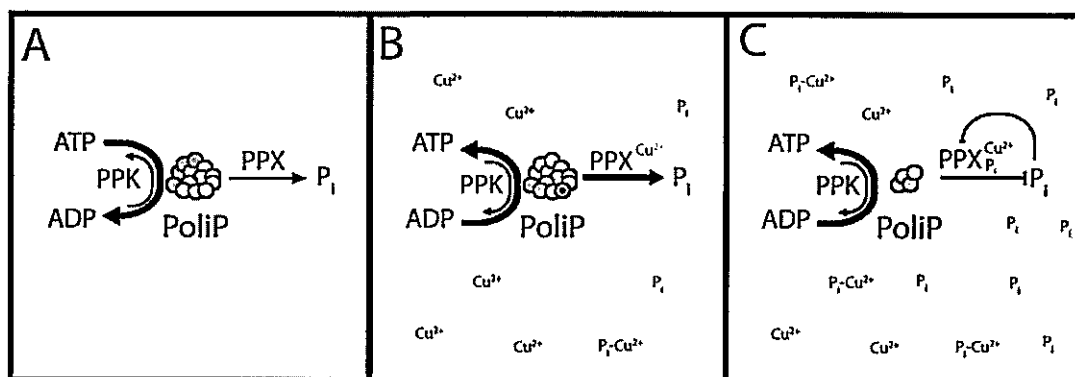


Figura 18. Modelo propuesto para explicar el fenómeno de hidrólisis temprana de los PoliP en presencia de un estrés por Cu²⁺ en *A. ferrooxidans*. En (A) se esquematiza el metabolismo de los PoliP en una situación control, en ausencia de metal. En (B) se muestra la situación inmediatamente después de aplicar el estrés por cobre y en (C) se ilustra lo que podría suceder cuando los niveles de los PoliP se estabilizan.

En una situación control, donde *A. ferrooxidans* no se encuentra expuesta a ningún metal, la síntesis y degradación de los PoliP, por la PPK y la PPX, respectivamente, se encuentran en un equilibrio que permite la acumulación de estas moléculas en forma de gránulos (Figura 18A). Cuando se expone a la bacteria a un estrés por cobre (Figura 18B), los sistemas de resistencia que ya tiene previamente sintetizados se utilizan para minimizar los efectos tóxicos causados por el metal. Entre estos mecanismos se encuentran las ATPasas tipo P (Figura 1), las cuales necesitarán un aumento de la

síntesis de ATP al interior de la célula para poder extruir los metales hacia el periplasma. El ATP se podría suplementar a partir de la reacción reversa de la PPK, la cual transfiere el fosfato terminal del PoliP a una molécula de ADP para formar ATP.

Otro de los mecanismos que formaría parte de los sistemas de resistencia son los cotransportadores de cobre, fosfato y protones (Figura 1), los cuales utilizan el gradiente de protones que se forma entre el medio extracelular y el citoplasma de la bacteria para permitir la entrada de complejos fosfato-cobre al interior del citoplasma. Nuestros resultados sugieren que el Cu^{2+} se podría unir a la PPX_{Af} y se postula que éste podría activar a la enzima. Por lo tanto, tras un estrés repentino de cobre, se espera que en la bacteria se degraden los PoliP, aumente la concentración de fosfato inorgánico intracelular y se revierta el flujo de iones a través de los cotransportadores anteriormente mencionados, permitiendo así el flujo de los metales tóxicos hacia el periplasma.

Luego de la activación de la PPX_{Af} , se esperaría que los PoliP continuaran hidrolizándose completamente; sin embargo, se ha descrito que esta hidrólisis se detiene cuando alcanza un mínimo de PoliP de 50 nmol de residuos de fosfato inorgánico por mg de proteína (Álvarez y Jerez, 2004; Castillo, 2013). Por lo tanto, debe existir algún mecanismo de regulación que permita detener la hidrólisis de los PoliP en esos niveles. Es por ello que se propone que la degradación de los PoliP se detiene porque la PPX_{Af} se inhibiría por el aumento en la concentración intracelular de fosfato inorgánico (Figura 18C), como se describió para *E. coli* (Akiyama y cols, 1993) y se propuso para *M. sedula* (Rivero, 2016).

La importancia de este mecanismo radica en que los sistemas de resistencia a metales generalmente involucran respuestas transcripcionales para aumentar el número de proteínas de resistencia presentes en el organismo. Este proceso necesita un determinado tiempo para desarrollarse que, de no existir otros sistemas previamente

montados, podría ser suficiente para que los efectos nocivos del metal provocaran la muerte de la bacteria. Un ejemplo es el caso de *E. coli*, que no acumula PoliP si no está sometida a algún estrés. Se ha descrito una mutante en el gen *phoU*, la cual se caracteriza por presentar acumulación de PoliP (Morohoshi y cols, 2002; Hitora y cols, 2013). En nuestro laboratorio se describió que esta mutante resiste mayores concentraciones de CuSO_4 que la cepa silvestre (Rivero y Jerez, Resultados no publicados).

Al tener PoliP para degradar, la bacteria mutante puede hidrolizarlos para producir fosfato inorgánico que podría revertir el flujo PitA, el cotransportador de metal, fosfato y protones, de tal manera que los iones metálicos se expulsan de la bacteria. Por otra parte, también podría sintetizar el ATP necesario para que las ATPasas permitan el flujo de Cu^{+2} al periplasma. Por el contrario, la bacteria silvestre no tiene la posibilidad de hidrolizar sus PoliP ya que sus niveles son muy bajos, por lo que los iones de cobre permanecen al interior de la bacteria provocando estrés oxidativo y la muerte de la misma a una menor concentración del metal.

5. CONCLUSIONES

1. El clonamiento del gen *ppx* de *A. ferrooxidans* permitió expresar la rPPX_{Af} de manera heteróloga en *E. coli*, puesto que no existen herramientas genéticas que permitan sobreproducir proteínas en *A. ferrooxidans*. Sin embargo, la rPPX_{Af} se expresó de manera insoluble en cuerpos de inclusión, posiblemente debido a algunas características propias de la proteína que impidieron su correcto plegamiento. Luego, no fue posible purificar la proteína ni hacer los ensayos bioquímicos que se plantearon en un comienzo. Por otra parte, se clonó el gen de la *ppx* de *E. coli*, utilizando la misma estrategia. A diferencia de la rPPX_{Af}, la rPPX_{Ec} se expresó de manera soluble y se purificó exitosamente, lo que reafirma que los problemas para expresar la rPPX_{Af} son debido a la proteína en sí y no al sistema utilizado o a las PPXs en general.

2. Un análisis bioinformático permitió determinar que las PPXs pueden diferir en estequiometría, tamaño y distribución de la carga en la superficie. El canal básico y los túneles son estructuras que no estaban presentes en todas las proteínas analizadas, lo que sugiere que podrían haber diversos mecanismos de reacción en estas enzimas. Además, se determinó que las PPXs de microorganismos del consorcio biominero se pueden agrupar en al menos 5 grupos, los que difieren en el largo de la proteína y en la presencia de dominios en el extremo C-terminal.

3. El modelamiento de la PPX_{Af} permitió determinar que ésta tenía un canal básico y dos túneles en la interfaz entre los dos monómeros que conforman la proteína. Además, se logró identificar el posible sitio activo y se propuso un sitio adicional de unión a metales que podría tener una función regulatoria. Estas características permitieron sugerir un modelo de acción de la enzima frente a un estrés por cobre, donde la PPX_{Af} se activaría por el metal y se inhibiría por el exceso de fosfato inorgánico generado por la hidrólisis del PolíP provocado por la misma.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A. (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J Biol Chem* 268:633-639
- Albi, T., Serrano, A. (2014) Two exopolyphosphatases with distinct molecular architectures and substrate specificities from the thermophilic green-sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* TLS. *Microbiology* 160:2067-2078
- Alvarado, J., Ghosh, A., Janovitz, T., Jauregui, A., Hasson, M.S., Sanders, D.A. (2006) Origin of exopolyphosphatase processivity: Fusion of an ASKHA phosphotransferase and cyclic nucleotide phosphodiesterase homolog. *Structure* 14:1263-1272
- Álvarez, S. (2004) Metabolismo de los polifosfatos inorgánicos en *Acidithiobacillus ferrooxidans*: posible papel en la respuesta de adaptación frente a la carencia de fosfato y en la tolerancia a iones de metales pesados. (Tesis doctoral) Universidad de Chile, Santiago, Chile
- Álvarez, S., Jerez, C.A. (2004) Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 70:5177-5182
- Aravind, L., Koonin, E.V. (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem Sci* 23:469-472
- Argüello, J.M. (2003) Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol* 195:93-108
- Ashkenazy, J., Abadi, S., Martz, E., Chay, O., Mayrose, I., Pupko, T., Ben-Tal, N. (2016) ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res* 44:W344-W350
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J., McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10037-10041
- Baker-Austin, C., Dopson, M. (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol* 15:165-171
- Banco Central de Chile (2016) Producto Interno Bruto por clase de actividad económica, trimestral, volumen a precios del año anterior encadenado. Disponible desde: <http://si3.bcentral.cl/estadisticas/Principal1/Excel/CCNN/trimestrales/excel.html>
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235-242
- Boetsch, C., Aguayo-Villegas, D.R., Gonzalez-Nilo, F.D., Lisa, Á.T., Beassoni, P.R. (2016) Putative binding mode of *Escherichia coli* exopolyphosphatase and polyphosphates based on a hybrid *in silico*/biochemical approach. *Arch Biochem Biophys* 606:64-72
- Bolesch D.G., Keasling J.D. (2000a) The effect of monovalent ions on polyphosphate binding to *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 274:236-241

- Bolesch D.G., Keasling J.D. (2000b) Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. *J Biol Chem* 275:33814-33819
- Bowie, J.U., Lüthy, R., Eisenberg, D. (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science* 253:164-170
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S., Oshima, Y. (1991) The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol* 11:3229-3238
- Cardona, S.T., Chávez, F.P., Jerez, C.A. (2002) The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in archaea. *Appl Environ Microbiol* 68:4812-4819
- Carrió M.M., Villaverde, A. (2002) Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J Biotechnol* 96:3-12
- Castillo, R. (2013) Papel de los polifosfatos inorgánicos y la respuesta al estrés oxidativo en la resistencia de *A. ferrooxidans* al cobre (Tesis de magíster) Universidad de Chile, Santiago, Chile
- Chan, H., Babayan, V., Blyumin, E., Gandhi, C., Hak, K., Harake, D., Kumar, K., Lee, P., Li, T.T., Liu, H.Y., Lo, T.C., Meyer, C.J., Stanfors, S., Zamora, K.S., Saier, M.H.Jr. (2010) The p-type ATPase superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 19:5-104
- Chen, M., Li, Y., Zhang, L., Wang, J., Zheng, C., Zhang, X. (2015) Analysis of gene expression provides insights into the mechanism of cadmium tolerance in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Curr Microbiol* 70:290-297
- ChemDraw Professional 15 [Computer software] (2015) Waltham, MA: PerkinElmer. Disponible desde http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/ChemDraw/ChemDrawProfessional/
- Choi, M.Y., Wang, Y., Wong, L.L., Lu, B.T., Chen, W.Y., Huang, J.D., Tanner, J.A., Watt, R.M. (2012) The two PPX-GppA homologues from *Mycobacterium tuberculosis* have distinct biochemical activities. *PLoS One* 7:e42561
- Dolinsky, T.J., Nielsen, J.E., McCammon, J.A., Baker, N.A. (2004) PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32:W665-W667
- Dopson, M., Holmes, D.S. (2014) Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:8133-8144
- Dopson, M. (2016) Physiological and phylogenetic diversity of acidophilic bacteria. En Quatrini, R., Johnson, D.B. (Ed) *Acidophiles. Life in extreme acidic environments* (pp. 79-92) Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Oureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44:D279-D285

- Gallardo, S. (2014) Estudio de los determinantes de resistencia a cadmio en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 (Tesis de magister) Universidad de Chile, Santiago, Chile
- Grillo-Puertas, M., Schurig-Briccio, L.A., Rodríguez-Montelongo, L., Rintoul, M.R., Rapisarda, V.A. (2014) Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 14:72
- Harrison, S.T.L. (2016) Biotechnologies that utilize acidophiles. En Quatrini, R., Johnson, D.B. (Ed) *Acidophiles. Life in extreme acidic environments* (pp. 265-283) Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Hedrich, S., Schippers, A. (2016) Distribution of acidophilic microorganisms in natural and man-made acidic environments. En Quatrini, R., Johnson, D.B. (Ed) *Acidophiles. Life in extreme acidic environments* (pp. 265-283) Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Hirota, R., Motomura, K., Nakai, S., Handa, T., Ikeda, T., Kuroda, A. (2013) Stable polyphosphate accumulation by a pseudo-revertant of an *Escherichia coli phoU* mutant. *Biotechnol Lett* 35:695-701
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33-38
- Huson, D.H., Scornavacca, C. (2012) Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Syst Biol* 61:1061-1067
- IDT Oligo Analyzer (Version 3.1) [Computer software] (2016) Coralville, IA: Integrated DNA Technology, Inc. Disponible desde <http://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- Jerez, C.A. (2011) Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. En Moo-Young, M. (Ed.) *Comprehensive Biotechnology* (pp. 717-729) Amsterdam, Holanda: Elsevier
- Jerez, C.A. (2012) The use of extremophilic microorganisms in the industrial recovery of metals. En Singh, O.V. (Ed.) *Extremophiles: Sustainable resources and biotechnological implications* (pp. 319-334) Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Johnson, D.B. (2014) Biomining-biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Curr Opin Biotechnol* 30:24:31
- Johnson, D.B. (2016) Microbial communities and interactions in low pH environments. En Quatrini, R., Johnson, D.B. (Ed) *Acidophiles. Life in extreme acidic environments* (pp. 121-138) Norfolk, UK: Caister Academic Press
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., Madden, T.L. (2008) NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res* 36:W5-W9
- Kapust, R.B., Waugh, D.S. (1999) *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8:1668-1674
- Keasling, J.D. (1997) Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann N Y Acad Sci* 829:242-249
- Keasling, J.D., Bertsch, L., Kornberg, A. (1993) Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7029-7033

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647-1649

Kim, E.H., Nies, D.H., McEvoy, M.M., Rensing, C. (2011) Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol* 193:2381-2387

Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A., Wang, J., Yo, B., Zhang, J., Bryant, S.H. (2016) PubChem substance and compound databases. *Nucleic Acids Res* 44:D1202-D1213

Kristensen, O., Laurberg, M., Liljas, A., Kastrup, J.S., Gajhede, M. (2004) Structural characterization of the stringent response related exopolyphosphatase/guanosine pentaphosphate phosphohydrolase protein family. *Biochemistry* 43:8894-8900

Kulaev I.S., Vagabov V.M. (1983) Polyphosphate metabolism in microorganisms. *Adv Microb Physiol* 24:83-171

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948

Liao, X., Butow, R.A. (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* 72:61-71

Lindner, S.N., Knebel, S., Wesseling, H., Schoberth, S.M., Wendisch, V.F. (2009) Exopolyphosphatases PPX1 and PPX2 from *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Environ Microbiol* 75:3161-3170

Lüthy, R., Bowie, J.U., Eisenberg, D. (1992) Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 356:83-85

Maestro, version 10.7 [Computer software] (2016) New York, NY: Schrödinger. Disponible desde <https://www.schrodinger.com/maestro>

Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczynski, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C., Bryant, S.H. (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res* 43:D222-D226

Martínez-Bussenius, C., Navarro, C.A., Jerez, C.A. (2016) Microbial copper resistance: importance in biohydrometallurgy. *Microb Biotechnol* doi: 10.1111/1751-7915.12450 [Publicación disponible en formato digital]

McCarthy, S., Ai, C., Wheaton, G., Tevatia, R., Eckrick, V., Kelly, R., Blum, P. (2014) Role of an archaeal PitA transporter in the copper and arsenic resistance of *Metallosphaera sedula*, an extreme thermoacidophile. *J Bacteriol* 196:3562-3570

Morohoshi, T., Maruo, T., Shirai, Y., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kuroda, A. (2002) Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain CC6803. *Appl Environ Microbiol* 68:4107-4110

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

Navarro, C.A., von Bernath, D., Jerez, C.A. (2013) Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biol Res* 46:363-371

NEBiocalculator (Version 1.5.0) [Computer software] (2016) Ipswich, MA: New England Biolabs Inc. Disponible desde <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>

Olsson, M.H., Søndergaard, C.R., Rostkowski, M., Jensen, J.H. (2011) PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J Chem Theory Comput* 7:525-537

Orell, A., Navarro, C.A., Arancibia, R., Mobarec, J.C., Jerez, C.A. (2010) Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnol Adv* 28:839-848

Orell, A., Navarro, C.A., Rivero, M., Aguilar, J.S., Jerez, C.A. (2012) Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. *Extremophiles* 16:573-583

Passerini, A., Lippi, M., Frasconi, P. (2011) MetalDetector v2.0: predicting the geometry of metal binding sites from protein sequence. *Nucleic Acids Res* 39:W288-W292

Raimunda, D., González-Guerrero, M., Leeber, B.W. 3rd, Argüello, J.M. (2011) The transport mechanism of bacterial Cu⁺-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function. *Biometals* 24:467-475

Rangarajan, E.S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hung, M.N., Schrag, J.D., Cygler, M., Matte, A. (2006) The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *J Mol Biol* 359:1249-1260

Rao, N.N., Gómez-García, M.R., Kornberg, A. (2009) Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem* 78:605-647

Rawlings, D.E. (2005) 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

Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H., Bork, P., Sander, C. (1993) Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp 70 superfamily. *Trends Biochem Sci* 18:247-248

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

Rivero, M. (2016) Estudio de la enzima exopolifosfatasa (PPX) y otros determinantes de resistencia a Cu²⁺ del arqueón *Metallosphaera sedula*. (Tesis doctoral) Universidad de Chile, Santiago, Chile

Roberts, E., Eargle, J., Wright, D., Luthey-Schulten, Z. (2006) MultiSeq: unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC Bioinformatics* 7:382

- Rosano, G.L., Ceccarelli, E.A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol* 5:172
- Rubino, J.T., Franz, K.J. (2012) Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *J Inorg Biochem* 107:129-143
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Sanner, M.F. (1999) Python: a programming language for software. *J Mol Graph Model* 17:57-61
- SnapGene software (Versión 3.2.1) [Computer software] (2016) Chicago, IL:GSL Biotech. Disponible desde www.snapgene.com
- Schippers, A., Hedrich, S., Vasters, J., Drobe, M., Sand, W., Willscher, S. (2014) Biomining: metal recovery from ores with microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 141:1-47
- Trott, O., Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:455-461
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., Arakawa, T. (2003) Practical considerations in refolding proteins in inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 28:1-8
- Ugochukwu, E., Lovering, A.L., Mather, O.C., Young, T.W., White, S.A. (2007) The crystal structure of the cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the basis for substrate specificity. *J Mol Biol* 371:1007-1021
- Valdés, J., Pedroso, I., Quatrini, R., Dodson, R.J., Tettelin, H., Blake, R. 2^{ndo.}, Eisen, J.A., Holmes, D.S. (2008) *Acidithiobacillus ferrooxidans* metabolism: from genome sequence to industrial applications. *BMC Genomics* 9:597
- van Veen, H.W., Abee, T., Kortstee, G.J., Konings, W.N., Zehnder, A.J. (1994) Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 33:1766-1770
- Vera, M., Guilliani, N., Jerez, C.A. (2003) Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 71:125-132
- Webb, B., Sali, A. (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics* 54:5.6.1-5.6.37
- Wei, Z.Z., Vatcher, G., Tin, A.H., Teng, J.L., Wang, J., Cui, Q.H., Chen, J.G., Yu, A.C. (2015) Positively-charged semi-tunnel is a structural and Surface characteristic of polyphosphate-binding proteins: an *in-silico* study. *PLoS One* 10:e0123713
- Xiang, Z. (2006) Advances in homology protein structure modeling. *Curr Protein Pept Sci* 7:217-227
- Zhang, A., Guo, E., Qian, L., Tang, N.Y., Watt, R.M., Bartlam, M. (2016) Purification, crystallization and X-ray crystallographic analysis of a putative exopolyphosphatase from *Zymomonas mobilis*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 72:172-178

7. MATERIAL COMPLEMENTARIO

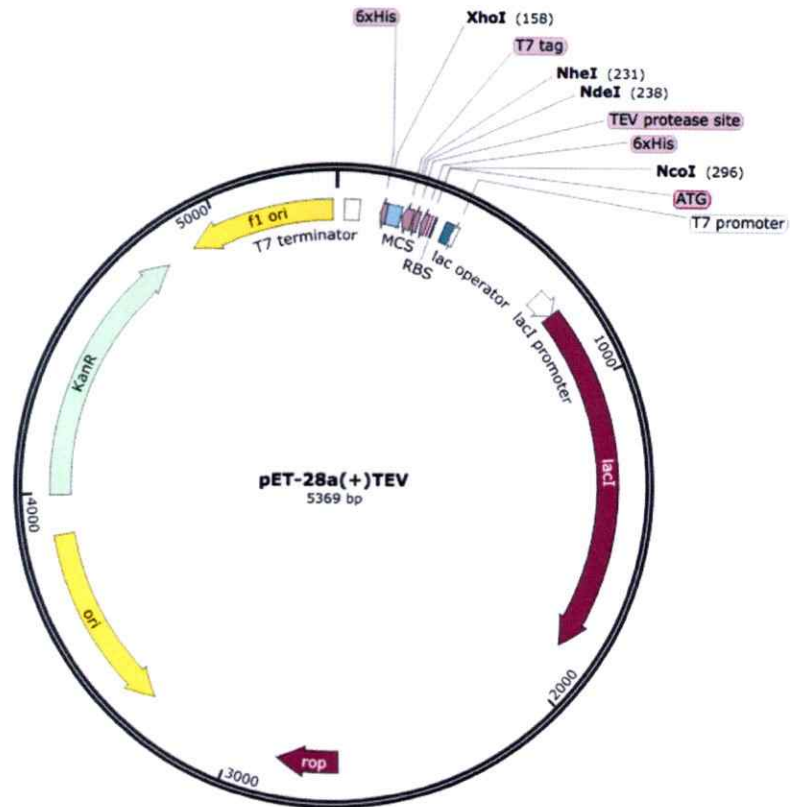


Figura S1. Esquema del vector pET-28aTEV. Se destacan los orígenes de replicación pBR322 y f1 (amarillo), la secuencia codificante del represor de operador lac, *lacI* (morado); el promotor T7; el gen que otorga resistencia a kanamicina (verde); la secuencia que codificará para la cola de histidina (rosado); la secuencia que codificará para el sitio de corte de la TEV proteasa que permite eliminar la cola de histidina (rosado) y el sitio múltiple de clonamiento (celeste). El esquema del plasmidio se dibujó con SnapGene (GSL Biotech, 2016)

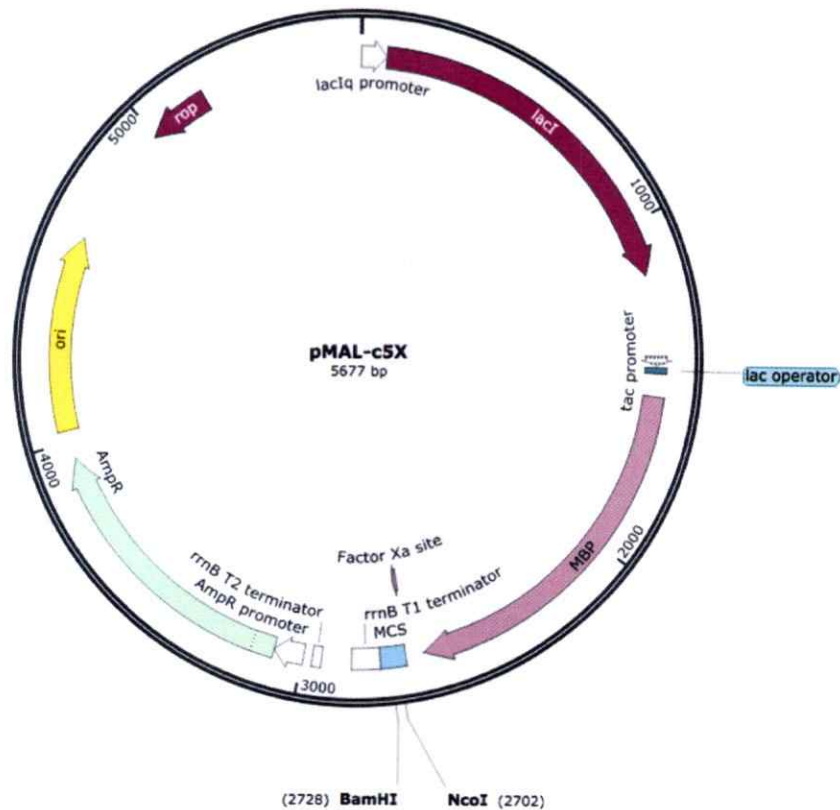


Figura S2. Esquema del vector pMAL-c5X. Se destacan el origen de replicación pMB1 (amarillo), la secuencia codificante del represor de operador lac, *lacI* (morado); el promotor tac (flecha con bordes discontinuos); la secuencia malE que codifica para la MBP (rosado); el sitio donde se traducirán los aminoácidos que permitirán cortar la MBP de la proteína de interés con el factor Xa; el gen que otorga resistencia a ampicilina (verde) y el sitio múltiple de clonamiento (celeste). Cabe destacar que este vector tiene la secuencia incompleta de la MBP, ya que no codifica para el péptido señal que envía la proteína al periplasma, por lo que la proteína de interés se expresa en el citoplasma. El esquema del plasmidio se dibujó con SnapGene (GSL Biotech, 2016)

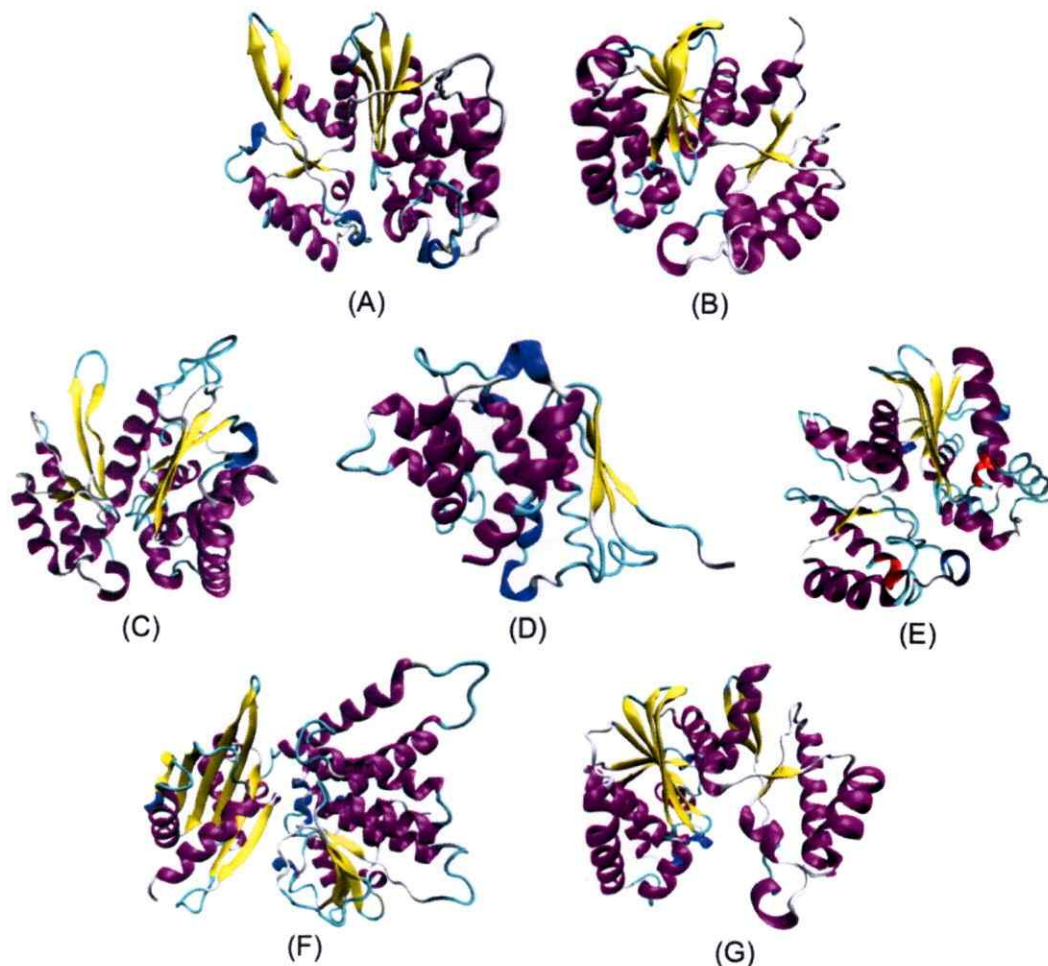


Figura S3: Estructura secundaria del dominio PPX/GppA de los monómeros de las PPX cristalizadas depositadas en Protein Data Bank. Las proteínas corresponden a las PPX de *Escherichia coli* (A), *Agrobacterium fabrum* (B), *Bifidobacterium longum* (C), *Yersinia pestis* (D), *Cytophaga hutchinsonii* (E), *Saccharomyces cerevisiae* (F) y *Aquifex aeolicus* (G). Los colores indican el tipo de estructura secundaria presente: en morado se muestran las alfa hélices; en amarillo, las hojas beta; en azul, hélices 3_{10} ; en rojo, hélices π ; en celeste, los loops y en blanco aquellas desordenadas.