

UCH-FC
Biotecnología
B 214
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

Desarrollo de herramientas para monitorear la expresión del gen *afeI*
de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sus productos



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

Alvaro Rodrigo Banderas Avalos
Enero, 2008
Santiago – Chile

Director del Seminario de Título: Dr. Nicolás Guiliani G.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Desarrollo de herramientas para monitorear la expresión del gen *afel* de
Acidithiobacillus ferrooxidans y sus productos**



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

Alvaro Rodrigo Banderas Avalos

Enero, 2008

Santiago – Chile

Director del Seminario de Título: Dr. Nicolás Guiliani G.



Desarrollo de herramientas para monitorear la expresión del gen *afeI* de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sus productos

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

Alvaro Rodrigo Banderas Avalos

Dr. Nicolás Guiliani Guerin
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dra. Rosalba Lagos Mónaco
Presidente Comisión

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Corrector

Santiago de Chile, Enero de 2008

A mi Padre

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Dr. Nicolás Guiliani por enseñarme y a todo el grupo de la Unidad de Comunicaciones Microbianas.

Al Dr. Carlos Jerez, al Dr. Francisco Chávez y a todo el grupo del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, en especial a Juan Araos.

A mis familias.

A mis amigos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS.

1. RESUMEN.	xii
2. ABSTRACT.	xiv
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1. Comunicación química bacteriana.....	1
3.1.1. Autoinducción.....	1
3.1.2. "Quorum sensing".....	2
3.1.3. Clasificación de los sistemas de "quorum sensing".....	3
3.2. "Quorum sensing" mediado por <i>N</i> -acil homoserina lactona (AHL) o autoinductor del tipo 1 (AI-1).	4
3.2.1. Síntesis y estructura de autoinductores del tipo AHL o AI-1.....	5
3.2.2. El regulador transcripcional del tipo LuxR.....	7
3.2.3. Transporte y acumulación de AHL.....	8
3.2.4. Regulación de la expresión del par génico <i>I / R</i>	9
3.3. <i>A. ferrooxidans</i> y "Quorum sensing".	10
3.3.1. <i>A. ferrooxidans</i>	10
3.3.2. El sistema de QS de <i>A. ferrooxidans</i>	10
3.4. Objetivos.	12
3.4.1. Objetivo General.....	12
3.4.2. Objetivos específicos.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
4.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	13
4.2. Técnicas de Biología Molecular.	14
4.2.1. Extracción del ADN cromosómico.....	14

4.2.2. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.	14
4.2.3. Cuantificación del ADN genómico y plasmidial.	15
4.2.4. Electroforesis del ADN en geles de agarosa.....	15
4.2.5. Diseño de oligonucleótidos y amplificación del <i>gen afel</i> mediante PCR con "partida en caliente".	15
4.2.6. Adenilación de extremos romos generados durante la amplificación por PCR.	17
4.2.7. Clonamiento de <i>afel</i> en <i>E. coli</i> TOP10F'.	17
4.2.8. PCR en colonias.....	18
4.2.9. Purificación de ADN plasmidial.	19
4.2.10. Clonamiento de <i>afel</i> en la cepa de expresión <i>E. coli</i> BL21(DE3).	19
4.2.11. Digestión con endonucleasas de restricción.	20
4.2.11.1. Análisis de restricción del ADN plasmidial.	20
4.2.11.2. Digestión y religación de pCRT7/NT-TOPO- <i>afelc</i>	20
4.2.12. Secuenciación del fragmento <i>afel</i>	20
4.3. Purificación de la proteína recombinante Afelr en condiciones desnaturantes.....	21
4.3.1. Inducción de la expresión de la proteína Afel recombinante.	21
4.3.2. Purificación y solubilización de cuerpos de inclusión.	21
4.3.3. Electroelución desde geles de poliacrilamida.....	22
4.3.3.1. Electroelución.	22
4.3.4. Cuantificación de proteínas.	22
4.3.5. Obtención de suero policlonal α -Afel.	22
4.4. Inmunodetección de la proteína Afel mediante western blots	23

4.5. Extracciones orgánicas desde cultivos bacterianos y detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina y biosensor bacteriano.	24
4.5.1. Extracción orgánica desde cultivos de <i>A. ferrooxidans</i>	24
4.5.1.1. Extracción del sobrenadante.	24
4.5.1.2. Extracción del precipitado celular.	25
4.5.1.3. Extracción de las perlas de azufre.	25
4.5.2. Extracción orgánica desde sobrenadantes de <i>E. coli</i> BL21(DE3).	25
4.6. Detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina.	26
4.6.1. Cromatografía en capa fina de fase reversa.	26
4.6.2. Revelado con biosensor <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	26
5. RESULTADOS	28
5.1. Expresión heteróloga de la proteína Afel en <i>E. coli</i> BL21(DE3).	28
5.1.1. Clonamiento del gen <i>afel</i> en <i>E. coli</i>	28
5.1.1.1. Purificación ADN genómico de la cepa ATCC23270 de <i>A. ferrooxidans</i>	28
5.1.1.2. Amplificación del gen <i>afel</i> mediante PCR con "partida en caliente".	28
5.1.1.3. Purificación <i>afel</i> desde geles de agarosa.	28
5.1.1.4. Clonamiento de <i>afel</i> en <i>E. coli</i> TOP10F'.	29
5.1.1.5. Selección de clones con plasmidios ligados en la orientación correcta.	29
5.1.1.6. Purificación ADN plasmidial.....	30
5.1.1.7. Análisis de Restricción del ADN plasmidial.....	31
5.1.1.8. Clonamiento de <i>afel</i> en la cepa de expresión <i>E. coli</i> BL21(DE3). ...	32
5.1.2. Inducción de la expresión de la proteína Afel recombinante.	32
5.2. Detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina (TLC).	34

5.2.1. Estándares de AHL sintéticos.....	34
5.2.2. AHLs producidas por la enzima Afel expresada de forma heteróloga en <i>E. coli</i>	36
5.2.3. AHLs producidas por <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	37
5.3. Obtención de suero policlonal α -Afel.....	40
5.3.1. Sobreexpresión de la proteína Afel en <i>E. coli</i> BL21(DE3)-Afel	41
5.3.2. Purificación de Afel.....	42
5.3.3. Electroelución desde geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes.....	43
5.3.4. Inmunodetección de Afel en extractos de <i>A. ferrooxidans</i>	47
6. DISCUSIÓN	49
7. BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Condiciones óptimas para la amplificación del gen *afel*.

Tabla 2. Composición óptima para la reacción de PCR con "partida en caliente" para la amplificación de *afel*.

Tabla 3. Reacción de adenilación molde-independiente en los extremos 3' del fragmento purificado.

Tabla 4. Reacción de ligación del fragmento *afel* adenilado, con el vector pCRT7/NT-TOPO.

Tabla 5. Reacción de PCR de colonias.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Sistema canónico de señalización vía AHLs en *V. fischeri*.

Figura 2. Ejemplos de *N*-acil homoserina lactonas (AHLs).

Figura 3. Amplificación por PCR del fragmento *afel* a partir de ADN genómico purificado.

Figura 4. PCR de colonias efectuado a 48 clones transformados con pCRT7/NT-TOPO-*afelc*.

Figura 5. Purificaciones de plasmidios hechas a 10 clones TOP10F' (pCRT7/NT-TOPO-*afelc*) que tienen el inserto *afel* en la orientación correcta.

Figura 6. Análisis de restricción realizado a 10 purificaciones plasmidiales hechas desde clones transformantes positivos de TOP10F'.

Figura 7. Análisis de la sobreexpresión de la proteína Afelc mediante SDS-PAGE.

Figura 8. Estimación de la sensibilidad del biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4).

Figura 9. Detección de moléculas producidas por la enzima Afel en *E. coli*.

Figura 10. Detección de las AHLs producidas por *A. ferrooxidans* en fase estacionaria temprana.

Figura 11. Detección de moléculas presentes en el sobrenadante de cultivo, precipitado celular y perlas de azufre de un cultivo de fase estacionaria tardía de *A. ferrooxidans*.

Figura 12. SDS-PAGE mostrando la sobreexpresión de la proteína Afel recombinante en cuatro cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-Afel.

Figura 13. Análisis de las etapas de la extracción y solubilización de cuerpos de inclusión de *E. coli* BL21(DE3)-Afel mediante SDS-PAGE.

Figura 14. SDS-PAGE mostrando el resultado de la electroelución efectuada a la proteína Afel.

Figura 15. Gel en gradiente de poliacrilamida (10-20%) desde donde se electroeluyó la proteína Afel.

Figura 16. Electroelución de la proteína Afel desde geles en gradiente de poliacrilamida.

LISTA DE ABREVIATURAS.

3-oxo-C10-HSL	<i>N</i> -3-oxo-decanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C12-HSL	<i>N</i> -3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C6-HSL	<i>N</i> -3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C8-HSL	<i>N</i> -3-oxo-octanoil-L-homoserina lactona
ABE	Agua bidestilada estéril
Acyl-ACP	Proteína cargadora de acilos acilada
AHL	<i>N</i> -acil homoserina lactona
AI	Autoinductor
AI-1	Autoinductor del tipo 1
AI-2	Autoinductor del tipo 2
BSA	Seroalbúmina de bovino
C10-HSL	<i>N</i> -decanoil-L-homoserina lactona
C12-HSL	<i>N</i> -dodecanoil-L-homoserina lactona
C4-HSL	<i>N</i> -butiril-L-homoserina lactona
C6-HSL	<i>N</i> -hexanoil-L-homoserina lactona
C8-HSL	<i>N</i> -octanoil-L-homoserina lactona
dATP	deoxyadenosil trifosfato
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxynucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EPS	Sustancia exopolimérica
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
MTA	5'-metiltioadenosina
OH-C10-HSL	<i>N</i> -3-hydroxydecanoil-L-homoserina lactona
OH-C6-HSL	<i>N</i> -3-hydroxyhexanoil-L-homoserina lactona
OH-C8-HSL	<i>N</i> -3-hydroxyoctanoil-L-homoserina lactona
ORF	Marco Abierto de Lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
QS	Quorum sensing
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris-acetato-EDTA
Tm	Temperatura de desnaturación
TRIS	Trishidroximetilaminometano
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

1. RESUMEN.

El "Quorum Sensing" (QS) es un sistema de comunicación bacteriana que controla la expresión de ciertos genes en función del tamaño poblacional. Existen varios tipos de sistemas de QS. El sistema más estudiado en bacterias Gram-negativas es el QS mediado por *N*-acil homoserina lactona (AHL). En este tipo de señalización están involucradas dos familias proteicas: la familia de proteínas R, compuesta por reguladores transcripcionales cuya actividad depende de AHL y la familia I, compuesta por sintetas de AHL. Las AHLs son moléculas orgánicas pequeñas que se acumulan en el medio proporcionalmente con el aumento de la población bacteriana. Cuando se alcanza una concentración umbral activa de AHL, ésta se une a los reguladores R, que regulan la transcripción de genes blancos.

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria biotecnológicamente relevante por su rol en el proceso de biolixiviación de minerales. El estudio del fenómeno de QS en *A. ferrooxidans* es relevante dado que fenotipos importantes para el proceso de biolixiviación podrían ser regulados por este sistema.

En este estudio se desarrollaron herramientas para el estudio de la expresión de la proteína Afel y la detección de sus productos, como, la generación de anticuerpos policlonales α -Afel y la estandarización de la técnica de detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina (CCF) acoplada a biosensor bacteriano. Además, se confirmó que la proteína Afel es capaz de sintetizar *N*-acil homoserina lactonas cuando es expresada de manera heteróloga en *Escherichia coli* y en su contexto nativo en *A. ferrooxidans*. La proteína Afel fue purificada con éxito en condiciones desnaturantes y se logró generar suero policlonal α -Afel, esto permitirá comparar el nivel de expresión de la proteína en distintas condiciones y, además, detectar la presencia de homólogos

que inmunoreaccionen con el suero, en otras bacterias del consorcio biolixivante. Utilizando la técnica de CCF acoplada a biosensor, se logró detectar un máximo de siete señales presentes en el medio de cultivo de *A. ferrooxidans*. Las señales fueron identificadas de manera tentativa utilizando estándares sintéticos como referencia y efectuando comparaciones con datos obtenidos previamente por nuestro laboratorio mediante espectrometría de masa. La puesta a punto de la técnica de CCF acoplada a biosensor permitirá efectuar búsquedas de otras cepas productoras de AHL.

2. ABSTRACT.

Quorum Sensing (QS) is a bacterial communication system in which gene expression is under control of cell density. There are several types of QS systems. The main studied system in Gram-negative bacteria is the *N*-acyl homoserine lactone (AHL) mediated QS. Two protein families are involved in this type of signalling: the R protein family, composed of transcriptional regulators whose activity depends on the AHL, and the I protein family composed of AHL synthases. AHLs are small organic compounds which accumulate in the culture media as the bacterial population increases. When the concentration of AHLs reaches a concentration threshold, it interacts with its respective R regulator and the transcription of target genes is regulated.

Acidithiobacillus ferrooxidans is a biotechnologically relevant bacteria cause of its role in the ore biolixivation process. The study of QS phenomena in *A. ferrooxidans* is important due to the possible biolixivation-relevant phenotypes that might be regulated by this system.

In this study, the *N*-acyl homoserine lactone synthase activity of the Afel protein was confirmed by its heterologous expression in *Escherichia coli* and the subsequent detection of its products in the culture supernatant. Furthermore, tools for studying the expression of the Afel protein and the detection of its products were developed, i.e. the generation of α -Afel polyclonal antibodies and the standarization of the bacterial biosensor associated thin layer chromatography technique for the detection of AHL molecules. The Afel protein was successfully purified under denaturing conditions and α -Afel polyclonal antisera was generated. This will allow comparative analysis of the protein expression level under different conditions and the detection cross-reacting Afel homologs from other biomining microorganisms. Using the TLC a maximum of seven

different signals present in the *A. ferrooxidans* culture media capable of inducing the biosensor activation were detected. The tentative identification of the signals was performed using synthetic standards as reference and making comparisons with mass spectrometry data previously obtained.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. Comunicación química bacteriana.

La visión de las bacterias como células individuales ha sido reemplazada poco a poco por la idea de que el comportamiento de grupo es una característica generalizada y natural de éstas. En el establecimiento de comportamientos grupales, la señalización a través de moléculas químicas es un factor fundamental. La capacidad de producir una señal química, liberarla al medio extracelular, y transducirla a través de receptores específicos, generando fenotipos cooperativos, constituye un tipo de comunicación química. Es importante diferenciar entre señal, indicación, y manipulación química, en cuanto a si se interpreta como comunicación o no un determinado intercambio de señales químicas entre microorganismos (Keller y Surette, 2006; West y col., 2006). La señalización célula-célula en bacterias tiene uno de sus orígenes en la descripción del fenómeno denominado autoinducción, y posteriormente generalizado en el concepto de "Quorum sensing" (QS).

3.1.1. Autoinducción.

Cuando células de *Vibrio fischeri* provenientes de cultivos en fase exponencial son inoculadas en medio fresco, ocurre un retraso temporal (lag) en la inducción de la luminiscencia. Este retardo está caracterizado por un breve periodo oscilatorio y una posterior caída en los valores de luminiscencia, que son recuperados a medida que la bacteria crece. Este retardo puede ser superado al efectuar el inóculo en un medio donde otro cultivo de *V. fischeri* ha crecido previamente (medio "condicionado") (Kempner y Hanson, 1968). Este hallazgo condujo a la definición de dicho fenómeno como "autoinducción" (Nealson y col., 1970) y a la posterior caracterización e

identificación estructural de la molécula responsable, la que se denominó autoinductor (AI) (Eberhard, 1972; Eberhard y col., 1981). El AI funciona como un inductor extracelular producido por la propia célula y su acumulación en el medio de cultivo gatilla la expresión del fenotipo bioluminiscente. Crecido en un matraz, *V. fischeri* adopta este fenotipo bioluminiscente al expresar el operón *luxICDABE* sólo cuando la concentración extracelular del AI identificado como *N*-3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL), alcanza una concentración suficiente capaz de inducir la activación del regulador transcripcional específico LuxR, localizado en el citoplasma. Dado que la molécula 3-oxo-C6-HSL difunde libremente a través de las membranas de *V. fischeri* (Kaplan y Greenberg, 1985), las concentraciones extra e intracelular de 3-oxo-C6-HSL se equilibran de modo que la concentración extracelular refleja la concentración citoplasmática necesaria para regular la expresión de los blancos regulatorios. De esta manera, la acumulación de 3-oxo-C6-HSL dentro de cada bacteria aumentará de manera correlativa con la densidad celular del cultivo. Esta correlación dio origen a la hipótesis de que la función natural de la señalización vía autoinductores es la de expresar fenotipos particulares en función de la densidad celular, de tal manera que solo cuando se alcanza un número determinado de bacterias o "quorum" se expresa el fenotipo, que de ser efectuado individualmente, resultaría improductivo o sub-óptimo.

3.1.2. "Quorum sensing".

La respuesta sincrónica de un monocultivo bacteriano cerrado a la acumulación extracelular de AI ha sido denominada "quorum sensing" (QS) (Fuqua y col., 1994). El término QS es usado para definir la regulación transcripcional mediada por autoinductores y ha sido propuesto como un mecanismo general de coordinación de

expresión fenotípica en respuesta a cambios en la densidad celular. En base a las evidencias antes mencionadas para la autoinducción en *V. fischeri* se ha establecido un modelo general de funcionamiento que se ha extendido a otros sistemas donde existe señalización célula-célula. Los sistemas de QS descritos tienen distintos niveles de complejidad y los componentes moleculares que participan en el mecanismo poseen gran variabilidad.

3.1.3. Clasificación de los sistemas de “quorum sensing”.

Existen varios tipos de QS que han sido clasificados de acuerdo con la naturaleza del autoinductor y los diferentes mecanismos que controlan su síntesis y la respuesta celular que gatillan. De acuerdo con el tipo de autoinductor secretado se pueden clasificar los distintos tipos de QS en, a lo menos, tres grandes grupos.

QS mediado por N-acil homoserina lactonas (AHL).

Es el primer sistema descrito y el más estudiado. Las AHLs son usadas como moléculas de comunicación por varias bacterias Gram-negativas, sin embargo los mecanismos de síntesis y transducción de la señal son variables. El QS mediado por AHL más común es aquel que usa una proteína de la familia I como sintasa y una proteína de la familia R como regulador transcripcional específico. En bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Vibrio fischeri*, la forma en que se llevan a cabo los mecanismos moleculares mediados por las proteínas I y R, se ha descrito con alto nivel de detalle. En la siguiente sección se analizará en extenso este tipo de señalización.

QS mediado por oligopéptidos modificados.

Este tipo de comunicación es característica de bacterias Gram-positivas. Otra diferencia notable con la señalización mediada por AHLs, además de la naturaleza

química del autoinductor, es que la transducción de la señal ocurre a través de un sistema de dos componentes que involucra un receptor de membrana y una posterior cascada de fosforilación que termina en una regulación transcripcional diferencial (Miller y Bassler, 2001).

QS mediado por furanosil borato diester (AI-2).

Inicialmente descrito en *Vibrio harveyi*, ha sido considerado un tipo de señalización interespecie. El AI-2 es sintetizado por el producto del gen *luxS*, que está presente en una gran cantidad de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Las bacterias pueden poseer este sistema además de otro sistema de QS funcional (Xavier y Bassler, 2003).

Además de estos tres grupos, existen muchos otros tipos de moléculas de señalización y sistemas de detección. Por ejemplo, *V. harveyi* posee, además del QS mediado por AI-2, un sistema híbrido, donde el autoinductor es una molécula de AHL, pero la detección y transducción de ésta ocurre a través de un receptor de membrana, de manera similar a los sistemas encontrados en bacterias Gram-positivas. En bacterias del género *Myxococcus*, la formación del cuerpo frutoso se debe a la existencia de un comportamiento grupal que genera una estructura semejante a un organismo multicelular y cuyo desarrollo está regulado por las señales "A" y "C" que corresponden a una mezcla de péptidos y aminoácidos libres y a una pequeña proteína de membrana externa, respectivamente (Kaiser, 2004).

3.2. "Quorum sensing" mediado por N-acil homoserina lactona (AHL) o autoinductor del tipo 1 (AI-1).

Las AHLs pueden ser sintetizadas por al menos tres familias distintas de sintetas y sensadas por al menos dos familias distintas de receptores. Los sistemas de QS

mediado por AHL más estudiados son homólogos al sistema descrito inicialmente en *V. fischeri* y comparten los componentes básicos de éste. En este sistema la síntesis ocurre a través de una sintasa de la familia I y la respuesta es mediada por un regulador transcripcional de la familia R (Gray y Garey, 2001) (Fig. 1). A continuación se detallarán la estructura, síntesis y transducción de la molécula de AHL en sistemas del tipo *I/R*.

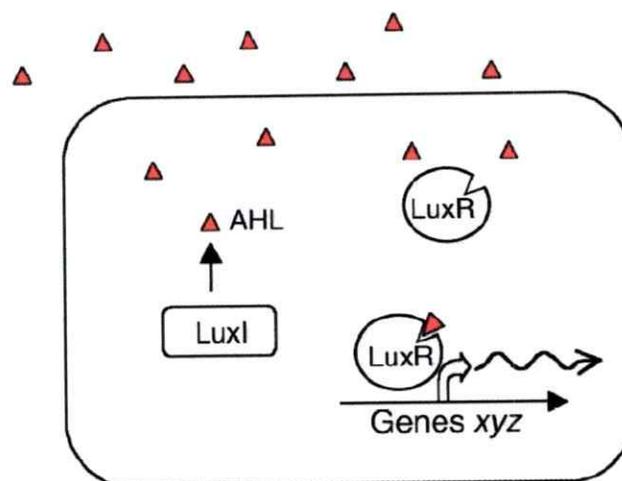


Figura 1. Sistema canónico de señalización vía AHLs en *V. fischeri* (Federle y Bassler, 2003). La proteína LuxI sintetiza la señal AHL. La señal difunde libremente a través de la membrana plasmática. Cuando se alcanza una concentración extracelular (e intracelular) umbral de AHL, ésta se une al regulador transcripcional LuxR, activando la transcripción de genes blanco desde un operador denominado caja lux.

3.2.1. Síntesis y estructura de autoinductores del tipo AHL o AI-1.

La variabilidad estructural de las AHLs descritas hasta ahora, reside en el largo de la cadena acil, el tipo de sustitución en su carbono 3 (grupo hidroxilo o grupo ceto), y la presencia o no de insaturaciones (Fig. 2). Existen tres familias de enzimas, no homólogas entre sí, capaces de sintetizar la señal AHL, cuyos miembros representativos son: LuxI (Engebrecht y Silverman, 1984), AinS/LuxM (Gilson y col., 1995) y HdtS (Laue y col., 2000). Las proteínas de la familia LuxI (ó I), sintetizan AHLs

a partir de los sustratos acyl-acyl carrier protein (acyl-ACP) y S-adenosil metionina (SAM) (More y col., 1996; Schaefer y col., 1996). El mecanismo de síntesis propuesto consiste en la N-acilación y la lactonización de la metionina, generándose el enlace amida entre la cadena acil y el anillo homoserina lactona. Los productos de esta reacción son la AHL, la 5'-metiltioadenosina (MTA) y la holo-ACP.

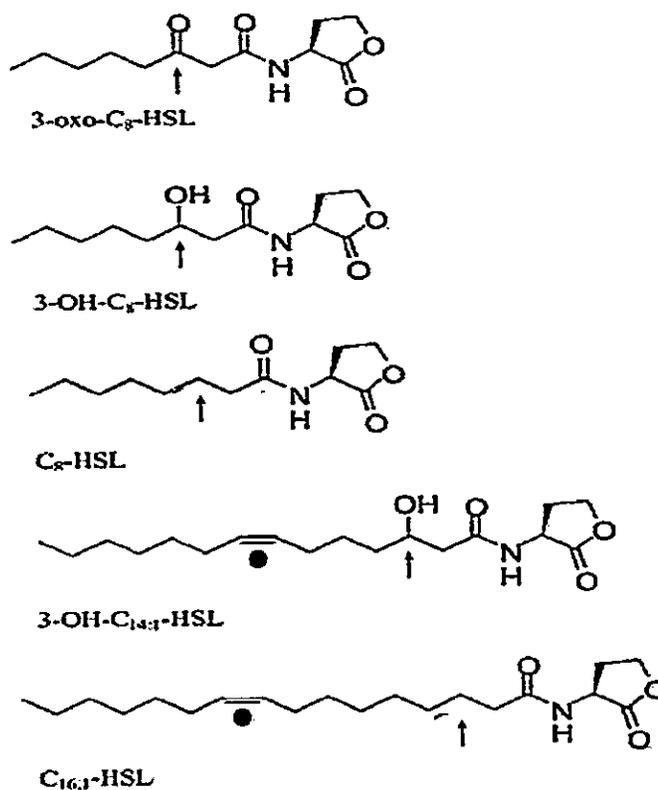


Figura 2. Ejemplos de N-acil homoserina lactonas (AHLs). Las estructuras de las distintas AHLs descritas en la literatura varían en el número de carbonos que componen la cadena acilo (4-18 carbonos), la presencia o ausencia de los grupos funcionales ceto (oxo) o hidroxilo en el carbono 3, y la presencia de insaturaciones. El carbono 3 se indica con una flecha, las insaturaciones se muestran con un punto (adaptado de González y Marketon, 2003).

La familia AinS/LuxM se refiere a dos proteínas homólogas entre sí (AinS de *V. fischeri* y LuxM de *Vibrio harveyi*). En *V. fischeri*, además de la antes mencionada 3-oxo-

C6-HSL (producto de LuxI), se sintetiza la señal *N*-octanoil-homoserina lactona (C8-HSL), que es producto de la proteína AinS. En *V. harveyi*, LuxM sintetiza la señal *N*-(3-hidroxi-butiril)-homoserina lactona. La actividad enzimática de esta familia es equivalente a la de la familia I (Hanzelka y col., 1999).

La enzima HdtS de *Pseudomonas fluorescens* sintetiza AHL hidroxisustituidas con largos de cadena acil de 6, 12 y 14 carbonos. Una de estas AHLs es *N*-(3-hidroxi-7-cis-tetradecenoil) homoserina lactona, antes conocida como "bacteriocina pequeña de *Rhizobium*", responsable de inhibir el crecimiento bacteriano (Wilkinson y col., 2002).

3.2.2. El regulador transcripcional del tipo LuxR.

Los reguladores transcripcionales de la familia LuxR comparten dos dominios de homología conservados: el de unión a ADN, del tipo hélice-vuelta-hélice en la región carboxi-terminal y el de unión a AHL, en la región amino-terminal. El sitio de unión al ADN descrito para *V. fischeri* es llamado caja *lux* (o caja *tra* para *Agrobacterium tumefaciens* y caja *las* para *Pseudomonas aeruginosa*). La estructura dimérica del homólogo de *A. tumefaciens* TraR acomplejada con sus 2 moléculas de 3-oxo-C8-HSL y unida a la caja *tra* ha sido determinada por cristalización y difracción de rayos-X (Vannini y col., 2002; Zhang y col., 2002). El mecanismo a través del cual los distintos miembros de la familia R regulan la transcripción de sus genes blanco, varía en cada sistema. En *A. tumefaciens*, la unión de la señal 3-oxo-C8-HSL permite la dimerización del regulador TraR y la posterior interacción de este con la caja *tra*, promoviéndose la transcripción del gen que se encuentra río abajo de ésta (Fuqua y Winans, 1996; Zhu y Winans, 2001). Este modelo de inducción es compartido por muchos sistemas sujetos a regulación por QS. Los sistemas *lux* de *V. fischeri* y *las* de *P. aeruginosa*, también

poseen proteínas R que funcionan como activadores transcripcionales. En estos sistemas, al menos para los blancos genéticos mejor caracterizados, la caja se ubica alrededor de la posición -40 a -45 con respecto al inicio transcripcional de los genes blanco.

Algunos reguladores transcripcionales de la familia R se unen a sus secuencias blanco en ausencia y se liberan de ellas en presencia de AHL, como es el caso de EsaR de *Pantoea stewartii* o ExpR_{Ecc} de *Erwinia carotovora* (Andersson y col., 2000; Minogue y col., 2002). Ambos reguladores son represores de sus blancos genéticos conocidos. No obstante, pueden funcionar como activadores transcripcionales en sistemas genéticos artificiales al unirse en ausencia de AHL a la caja *lux* e inducir la expresión del operón de bioluminiscencia de *V. fischeri* (von Bodman y col., 2003).

3.2.3. Transporte y acumulación de AHL.

La libre difusión de AHLs a través de las membranas de las bacterias que las producen, ha sido estudiada usando autoinductores marcados radiactivamente (Kaplan y Greenberg, 1985; Pearson y col., 1999). Los trabajos demuestran que las AHLs de cadena corta como C4-HSL y 3-oxo-C6-HSL pueden difundir libre y rápidamente a través de las membranas celulares. La señal hidrofóbica 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* puede difundir a través de las membranas, pero de una forma más lenta ó puede ser transportada activamente por una bomba de eflujo (Pearson y col., 1999). En el caso de las bacterias *Rhodobacter capsulatus*, que produce las AHLs C16-HSL y C14-HSL, y *Paracoccus denitrificans*, que produce C16-HSL, experimentos con AHLs radiactivas demuestran que la mayoría de estas señales son retenidas por las bacterias y no son libremente difusibles, como el caso de *V. fischeri* (Schaefer y col.,

2002). Se estimó que la concentración de AHLs asociada con las células sería aproximadamente 50 veces mayor que aquella detectada en el exterior.

Estos resultados sugieren una relación entre el grado de hidrofobicidad de las AHLs y su retención en las células, ya sea a nivel citoplasmático o de membranas. Por ende, establecen una diferencia importante entre *V. fischeri* y bacterias que producen AHLs hidrofóbicas, en cuanto a la homogeneidad de concentraciones que existen dentro y fuera de la célula.

3.2.4. Regulación de la expresión del par génico *I / R*.

Los genes que codifican para los componentes principales de un sistema del tipo *I / R* están sujetos a regulación transcripcional, incluyendo una autorregulación. Cuando el gen *R* se autorregula, induce un aumento de sus niveles de transcripción en presencia de AHL, ya sea por activación o desrepresión, como en el caso de los genes *luxR* y *esaR*, respectivamente (Shadel y Baldwin, 1992; Minogue y col., 2002). El gen *I* también está sujeto a autorregulación, pues la cantidad de transcrito depende directamente de la concentración de AHL. En la mayoría de los sistemas de QS descritos, la autorregulación es positiva. Por lo general existe una caja de tipo *lux* río arriba del inicio transcripcional del gen *I*. Se piensa que esta autorregulación positiva permite una acumulación exponencial de la señal, y que este hecho tiene que ver con la rapidez de la inducción fenotípica, como en el caso de la bioluminiscencia en *V. fischeri*. La autorregulación positiva no ocurre en todos los sistemas, por el contrario, existe al menos un ejemplo de inhibición transcripcional del gen *I*, inducida por AHL (McGowan y col., 2005).

3.3. *A. ferrooxidans* y "Quorum sensing".

3.3.1. *A. ferrooxidans*.

La bacteria Gram-negativa acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* es una γ -proteobacteria quimiolitotrófica capaz de obtener su energía a partir de la oxidación aeróbica de ión ferroso, azufre elemental y compuestos reducidos de azufre (Rawlings y Kusano, 1994). Por esta razón, *A. ferrooxidans* es utilizado frecuentemente en la biolixiviación de minerales en la industria minera. La manera en la que este microorganismo se une a la superficie de minerales como la pirita, es mediante una capa de sustancia exopolimérica (EPS). Esta capa forma una matriz donde eventualmente las células se dividen y forman una biopelícula (Rawlings, 2002). Esta matriz está impregnada de especies de Fe^{+3} acomplejados con ácido glucurónico y sirve de espacio de reacción en donde la alta concentración de ión férrico ataca químicamente al mineral en sus enlaces covalentes. En el proceso, el ión Fe^{+3} es reducido a ión Fe^{+2} que es oxidado nuevamente por la bacteria. También en este proceso ocurre una acidificación local que contribuye a la disolución del mineral (Kinzler y col., 2003).

3.3.2. El sistema de QS de *A. ferrooxidans*.

Entre las bacterias Gram-negativas que tienen un sistema de QS mediado por AHL, se incluyen las proteobacterias púrpuras fototróficas, vibrios marinos, bacterias de la rizósfera y patógenos oportunistas de plantas y animales. En estos microorganismos el QS regula múltiples funciones tales como la síntesis de exoenzimas, conjugación, síntesis de EPS, producción de antibióticos, luminiscencia y formación de biopelículas (Pirhonen y col., 1993; Fuqua y Winans, 1994; Davies y col.,

1998; Dunlap, 1999; Gray y Garey, 2001; Marketon y col., 2003; McGowan y col., 2005). *A. ferrooxidans* posee un sistema de QS mediado por AHLs (Farah y col., 2005), sin embargo, los fenotipos regulados por este sistema no se conocen. Algunos de los fenotipos expresados por *A. ferrooxidans* en el proceso de biolixiviación de minerales, podrían ser regulados por QS. Por otra parte, el control de los mecanismos involucrados en el proceso de biolixiviación puede conducir a mejoras en los parámetros globales del proceso, tales como aumentos en el rendimiento o en la velocidad de la extracción. Por estos motivos el estudio del QS en *A. ferrooxidans* posee interés biotecnológico.

Los componentes principales del sistema de QS fueron previamente identificados (Farah y col., 2005; Rivas y col., 2005). *A. ferrooxidans* posee un sistema de QS mediado por AHLs, y posee al menos los componentes básicos del sistema de *V. fischeri*. Las proteínas I y R se denominaron AfeI y AfeR, respectivamente. Los genes *afeI* y *afeR* están organizados divergentemente y existe un tercer marco de lectura en la zona intergénica denominado *orf3*. También existe una secuencia palindrómica río arriba del gen *afeI* denominada caja *afe*.

A. ferrooxidans posee, además, dos genes homólogos a la sintasa de AHL *hdtS* de *Pseudomonas fluorescens* (Farah y col., 2005).

La existencia de un sistema de QS mediado por AHLs en *A. ferrooxidans* y el desconocimiento del funcionamiento molecular particular de éste, hacen necesaria la medición de los componentes del sistema bajo distintas condiciones. La expresión de la proteína AfeI es un factor fundamental en el entendimiento de la operación del sistema, por ser esta la responsable de la síntesis de la señal y estar directamente bajo el control transcripcional de AfeR. En este estudio se desarrollaron herramientas que permitirán medir de manera rutinaria la expresión de la proteína AfeI y la producción de

AHLs en *A. ferrooxidans*. Esto se logró gracias a la obtención de suero policlonal α -AfeI, que será usado posteriormente en estudios de expresión y a la implementación de la técnica de cromatografía en capa fina acoplada a biosensor, para detectar de manera rutinaria las AHLs presentes en sobrenadantes de cultivo.

3.4. Objetivos.

3.4.1. Objetivo General.

Desarrollar herramientas que permitan medir los niveles de expresión de AfeI y de las AHLs sintetizadas.

3.4.2. Objetivos específicos

Objetivo específico 1

Implementar la técnica de cromatografía en capa fina asociada a biosensor y detectar la presencia de AHLs producidas por AfeI en su contexto nativo.

Objetivo específico 2

Purificar la proteína AfeI sobreexpresada de forma heteróloga en condiciones desnaturalantes.

Objetivo específico 3

Generar suero policlonal α -AfeI y detectar la proteína en extractos proteicos de *A. ferrooxidans*

4. MATERIALES Y MÉTODOS.



4.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

La cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 se creció aeróbicamente en medio basal 9K modificado [(NH₄)₂SO₄ 0,1 g/l; MgSO₄•7H₂O 0,4 g/l; K₂HPO₄•3H₂O g/l 0,04 g/l] suplementado con FeSO₄•7H₂O (33 g/l) (para la obtención de ADN cromosómico) ó azufre elemental en perlas 50 g/l (para la extracción de AHLs) (Amaro y col., 1991; Ramirez y col., 2002).

Las cepas de *E. coli* BL21(DE3) y TOP10F' fueron crecidas en medio LB (Sambrook y Russell, 2001) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina ya sea en caldo o placas LB-agar (1,5%). Cuando fue necesario también se suplementó con IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM.

Las cepa de *E. coli* BL21(DE3)-AfeI expresa de manera recombinante la proteína AfeI con su secuencia aminoacídica intacta. La cepa *E. coli* BL21(DE3)-AfeIc la expresa con una "cola" de 35 aminoácidos adicionales en el extremo amino-terminal. Las cepas están transformadas con los plasmidios pCRT7/NT-TOPO-*afeI* y pCRT7/NT-TOPO-*afeIc*, respectivamente.

La cepa de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) fue crecida en medio LB o medio AB mínimo (ABm) [en g/L, K₂HPO₄, 3; NaH₂PO₄, 1; NH₄Cl, 1; MgSO₄•7H₂O, 0,3; KCl, 0,15; CaCl₂, 0,01; FeSO₄•7H₂O, 0,0025] (Chilton y col., 1974) suplementado con 0,5% de glucosa y 25 µg/ml de gentamicina según correspondiese.

4.2. Técnicas de Biología Molecular.

4.2.1. Extracción del ADN cromosómico.

Para la extracción del ADN cromosómico de *A. ferrooxidans* se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del kit Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). Este mismo se basa en un paso de lisis celular seguido de una digestión enzimática del ARN, con posterior precipitación del ADN genómico con isopropanol y solubilización en agua. Para la extracción, las células provenientes de 100 mL de un cultivo crecido en ión ferroso hasta fase estacionaria, se colectaron por centrifugación (7500 x g durante 10 min). El precipitado se lavó una vez con 1 mL de solución de agua ácida (pH 1,6 ajustado con H₂SO₄) y dos veces con 1 mL de una solución 10 mM citrato de sodio. Este paso tiene por objetivo limpiar las células y eliminar el exceso de Fe³⁺ que presenta el cultivo. Posteriormente, el protocolo se utilizó sin modificaciones, el volumen final de resuspensión fue de 100 µl de H₂O libre de nucleasas (Winkler Ltda.).

4.2.2. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa.

Para la extracción de las bandas de ADN desde los geles de agarosa se utilizó el Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega). El método se basa en la escisión con bisturí de la banda desde el gel de agarosa y la fundición de la agarosa a 65°C, en presencia de una resina que une el ADN. La resina se empaca en una mini columna y luego de dos lavados con isopropanol, el ADN se eluye con agua mediante centrifugación.

4.2.3. Cuantificación del ADN genómico y plasmidial.

La cuantificación del ADN doble hebra (genómico o plasmidial) se efectuó espectrofotométricamente, mediante la lectura de la absorbancia a $\lambda=260$ nm (A_{260}) de una dilución 1:50 de la muestra de ADN. Una unidad de A_{260} corresponde a 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN. La pureza se comprobó mediante la relación A_{260}/A_{280} (Sambrook y Russell, 2001).

4.2.4. Electroforesis del ADN en geles de agarosa.

Para visualizar la calidad y el tamaño del ADN cromosómico o de los fragmentos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 0.5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Cuando se usó una concentración de agarosa distinta, se indica en la figura correspondiente. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25% p/v azul de bromofenol, 40% p/v sacarosa). La tinción se realizó durante 10 min. con una solución de bromuro de etidio de concentración 0,2 $\mu\text{g/mL}$ en amortiguador TAE 0,5X. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta de 320 nm en un transiluminador. En todos los geles mostrados se usó el estándar de peso molecular 250 bp DNA ladder (Invitrogen).

4.2.5. Diseño de oligonucleótidos y amplificación del *gen afel* mediante PCR con “partida en caliente”.

Los partidores se diseñaron manualmente a partir de la secuencia del gen *afel* disponible en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y fueron sintetizados a SIGMA-PROLIGO (www.proligo.com).

Para la amplificación por PCR de *afel* se diseñó el par de partidores AfelAFNdeINH2 (5'-CATATGCAGGTTATAACCGGGCCA-3'; $T_m= 62^\circ\text{C}$) y

AfeIAFCOOH (5'-TTAGTCAGATCTATCCAGC -3'; Tm= 54°C). La secuencia **CATATG** es un sitio de restricción para la enzima *NdeI* que se agregó al extremo 5' del partidor para introducir este sitio en el fragmento amplificado. Se determinaron las condiciones óptimas de amplificación para el PCR con "partida en caliente" (Tabla 1). Las concentraciones y volúmenes de los reactivos de PCR usados se muestran en la tabla 2. La "mezcla 2" se agregó sólo hacia el término de la denaturación inicial.

Tabla1. Condiciones óptimas para la amplificación del gen *afel*.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	95°C	3 min
Denaturación	95°C	30 s
Hibridización	65°C	30 s
Síntesis	72°C	40 s
Síntesis final	72°C	3 min
Ciclos de amplificación	20	
ADN polimerasa	<i>Pwo</i> [§]	
concentración final de Mg ²⁺	2,5 Mm	

[§]Polimerasa aislada de *Pyrococcus wosei*. Se encuentra descontinuada; su secuencia es idéntica a la polimerasa *Pfu*, aislada desde *Pyrococcus furiosus* y disponible en el mercado.

Tabla 2. Composición óptima para la reacción de PCR con "partida en caliente" para la amplificación de *afel*.

Reactivo (concentración)	mezcla 1	mezcla 2
dNTPs (1mM)	4 µl	-
ADN genómico (40 ng/µl)	1 µl	-
Partidor AfeIAFNdeINH2 (100 ng/µl)	1 µl	-
Partidor AfeIAFCOOH (100 ng/µl)	1 µl	-
DMSO (100%)	2,5 µl	-
Amortiguador <i>Pwo</i> (5x)	-	10 µl
<i>Pwo</i> (5U/µl)	-	0,2 µl
H ₂ O bidestilada estéril	15,5 µl	15 µl
Volumen Total	25 µl	25 µl

El tamaño de *afel* es 549 pb, mientras que aquel del producto de la amplificación es de 552 pb, pues se han agregado 3 nucleótidos en el extremo amino-terminal que permiten conformar el sitio de restricción *NdeI*.

4.2.6. Adenilación de extremos romos generados durante la amplificación por PCR.

El uso del vector de expresión pCRT7/NT-TOPO, necesita la presencia de adenilaciones en los extremos 3' del producto de PCR. Puesto que la enzima *Pwo* genera extremos romos, el fragmento de PCR purificado fue sometido a una incubación con *Taq* polimerasa y dATP a 72°C por 20 minutos usando 0,2 µl de *Taq* polimerasa (Promega) (Tabla 3).

Tabla 3. Reacción de adenilación molde-independiente en los extremos 3' del fragmento purificado.

ADN purificado	12 µl
dATP (2mM)	5 µl
Buffer <i>Taq</i> (5x)	8 µl
Agua libre de nucleasas	15 µl
<i>Taq</i> (5U/µl)	0,2 µl
Volumen final	40,2 µl

4.2.7. Clonamiento de *afel* en *E. coli* TOP10F'.

La reacción de ligación no necesita ser catalizada por una ADN ligasa, pues el vector linearizado tiene unida de forma covalente la enzima topoisomerasa I del virus *vaccinia* en los extremos 3'-fosfato. Ésta permite la ligación del producto de PCR (con sus extremos 3' adenilados), solo incubando el vector junto al fragmento de ADN, usando la actividad ligasa de la topoisomerasa I. La reacción de ligación se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente (Tabla 4). 4 µl de la reacción anterior fueron

agregados a 50 μ l de células TOP10F' químicamente competentes. La mezcla se homogenizó suavemente y se incubó en hielo por cinco minutos. Se agregaron 50 μ l de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ 20 mM glucosa, pH 7) y se plaqueó todo el volumen en placas LB ampicilina (100 μ g/ml). Finalmente, incubó toda la noche a 37°C.

Tabla 4. Reacción de ligación del fragmento *afeI* adenilado, con el vector pCRT7/NT-TOPO.

Reacción de adenilación	4 μ l
Solución salina (1,2 M NaCl + 0,06M MgCl ₂)	1 μ l
pCRT7/NT-TOPO (10 ng/ μ l)	1 μ l
Volumen total	6 μ l

4.2.8. PCR en colonias.

La orientación de los fragmentos ligados se determinó mediante PCR en colonias. Cada colonia a analizar se resuspendió en 50 μ l de agua bidestilada estéril (ABE). Desde cada una de las suspensiones celulares se extrajo 1 μ l para sembrar en placas cuadrículadas y enumeradas (para la posterior replicación de las colonias positivas) y 1 μ l para usar como ADN molde en la reacción de PCR. Se usó un partidor reverso interno del gen *afeI* y el partidor "T7 forward sequencing primer", que hibridiza río arriba del sitio de clonamiento en el vector. De esta manera sólo se obtiene un amplificado desde aquellos clones que poseen el inserto en la orientación correcta; es decir, con el codón de inicio (ATG) directamente río abajo del sitio de unión a ribosoma del vector. El protocolo experimental se muestra en la tabla 5. La temperatura de hibridización fue de 56°C y se efectuaron 30 ciclos. Luego de finalizado el PCR se

agregó 1 μ l de amortiguador de carga 6x a cada tubo y los fragmentos se resolvieron en geles de agarosa.

Tabla 5. Reacción de PCR de colonias.

Reactivo	Mix
Suspensión celular (1 colonia en 50 μ l de H ₂ O)	1 μ l
dNTPs (1mM)	0,8 μ l
Partidor "T7 forward sequencing" (100 ng/ μ l)	0,1 μ l
Partidor <i>afel</i> COOH (100 ng/ μ l)	0,1 μ l
DMSO (100%)	0,5 μ l
Amortiguador <i>Taq</i> (5x)	2 μ l
<i>Taq</i> polimerasa (5U/ μ l)	0,08 μ l
Agua libre de nucleasas	5,5 μ l
Volumen Total	10 μ l

4.2.9. Purificación de ADN plasmidial.

Las purificaciones se efectuaron a partir de cultivos de 5 ml de los clones recombinantes positivos seleccionados. Se efectuó la purificación de ADN plasmidial usando el kit *Wizard Plus Minipreps* (Promega). Cada cultivo fue crecido toda la noche y se centrifugó un total de 4,5 ml para efectuar la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.10. Clonamiento de *afel* en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3).

Con las soluciones seleccionadas de ADN plasmidial obtenidas en la extracción se prepararon diluciones 1:20 para efectuar cada transformación. 4 μ l de estas diluciones fueron agregados a un tubo con 100 μ l de células de *E. coli* BL21(DE3) químicamente competentes (Promega). La mezcla se incubó en hielo por 30 minutos. Se agregó 250 μ l de medio LB y se incubó a 30°C por 1 h. En seguida se plaqueó el

total de cada reacción en placas LB-ampicilina. Éstas se incubaron toda la noche a 37°C.

4.2.11. Digestión con endonucleasas de restricción.

4.2.11.1. Análisis de restricción del ADN plasmidial.

Se utilizaron las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI para digerir alícuotas de las 10 soluciones de ADN plasmidial purificados desde *E. coli* TOP10F' según instrucciones del fabricante. Todas las reacciones se incubaron 2 horas a 37°C, luego se agregó 1µl de amortiguador de carga a cada una y se resolvieron en un gel de agarosa.

4.2.11.2. Digestión y religación de pCRT7/NT-TOPO-*afelc*.

Se digirió 1 µg de pCRT7/NT-TOPO-*afelc* con 70 U de *Nde*I. La digestión se llevó a cabo por 2 h a 37°C. La enzima se inactivó mediante calor incubando 20 min a 65°C. Se resolvió la totalidad de la reacción de digestión en un gel de agarosa y se purificó la banda correspondiente al vector tal como en la sección 4.2.2. La totalidad de la purificación fue sometida a una religación. La reacción se realizó toda la noche a 4°C con 4,5 U de T4 DNA ligasa (Promega).

4.2.12. Secuenciación del fragmento *afel*.

Las reacciones de secuenciación fueron hechas a partir de soluciones de plasmidios a 50 ng/µl (el ADN plasmidial se cuantificó espectrofotométricamente). Se utilizaron los partidores T7 directo y SP6 reverso del vector pCRT7/NT-TOPO. Los cromatogramas fueron revisados de manera manual. Las secuenciaciones fueron realizadas en el centro de Biotecnología de la Facultad de Ciencias en la Universidad de Chile.

4.3. Purificación de la proteína recombinante Afelr en condiciones desnaturalantes.

4.3.1. Inducción de la expresión de la proteína Afelr recombinante.

Las inducciones se efectuaron en cultivos de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/ml). Los cultivos fueron inoculados al 1% v/v y crecidos por 17 h. Se crecieron con agitación a 37°C (150 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica (A_{600}) de 0,5. Para inducir la sobreexpresión de Afelr, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM. En el caso de los cultivos de 5 ml

4.3.2. Purificación y solubilización de cuerpos de inclusión.

El precipitado celular proveniente de un cultivo de dos litros fue resuspendido en 35 ml de amortiguador de sonicación ("amortiguador S" (50 mM tris, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH=7). La resuspensión fue sometida al protocolo de extracción de cuerpos de inclusión (pET system manual, séptima edición, Novagen). Se sonicó con máxima potencia la muestra hasta que ésta clarificó (sonicador Misonix XL 2020, potencia 6). Se centrifugó a 6000 g por 25 min. El precipitado se volvió a resuspender en amortiguador de y se sonicó 9 veces con pulsos de 30 s con máxima potencia. La suspensión se volvió a centrifugar a 6000 g por 25 minutos. Con el fin de desnaturar la proteína contenida en los cuerpos de inclusión y poder así solubilizarla, el precipitado, que contiene los cuerpos de inclusión, se resuspendió en amortiguador S suplementado con 6 M urea (pH 7,9) y se incubó en hielo por 1 h. Luego, la muestra se ultracentrifugó 24 minutos a 39000 g y el sobrenadante, que contiene la proteína solubilizada, se filtró (filtro Millipore 0,45 µm).

4.3.3. Electroelución desde geles de poliacrilamida.

4.3.3.1. Electroelución.

Las electroeluciones se efectuaron desde geles SDS-PAGE y SDS-PAGE en gradiente de poliacrilamida (10-20%) de 18 x 22 cm². Las bandas de interés fueron extraídas desde los geles cortándolas con bisturí. La proteína fue electroeluida desde los fragmentos de gel siguiendo las instrucciones del fabricante (electro-eluter model 442, Bio-Rad). Para poder cortar las bandas con precisión, se cortaron dos carriles completos del gel y se tiñeron con azul de coomasie. Una vez destefidos, los carriles se alinearon con el resto del gel y se usaron como guía para cortar a la altura adecuada. El volumen de la elución fue de 400 µl. El contenedor se lavó con 100 µl adicionales de amortiguador de carga. Después de cada electroelución, los fragmentos de gel se tiñeron con azul de coomasie para evaluar la eficiencia de la transferencia.

4.3.4. Cuantificación de proteínas.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford, utilizando el kit "coomassie plus protein assay reagent" (Pierce). Se construyó una curva estándar con seroalbúmina de bovino.

4.3.5. Obtención de suero policlonal α -AfeI.

Para aumentar la probabilidad de obtener suero policlonal con actividad α -AfeI, se decidió efectuar inmunizaciones tanto a conejos como a ratones. La mayor parte de la proteína purificada (7,7 mg) fue usada para producir suero policlonal de conejo (BiosChile). Mientras que 1 mg de la proteína fue usado para inmunizar ratones Balb/c. Luego de la obtención del suero preinmune (ver más adelante en esta misma sección), los ratones fueron sometidos a un régimen de 1 inyección semanal de 50 µg de

proteína Afel durante 1 mes. Las inyecciones para los ratones (1 dosis de 300 μ l) se prepararon de la siguiente manera: 20 μ l de Afel purificada (50 μ g) + 130 μ l de H₂O bidestilada estéril + 150 μ l de coadyuvante completo de Freund (Gibco). La mezcla se agitó vigorosamente en un vortex por 30 min ó hasta obtener una emulsión. Se cargó en una jeringa de 1 ml y se inyectó el contenido intraperitonealmente.

Muestras de aproximadamente 500 μ l de suero preinmune e inmune se obtuvieron por sangramiento efectuando un pequeño corte transversal en el lado proximal de la cola. La muestra de sangre fue incubada 30 min a 37°C para inducir la coagulación y luego centrifugada a 13000 g por 5 minutos. El suero se recuperó, se alicuotó, y se guardó a -20°C.

4.4. Inmunodetección de la proteína Afel mediante western blots

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de PVDF. Se aplicó una corriente constante de 100 mA durante 60 min. La eficiencia de la electrotransferencia se confirmó tiñendo el gel luego de la ésta. La membrana conteniendo las proteínas transferidas, se incubó 2 h con Buffer BSA-TBST [20 mM Tris-HCl (pH=7,6), 137 mM NaCl, 0,05% tween 20 y 1% seroalbúmina bovina (BSA)]. Luego, se lavó 3 veces por 15 min cada vez con TBS-T y se incubó por 17 h con el antisuero policlonal α -Afel diluido 1/500. Seguidamente la membrana se lavó 2 veces por 20 min cada vez con TBS-T. Luego, se incubó por 2 h con anticuerpos policlonales anti-ratón conjugado con peroxidasa diluida 1/5000 (Se repitieron los 3 lavados de la membrana) y se procedió a la detección de la reacción antígeno-anticuerpo sobre la membrana. Se aplicó el método colorimétrico consistió en incubar la membrana con buffer TBS que además contiene 20% metanol, 0,5 mg/ml 4-cloro-1-

naftol y 0,15% H₂O₂. La reacción se realizó en la oscuridad y luego de la cual se visualizaron las bandas

4.5. Extracciones orgánicas desde cultivos bacterianos y detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina y biosensor bacteriano.

4.5.1. Extracción orgánica desde cultivos de *A. ferrooxidans*.

Se efectuaron extracciones con diclorometano (DCM) a cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental, de la siguiente manera. 200 o 400 ml de cultivo en fase estacionaria temprana o tardía se centrifugaron a 3500 g por 25 minutos. El sobrenadante y el precipitado celular se separaron para hacer extracciones independientes. Tanto el sobrenadante como el precipitado resuspendido se extrajeron con diclorometano (DCM).

4.5.1.1. Extracción del sobrenadante.

El sobrenadante de cultivo fue trasladado a un vaso de precipitado de 2 L. Se agregó 1 volumen de DCM y la mezcla se extrajo con agitación constante por 30 min. La fase orgánica (fase inferior) se recuperó con pipeta de vidrio y "pera" de succión, y se trasladó a una botella de vidrio. La fase recuperada se secó con MgSO₄ anhidro, agregándole un par de "puntas de espátula", y luego se filtró con algodón hidrofílico. El filtrado se evaporó a 50°C en un evaporador rotacional (Büchi RE-111). El concentrado, se trasladó a un tubo de vidrio ambar y se terminó de secar con N₂. Los extractos secos se disolvieron en un volumen de acetato de etilo tal que la concentración de las moléculas extraíbles por DCM presentes en el sobrenadante fuera 4000 veces mayor. 50 µl de acetato de etilo para 200 ml de cultivo, y 100 µl para

400 ml. La disolución se efectuó dejando los tubos en hielo y sellados, para evitar la evaporación del solvente, y con agitación lateral por 30 min.

4.5.1.2. Extracción del precipitado celular.

El precipitado se resuspendió en un volumen final de 12 ml de medio basal 9K. La resuspensión se trasladó a un vaso de precipitado de 50 ml y extrajo con 2 volúmenes de DCM. El resto del procedimiento es igual a la extracción del sobrenadante. El extracto seco se disolvió en 100 μ l de acetato de etilo.

4.5.1.3. Extracción de las perlas de azufre.

Las perlas de azufre del cultivo de 200 ml (10 g), fueron agregadas a 118 ml de DCM y se agitó intensamente por 2 horas. Luego el solvente se secó, filtró y concentró al igual que las muestras de sobrenadante y precipitado recién descritas. El extracto seco se disolvió en 100 μ l de acetato de etilo.

4.5.2. Extracción orgánica desde sobrenadantes de *E. coli* BL21(DE3).

200 ml de medio LB-amp (100 μ g/ μ l) fueron inoculados al 1% con un cultivo de 16 h de *E. coli* BL21(DE3)-Afe1 ó *E. coli* BL21(DE3)-(C-) (control negativo que posee el plasmidio pCRT7/NT-TOPO sin inserto). Los cultivos se crecieron hasta D.O = 0,4. Se les agregó IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y se incubaron por 2 horas. Los cultivos se centrifugaron a 10000 g por 30 min. Los sobrenadantes se recuperaron y se extrajeron con DCM de la misma manera que los sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans*. El extracto final se resuspendió en 1 ml de acetato de etilo. De este extracto se cargó 30 μ l en una placa cromatográfica (Fig. 9)

4.6. Detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina.

4.6.1. Cromatografía en capa fina de fase reversa.

La técnica de cromatografía en capa fina permite separar moléculas orgánicas de acuerdo a su coeficiente de partición. En el caso de las AHLs se usa una matriz hidrofóbica y una fase móvil polar, por lo que la migración de las moléculas polares será mayor que la de las apolares (Shaw y col., 1997). La hidrofobicidad de las AHLs depende principalmente del largo de la cadena acilo. Los extractos se cargaron en placas cromatográficas de fase reversa C18 (Merck). Se utilizó metanol:agua (60:40) como fase móvil. Al término de la corrida, las placas se secaron al aire y se volvieron a correr una o dos veces más, dependiendo del experimento.

4.6.2. Revelado con biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4)

El biosensor bacteriano *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) (Piper y col., 1993), gentilmente donado por el Dr. Juan Gonzalez (Universidad de Texas en Dallas) es incapaz de producir AHL y, por ende, expresa la β -galactosidasa sólo en presencia de AHLs exógenas. Posee una fusión *traG::lacZ* (*traG* es activado directamente por el complejo TraR/AHL en la cepa silvestre) y el regulador transcripcional TraR, que se produce constitutivamente.

Un cultivo crecido por 16 h a partir de una colonia aislada (LB-gentamicina 50 $\mu\text{g/ml}$) del biosensor, fue inoculado al 1% en 50 ml de medio AB mínimo (ABm) (ver sección 4.1) y suplementado con 0,5% glucosa. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,7 fue mezclado vigorosamente con 50 ml de medio ABm-agar 1% fundido y mantenido a 45°C. Se agregó X-gal hasta una concentración final de 60 $\mu\text{g/ml}$. La mezcla se esparció uniformemente sobre la placa cromatográfica y se incubó

toda la noche a 30°C. Cuando el biosensor se expone a moléculas capaces de traspasar la membrana, unirse a TraR e inducir la transcripción de *lacZ*, éstas se visualizan como "manchas" azules en la matriz cromatográfica (Shaw y col., 1997). La forma de la "mancha" no necesariamente es circular, pues depende de las propiedades de migración cromatográfica de las moléculas (Shaw y col., 1997). El biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) detecta con mayor sensibilidad AHLs con cadenas acilo de mediana longitud (C8 a C12).

5. RESULTADOS

5.1. Expresión heteróloga de la proteína Afel en *E. coli* BL21(DE3).

5.1.1. Clonamiento del gen *afel* en *E. coli*.

5.1.1.1. Purificación ADN genómico de la cepa ATCC23270 de *A. ferrooxidans*.

Se purificó el ADN cromosómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Su integridad física reveló ser buena en un gel de agarosa (Fig. 3A). La concentración del ADN genómico purificado fue de 77,5 ng/μl. Se preparó una dilución de trabajo de 40 ng/μL para las posteriores reacciones de PCR.

5.1.1.2. Amplificación del gen *afel* mediante PCR con “partida en caliente”.

La temperatura óptima de hibridización de los partidores fue determinada efectuando reacciones de PCR en gradiente de temperatura de hibridización (no mostrado). Se utilizó una ADN polimerasa con actividad 3'-5' exonucleasa (*Pwo*) y un bajo número de ciclos de amplificación, para disminuir la probabilidad de obtener amplificadas con sustituciones nucleotídicas. Se obtuvo un fragmento con un tamaño de 552 bp, de acuerdo a lo esperado por la presencia del sitio *NdeI*.

5.1.1.3. Purificación *afel* desde geles de agarosa.

Se efectuaron dos reacciones de PCR en 50 μl bajo las condiciones óptimas de amplificación. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa y las bandas de ADN fueron purificadas como se indica en materiales y métodos. El resultado de la purificación se analizó mediante electroforesis en agarosa (Fig. 3B).

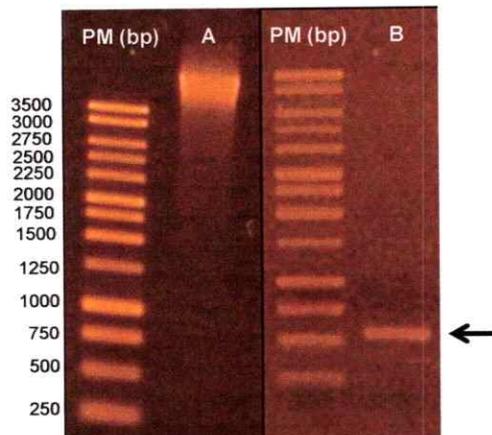


Figura 3. Amplificación por PCR de *afel* a partir de ADN genómico. **A.** Purificación de ADN genómico de *A. ferrooxidans* ATCC23270 (1). **B.** Resultado de la purificación del fragmento *afel* (2). El producto de la purificación migra en el tamaño esperado (552 pb). La banda esperada se indica con una flecha. PM, marcador de peso molecular.

5.1.1.4. Clonamiento de *afel* en *E. coli* TOP10F'.

Se procedió a efectuar la ligación del fragmento *afel* purificado y adenilado en el vector pCRT7/NT-TOPO. El vector agrega una “cola” de 35 aminoácidos en el extremo amino terminal que contiene una secuencia de polihistidina. El nuevo vector se denominó pCRT7/NT-TOPO-*afelc* (la letra “c” se refiere a la presencia de la “cola” antes mencionada en la proteína codificada) ó simplemente pAfelc. Con la reacción de ligación se transformó la cepa de *E. coli* TOP10F'. Se obtuvieron 79 colonias resistentes a ampicilina, de las cuales, 48 fueron analizadas mediante PCR en relación a la orientación del inserto.

5.1.1.5. Selección de clones con plasmidios ligados en la orientación correcta.

La selección de clones que contienen plasmidios con el inserto en la orientación correcta se efectuó mediante PCR en colonias. Se sometieron a la prueba un total de

48 colonias seleccionadas al azar. 23 de las 48 colonias (48%) resultaron positivas (Fig. 4).

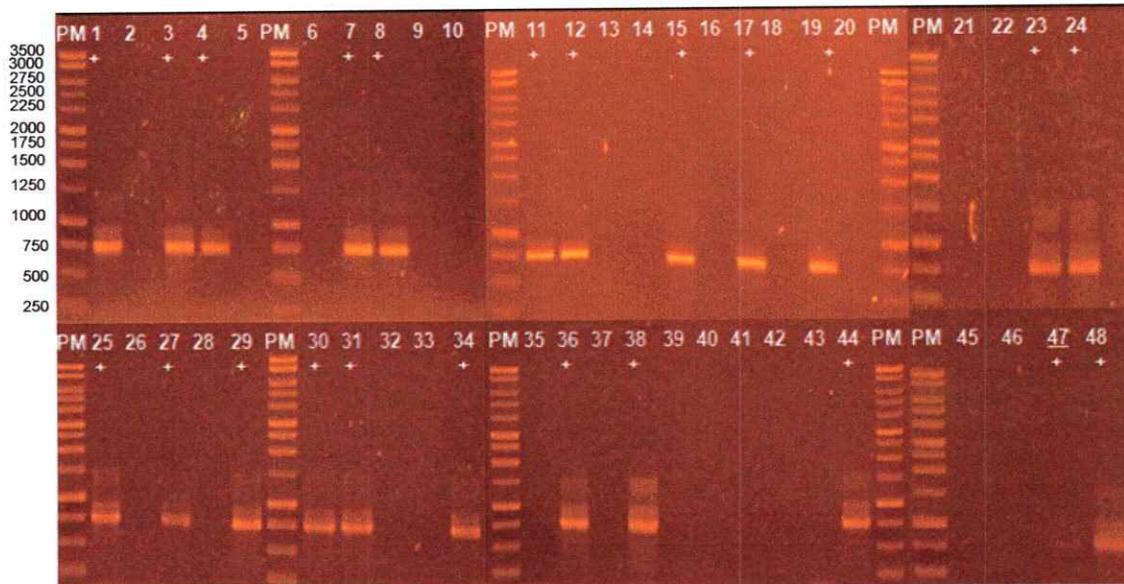


Figura 4. PCR en colonia de 48 clones transformados con pCRT7/NT-TOPO-*afeI*c. Los clones que tienen el inserto *afeI* en la orientación correcta muestran un amplificado de 552 pb (+). Notar que el clon 47 es positivo, aunque la banda no se vé bien en la fotografía. PM, peso molecular

Los clones positivos fueron replicados para obtener colonias aisladas. Se eligieron al azar 10 clones (1, 4, 7, 12, 15, 25, 27, 31, 44 y 47). Las colonias elegidas fueron inoculados en 5 ml de medio LB-ampicilina (100 μ g/ml) y crecidas por 17 h a 37°C con agitación (150 rpm).

5.1.1.6. Purificación ADN plasmidial

Se efectuó una extracción de ADN plasmidial a los 10 clones seleccionados mediante PCR en colonias (Fig. 5). Para cada uno de los clones se apreció una banda más intensa correspondiente al ADN plasmidial sobreenrollado. La banda superior, que migró por sobre la banda de mayor tamaño del estándar, corresponde a ADN genómico. El resto de las bandas corresponden a otros estados del mismo ADN

plasmidial. En el clon 44 la banda correspondiente al ADN plasmidial sobre enrollado migró 500 pb más, sugiriendo que éste perdió el inserto.

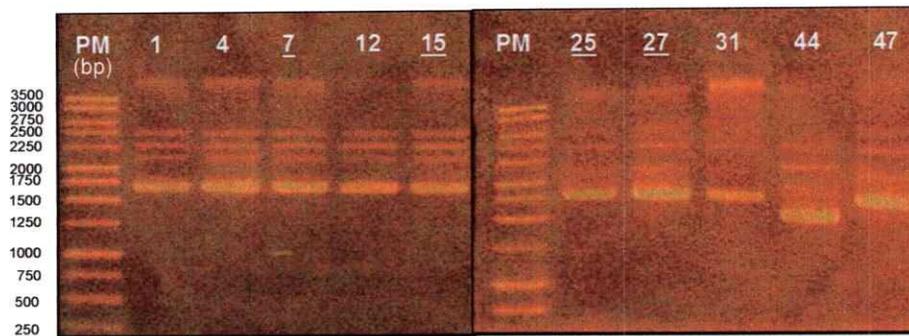


Figura 5. Purificaciones de plasmidios hechas a 10 clones TOP10F' (pCRT7/NT-TOPO-*afe/c*) que tienen el inserto *afeI* en la orientación correcta. Las preparaciones plasmidiales elegidas para transformar la cepa de expresión BL21(DE3) tienen sus números subrayados. PM, peso molecular.

5.1.1.7. Análisis de Restricción del ADN plasmidial

Se efectuó un análisis de restricción a todos los plasmidios purificados (Fig. 6). *Bam*HI posee un sitio único 12 bases río arriba del inicio del inserto y *Eco*RI posee un sitio único 9 bases río abajo del término del inserto. De esta forma una digestión simple produce una sola banda correspondiente al plasmidio linearizado y una digestión doble produce dos bandas: una de aproximadamente 500 pb correspondiente al fragmento *Bam*HI/*Eco*RI y otra correspondiente al plasmidio sin dicho fragmento. Los resultados son positivos para todos los clones exceptuando los clones 1, 31 y 44, que fueron descartados.

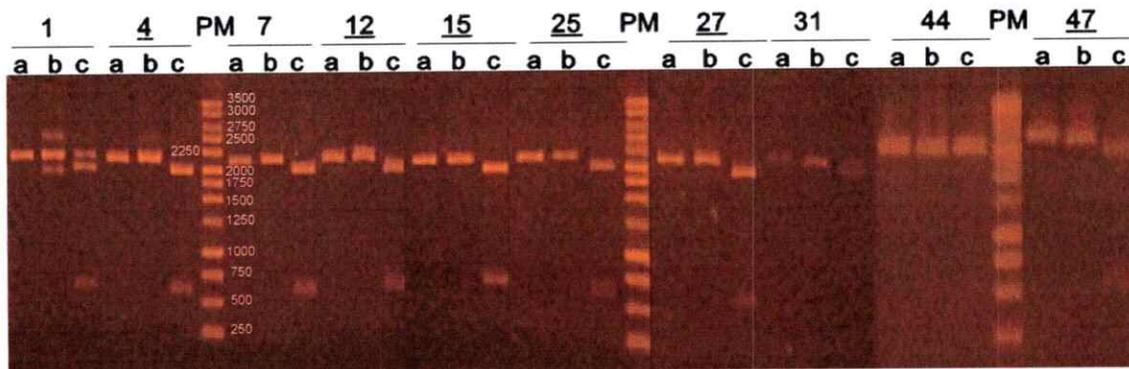


Figura 6. Análisis de restricción realizado a 10 purificaciones plasmidiales hechas desde clones transformantes positivos de TOP10F'. a, digestión *Bam*HI. b, Digestión *Eco*RI. c, doble digestión *Bam*HI/*Eco*RI. Los clones que muestran resultados positivos tienen sus números subrayados. PM, peso molecular

Los clones 4, 7, 12, 15, 25, 27 y 47 presentan los patrones de digestión esperados. Se secuenciaron los clones 7, 15, 25 y 27, confirmándose la correcta inserción y secuencia de *afel*.

5.1.1.8. Clonamiento de *afel* en la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3).

Se seleccionaron las preparaciones plasmidiales 7, 15, 25 y 27 para transformar la cepa de sobreexpresión *E. coli* BL21(DE3). Se obtuvieron 12, 7, 4 y 5 colonias resistentes a ampicilina en cada placa, respectivamente.

5.1.2. Inducción de la expresión de la proteína Afel recombinante.

Se seleccionaron los clones 7, 15, 25 y 27 para inducir la expresión de la proteína recombinante con 0,5 mM IPTG. Luego de 1 y 2 horas de inducción no se observaron evidencias de sobreexpresión (no mostrado). Se decidió inducir la expresión del clon 7 en las mismas condiciones que la inducción anterior, pero esta vez se indujo 17 horas. Se observó la banda característica de sobreexpresión en el tamaño esperado (25 kDa). La gran mayoría de la proteína se encuentra en la fase insoluble (Fig. 7).

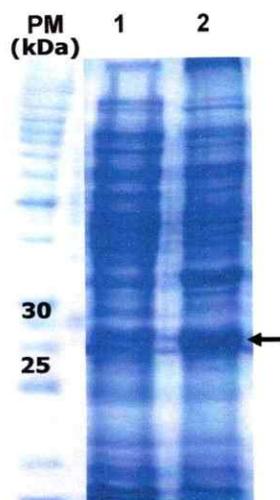


Figura 7. Análisis de la sobreexpresión de la proteína Afelc mediante SDS-PAGE (12,5%). El clon 7 se indujo por 17 h. Se cargaron alícuotas de la fase soluble (1) y de la fase insoluble (2). Las muestras fueron obtenidas tras sonificar la muestra y centrifugar. La banda de sobreexpresión es de aproximadamente 25 kDa (flecha). PM, marcador de peso molecular.

Con el fin de detectar la posible presencia del péptido recombinante en la fracción soluble, se realizó una cromatografía de afinidad (níquel) en condiciones no desnaturalantes (pET expression system – Novagen). La purificación se efectuó según instrucciones del fabricante. La proteína no se encontró en ninguna de las fracciones muestreadas. Se observaron algunas proteínas con el tamaño esperado, pero estas eluyeron a bajas concentraciones de imidazol y con numerosas proteínas contaminantes. Para descartar totalmente la presencia de Afelc en la fase soluble, se efectuó un western blot a fracciones representativas de las diferentes fracciones colectadas durante la purificación, usando un anticuerpo anti His-tag y como control positivo se usó la fracción insoluble. El western blot fue positivo solo para el control positivo (resultado no mostrado), confirmando que Afel se encuentra solamente en la fracción insoluble.

5.2. Detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Con el fin de detectar las AHLs que produce *A. ferrooxidans* –y en el mediano plazo las AHLs producidas por otros microorganismos biolixiviantes- de manera rutinaria, decidimos implementar una técnica, previamente descrita, consistente en la separación de AHLs mediante cromatografía en capa fina y una posterior detección con el uso de un biosensor bacteriano específico (Shaw y col., 1997). El biosensor induce la expresión de la enzima β -galactosidasa en presencia de AHLs exógenas, con distinta sensibilidad (sección 4.5.2). En primer lugar, se estimó la sensibilidad del biosensor por una serie de estándares sintéticos de AHL. En segundo lugar, se detectaron las AHLs presentes en el sobrenadante de *E. coli* que sobreexpresa la enzima Afel. Finalmente, se detectaron las AHLs producidas por *A. ferrooxidans*.

5.2.1. Estándares de AHL sintéticos.

Se utilizó una serie de estándares sintéticos. Los estándares disponibles fueron 3-oxo-C6-HSL (Sigma); C12-HSL, C10-HSL, C8-HSL, C6-HSL y C4-HSL (Fluka). Se determinó que 5 de los 6 estándares de los que se disponía, pueden ser detectados por el método con distinta sensibilidad (Fig. 8). Haciendo diluciones seriadas de las AHLs sintéticas, se determinó la masa necesaria de distintas AHLs sintéticas para inducir una respuesta significativa. Tal como se esperaba, el biosensor reveló ser más sensible a AHLs de cadenas acilo de mediana longitud. Es así como 12,5 pmoles de C8-HSL fueron suficientes para activar el biosensor, mientras que 10 nmoles de C12-HSL generan una intensidad bastante menor. De esta manera se generó un patrón de migración para compararlo con muestras problema (Fig. 8).

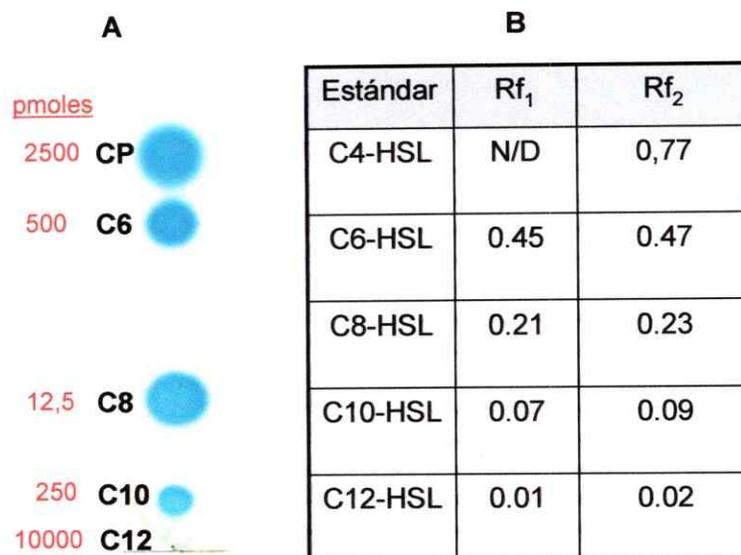


Figura 8. Estimación de la sensibilidad del biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). **A.** Cromatografía en capa fina de fase reversa (C18-TLC) revelada con *overlay* del biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) mostrando la masa necesaria de cada AHL para inducir una respuesta clara. Se muestra el nombre de cada estándar sintético. CP, compuesto polar derivado de la síntesis de C4-HSL (ver texto). **B.** Comparación de los coeficientes de migración obtenidos en este estudio (Rf₁) y los obtenidos por Shaw y col. (1997) (Rf₂).

El coeficiente de migración de las distintas AHLs sintéticas coincide con la reportada previamente (Shaw y col., 1997). La sensibilidad es mayor para AHLs con cadenas de largo intermedio. La molécula más polar detectada no corresponde a C4-HSL, pues el coeficiente de migración real de esta AHL, ha sido antes determinado utilizando el biosensor específico *Chromobacterium violaceum* CV026, resultando ser mayor al observado acá (Shaw y col., 1997). Lo que se detecta es un compuesto menos polar de estructura indeterminada derivado de la síntesis de C4-HSL, a este compuesto se le denominó "compuesto polar" (CP), este hecho fue reportado con anterioridad (Shaw y col., 1997) (Fig. 8A).

5.2.2. AHLs producidas por la enzima Afel expresada de forma heteróloga en *E. coli*.

La cepa de *E. coli* BL21(DE3)-Afel sobreexpresa la enzima Afel de *A. ferrooxidans*. Un extracto orgánico de sobrenadante de cultivo de esta cepa se sometió al ensayo del biosensor NTL4(pZLR4) (Fig. 9). Se detectó la presencia de 4 señales capaces de inducir la actividad β -galactosidasa. La ausencia de señales en el control [*E. coli* BL21(DE3) transformada con el plasmidio pCRT7/NT-TOPO sin el inserto *afel*] nos indica que Afel es responsable de la síntesis de AHLs en *A. ferrooxidans*. La identidad de las moléculas detectadas fue inferida a partir de los valores de migración relativa (Rf) de los estándares.

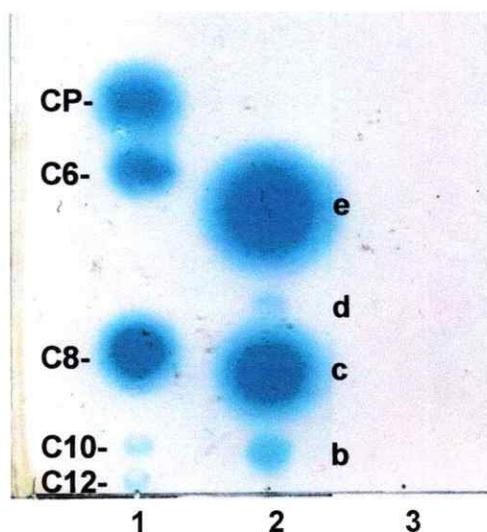


Figura 9. Detección de moléculas producidas por la enzima Afel en *E. coli*. El análisis se efectuó por medio de cromatografía en capa fina de fase reversa (C18-TLC) revelada con *overlay* del biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). 1, Estándar de AHLs sintéticas no substituidas. 2, Extracto orgánico del sobrenadante de cultivo de la cepa *E. coli* BL21(DE3)-Afel, que sobreexpresa la enzima Afel. Las diferentes manchas detectadas fueron nombradas b, c, d y e; la posible identidad de estas moléculas se discute en la sección siguiente (5.2.3). 3, Extracto orgánico del sobrenadante de cultivo de la cepa *E. coli* BL21(DE3), que no expresa la proteína.

La identificación tentativa de estas 4 moléculas se detalla en la siguiente sección (5.2.3), puesto que también fueron detectadas en extractos de *A. ferrooxidans*. Estas moléculas se denominaron “b”, “c”, “d” y “e”, para seguir la nomenclatura utilizada en las extracciones de *A. ferrooxidans* (Fig. 10).

5.2.3. AHLs producidas por *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Se efectuó una extracción orgánica desde el sobrenadante de un cultivo de 400 ml de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental hasta fase estacionaria temprana. Se cargo 1/5 del volumen extraído, es decir, 80 ml de sobrenadante de cultivo. Se logró identificar 6 señales distintas capaces de inducir la hidrólisis de X-gal por parte del biosensor (Fig. 10).

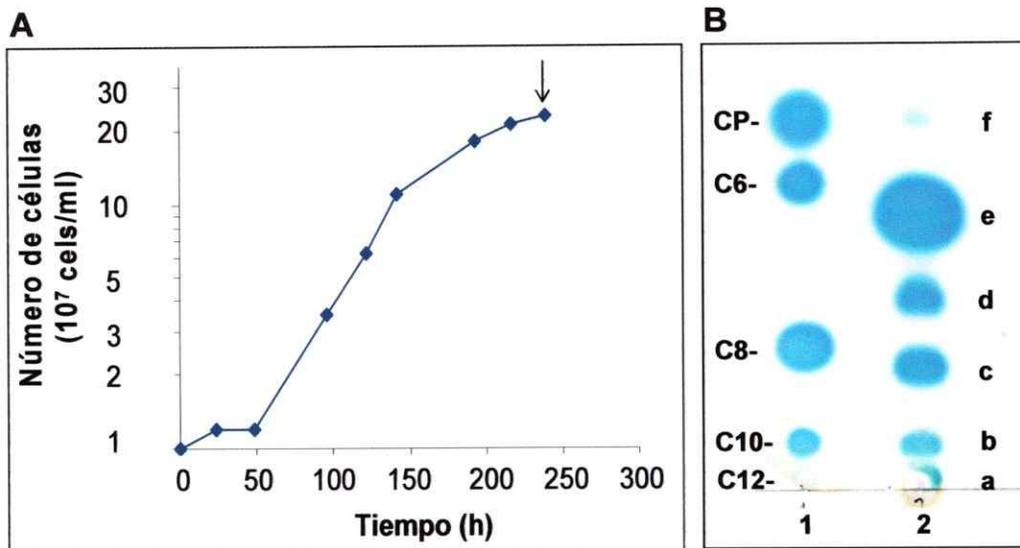


Figura 10. Detección de las AHLs producidas por *A. ferrooxidans* en fase estacionaria temprana. **A.** Gráfico semi-logarítmico de la curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental, la flecha indica el punto de la curva donde se efectuó una extracción orgánica del sobrenadante. **B.** Resultado de la TLC cubierta con el biosensor NTL4(pZLR4). 1, estándares de AHLs sintéticas no substituidas. 2, 20 μ l de extracto orgánico de sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans*. Se detectaron 6 moléculas capaces de activar al biosensor. En orden de polaridad creciente, éstas se denominaron a, b, c, d, e y f. CP, “compuesto polar” cuya identidad es desconocida (sección 5.2.1).

Se distinguen 6 señales capaces de activar al biosensor NTL4(pZLR4) (Fig. 10B). Estas se denominaron a, b, c, d, e y f. Las dos señales más hidrofóbicas (a y b) migran como los estándares correspondientes a AHLs no sustituidas C12-HSL y C10-HSL. La señal de más alta polaridad detectada (f) migra como CP, cuya estructura es desconocida. Las demás moléculas detectadas (c, d y e) migran como ninguno de los estándares sintéticos disponibles.

Como *A. ferrooxidans* produce AHLs con cadenas acilo de tamaño intermedio y largo, quisimos analizar si parte de éstas estaban retenidas en la fracción celular. Para esto se efectuaron extracciones orgánicas en forma separada desde el sobrenadante y desde el precipitado celular de un cultivo en fase estacionaria tardía en azufre elemental (Fig. 11). Suponiendo que la difusión de AHLs, a favor de gradiente hacia el medio externo, ocurriría más fácilmente al ser suspendidas en medio fresco, el precipitado obtenido no fue lavado, para evitar la pérdida de éstas. El volumen de sobrenadante remanente que quedó asociado al precipitado una vez que se drenó el tubo de centrifuga fue de 780 μ l. La cantidad de muestra de extracto de sobrenadante que se cargó en la TLC corresponde al 40% del total del volumen de cultivo (Fig. 11, carril 2). La muestra de precipitado corresponde a todas las células en el matraz (Fig. 11, carril 3).

El patrón de migración observado en el extracto proveniente del sobrenadante consiste en las 6 manchas presentadas en la figura 10B (a, b, c, d, e, f), más una séptima mancha (g) (Fig. 11), detectado en esta extracción. El compuesto g es el más polar detectado y migra como la molécula 3-oxo-C6-HSL. En la fracción "precipitado celular" (Fig. 11, carril 3) se observa que existe retención de una molécula hidrofóbica que migra como C12-HSL, que denominamos "H". Además, se observa una mancha

que corresponde a la AHL mejor detectada en el sobrenadante, lo que no significa que sea la más abundante.

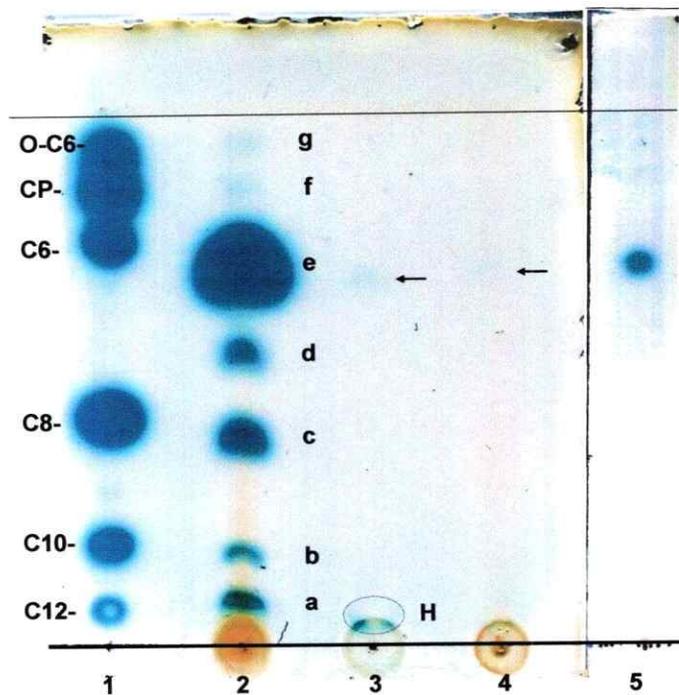


Figura 11. Detección de moléculas presentes en el sobrenadante de cultivo, precipitado celular y perlas de azufre de un cultivo de fase estacionaria tardía de *A. ferrooxidans*. Los extractos orgánicos del cultivo fueron analizados por medio de cromatografía en capa fina de fase reversa (C18-TLC) revelada con el biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). 1, Estándar de AHLs sintéticas consistente en 4 AHLs no substituidas (C12, C10, C8, C6), una substituida (3-oxo-C6), y una molécula de identidad desconocida (CP) (sección 5.2.1). 2, extracto orgánico de sobrenadante donde se observan las 6 señales a, b, c, d, e y f antes identificadas y una nueva señal, "g", no detectada previamente. 3, Extracto orgánico de precipitado celular; la detección de una(s) molécula(s) hidrofóbica(s) cerca del origen se indica con una letra "H" y su contorno se denota con una línea punteada. 4, extracto orgánico efectuado a 20 g de perlas de azufre contenidas en el medio de cultivo como sustrato energético. 5, Control negativo para descartar que la señal hidrofóbica detectada en el precipitado celular sea una contaminación proveniente del sobrenadante (ver texto). En el caso de las extracciones desde precipitado celular y perlas de azufre se observó algún grado de contaminación (flechas).

Con el objeto de descartar que la AHL hidrofóbica detectada en el precipitado sea producto de remanentes del sobrenadante que permaneció asociado a la fracción

“precipitado celular”, se cargó una alícuota de extracto de sobrenadante correspondiente a 3,1 ml de sobrenadante, es decir 4 veces el volumen antes determinado que permaneció con el precipitado celular. En el control (Fig. 11, carril 5) se observa solamente la señal más representada del sobrenadante; y en ningún caso la molécula hidrofóbica H, presente en el extracto de precipitado celular (Fig. 11, carril 3). Esto sugiere que *A. ferrooxidans* posiblemente retiene las señales más hidrofóbicas en la fracción tal como se ha descrito en otras bacterias (Pearson y col., 1999; Schaefer y col., 2002). Por otro lado, el análisis del extracto proveniente de los 10 g de perlas de azufre contenidos en el cultivo como sustrato energético (Fig. 11, carril 4) no arrojó ningún resultado positivo, excepto la aparición de una mancha tenue que corresponde probablemente a la AHL más representada en el extracto de sobrenadante.

5.3. Obtención de suero policlonal α -AfeI.

En un intento de inmunodetectar la proteína AfeI mediante western blot, se purificó la proteína AfeIc para producir suero policlonal α -AfeI. La proteína AfeI recombinante pudo ser detectada tanto purificada como en un extracto proteico de la cepa de *E. coli* que la sobreexpresa. Esto no ocurrió con la proteína nativa en un extracto proteico de *A. ferrooxidans*. La posibilidad de que la “cola” de 35 aminoácidos adicionada al extremo amino-terminal de la proteína recombinante fuera el verdadero antígeno de los anticuerpos α -AfeI fue considerada. Esto fue confirmado tras comprobar que el anticuerpo generado es capaz de detectar una proteína recombinante purificada distinta a AfeI (AfeRc, purificada en paralelo), que posee la “cola” en cuestión (no mostrado). Por esta razón, se hizo una nueva purificación, esta vez desde la cepa *E. coli* BL21(DE3)-AfeI cuya proteína no contiene la “cola” de 35

aminoácidos. Para obtener esta cepa, el plasmidio secuenciado pCRT7/NT-TOPO-*afelc* fue digerido con la enzima de restricción *NdeI* (que libera la secuencia nucleotídica correspondiente a la “cola”), religado y nuevamente transformado en *E. coli* BL21(DE3) (no mostrado).

5.3.1. Sobreexpresión de la proteína AfeI en *E. coli* BL21(DE3)-AfeI

Se analizaron 2 colonias (a y b), provenientes de 2 clones distintos (AfeI1 y AfeI2). Las colonias fueron inducidas con IPTG por dos horas y se cargó una muestra de cada extracto total en un SDS-PAGE. Se observó una banda de sobreexpresión alrededor de 20 kDa en cada uno de los extractos (Fig. 12). La sobreexpresión resultó ser independiente de IPTG salvo el caso de AfeI2b, donde existe una diferencia notable.

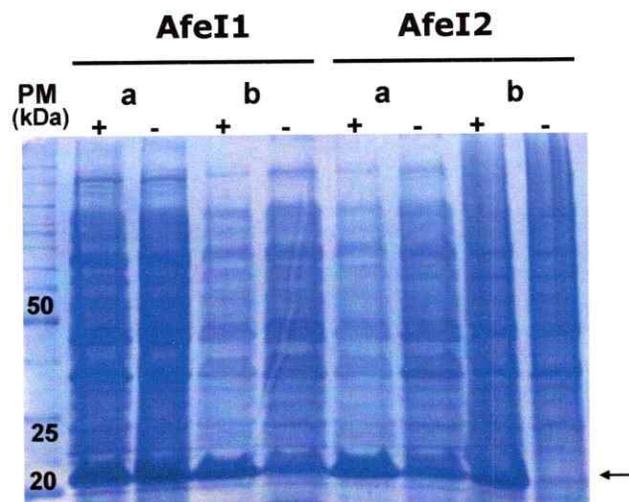


Figura 12. SDS-PAGE mostrando la sobreexpresión de la proteína AfeI recombinante en cuatro cultivos de *E. coli* BL21(DE3)-AfeI. Se analizaron 2 colonias (a y b) provenientes de 2 clones distintos (AfeI1 y AfeI2). Los cultivos fueron inducidos (+) o no (-) con 0,5 mM IPTG. La flecha indica la altura donde se encuentra la banda de sobreexpresión, entre 20 y 25 kDa.

5.3.2. Purificación de Afel.

Con el propósito de obtener una masa suficiente de la proteína Afel para efectuar el protocolo de inmunización, se procedió a sobreexpresar y purificar la proteína Afel desde 2 litros de cultivo. El precipitado celular se sometió al protocolo de extracción de cuerpos de inclusión (sección 4.3.2.). Este protocolo consiste en 2 fases de sonicación y luego la solubilización del material insoluble en urea 6 M.

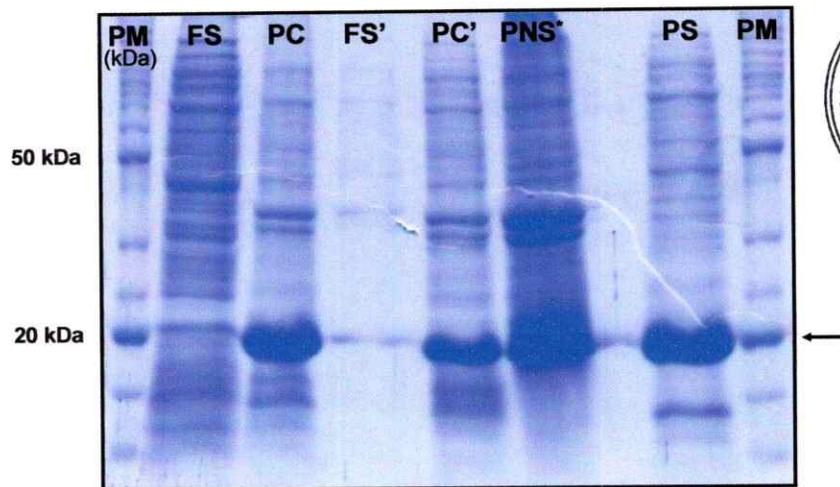


Figura 13. Análisis de las etapas de la extracción y solubilización de cuerpos de inclusión de *E.coli* BL21(DE3)-Afel mediante SDS-PAGE. **FS**, fase soluble primera sonicación; **PC**, precipitado celular primera sonicación; **FS'**, fase soluble segunda sonicación; **PC'**, precipitado celular segunda sonicación; **PNS'**, proteína no solubilizada; **PS**, proteína solubilizada. La **flecha** indica el tamaño esperado (20 KDa) para la proteína Afel. Las muestras se prepararon centrifugando alicuotas de 100 μ l por 20 s a 16000 g y el precipitado celular obtenido se resuspendió en 10 μ l de ABE y 5 μ l de amortiguador de carga de proteínas. Finalmente, se incubó a 95°C por 5 min y se cargaron 8 μ l en un gel de poliacrilamida. * Dado lo difícil de resuspender el precipitado correspondiente a proteína no solubilizada, se tomó una pequeña cantidad con una punta plástica y se resuspendió en 10 μ l de ABE y 5 μ l de amortiguador de carga 3x.

Se observa que la totalidad de la proteína sobreexpresada se encuentra en la fracción insoluble, probablemente formando parte de cuerpos de inclusión (Fig .13,

carril PC). Una fracción de los cuerpos de inclusión no fue solubilizado (Fig. 13, carril PNS), el resto si lo fue (Fig. 13 carril PS). La proteína solubilizada se cuantificó con el método coomasie plus protein assay reagent (Pierce) resultando ser de 4.89 mg/ml.

5.3.3. Electroelución desde geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes

Se procedió a purificar la proteína Afel directamente desde los geles SDS-PAGE. Se corrió un gel monodimensional grande (12,5% acrilamida) que contenía 216 μ l (720 μ g) de muestra de proteínas, distribuida en 9 carriles (24 μ l por carril, correspondiente a 80 μ g). Se tiñeron los dos primeros carriles, correspondientes al peso molecular y a una muestra de proteína solubilizada. Luego se cortó el resto del gel a la altura de la mancha de sobreexpresión (20 kDa), obteniéndose una sección perpendicular que contenía las manchas de los ocho carriles restantes.

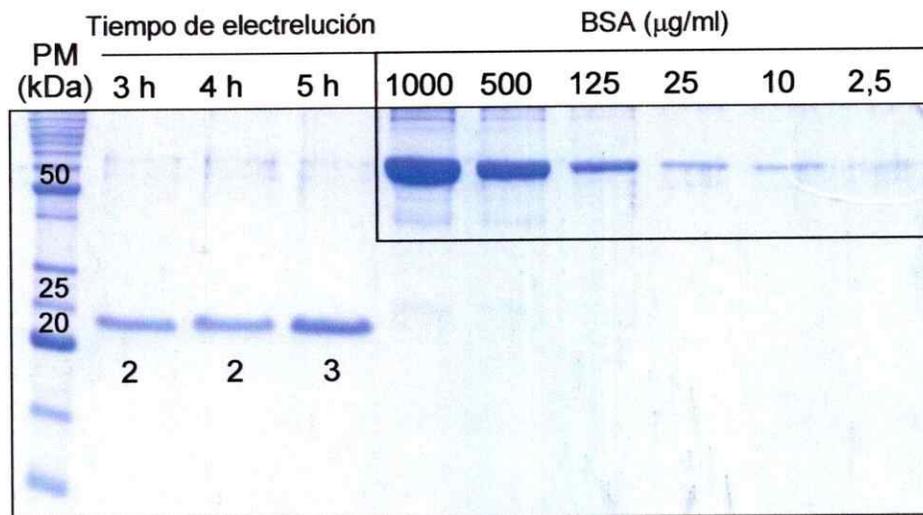


Figura 14. SDS-PAGE mostrando el resultado de la electroelución efectuada a la proteína Afel. Los carriles 3h, 4h y 5h indican los tiempos de electroelución de cada muestra. Bajo cada carril se indica el número de bandas que fueron cargadas en cada columna de electroelución. En los carriles siguientes se muestra el estándar de BSA, que se corrió en el mismo gel, y permite estimar la concentración aproximada de la muestra electroeluida.

La sección transversal fue fraccionada en 7 trozos de largo aproximado de 1,5 cm. Los trozos que contenían la proteína Afel se distribuyeron en tres columnas y fueron sometidos a distintos tiempos de electroelución. En el primer tubo se electroeluyeron 2 trozos por 3 h; en el segundo, 2 trozos por 4 h; y en el tercero, 3 trozos por 5 h. Los resultados se muestran en la figura 14.

El resultado de la electroelución revela la obtención de bandas en el tamaño esperado. Junto a las muestras se cargó un estándar de concentración de BSA que permitió estimar la concentración de las muestras. Para la muestra de 5 h ésta fue de 125 $\mu\text{g/ml}$, y para las muestras 3 y 4 h, fue de 25 $\mu\text{g/ml}$. Estas concentraciones son pequeñas y, por ende, la masa total obtenida es insuficiente para ser utilizada en las inmunizaciones. Lógicamente, la concentración de la muestra con más bandas fue mayor y el tiempo de electroelución de 3 h es suficiente para recuperar la totalidad de la proteína contenida en dos bandas de las características mencionadas. Para evaluar la eficiencia del protocolo experimental y de la electroelución, se tiñó con azul de coomasie los restos del gel desde donde se corto la sección que contenía la mancha de la proteína Afel. También se tiñeron los trozos de gel recién electroeluidos. Los restos del gel grande revelaron tener rastros de la proteína sólo en los contornos de la sección cortada, indicando que el corte fue preciso. Por otro lado, las bandas recién electroeluidas no mostraron rastros de proteína, indicando que la electroelución fue completa.

Debido a la obtención de poca masa de proteína en la electroelución anterior y con el fin de tener una mejor resolución en la zona del gel donde se encuentra la proteína, se decidió electroeluir Afel desde geles en gradiente de poliacrilamida. 2,8 mg de proteína solubilizada se distribuyeron en partes iguales en 14 carriles de un gel

en gradiente de poliacrilamida (10-20%). En el decimoquinto se cargaron 4 μ l de estándar de peso molecular. Una vez terminada la corrida se tiñó la fracción del gel que contenía el carril del estándar y un carril con muestra (Fig. 15).



Figura 15. Gel en gradiente de poliacrilamida (10-20%) desde donde se electroeluyó la proteína Afel. En el carril superior se cargó el estándar de peso molecular (PM) y en el inferior una muestra de 40 μ l de la proteína solubilizada a 5 μ g/ μ l (PS) (Fig. 13). La flecha negra indica la "mancha" correspondiente a la sobreexpresión de la proteína Afel.

Se cortó la sección del gel a la altura de la proteína sobreexpresada. Se fraccionó en 12 bandas de 1 cm de largo y se procedió a electroeluir las. Se tiñeron las bandas luego de electroeluidas y se detectó la presencia de proteína. Ésta ocupa aproximadamente la mitad del volumen de cada banda. Esto quiere decir que 4 horas de electroelución no fueron suficientes en el caso de geles concentrados. Por lo tanto, las bandas se terminaron de electroeluir al día siguiente por 4 h. El resultado final de electroelución se analizó mediante un minigel al 20% de acrilamida para verificar la electroelución (resultado no mostrado). Debido a que la mitad de la proteína electroeluida estaba teñida, y que la cantidad de proteína electroeluida no teñida es insuficiente, decidimos proceder a una nueva preparación. Esta vez se prepararon 2 geles grandes, ambos con gradiente de 10-20% de acrilamida y se cargó en total 5 mg distribuida en 16 carriles (8 carriles cada gel). Además, se cargaron dos carriles con estándares de peso molecular por gel (uno al inicio y otro al centro). Se cortaron de cada gel los estándares y un carril con muestra en el centro, los cuales se tiñeron con

azul de coomasie (Fig. 16A). La fracción del gel que contiene la proteína sobreexpresada se seccionó en bandas de 1 cm de largo y se distribuyeron en 4 columnas de electroelución. Se electroeluyó por 7 horas. Esta última electroelución se mezcló con la proteína rescatada en las electroeluciones anteriores, dando un total de 3,5 ml de proteína purificada. La proteína se cuantificó con el método de Bradford. Se midió la absorbancia a 595 nm de 2 diluciones de la muestra de proteína (1/500 y 1/10). A partir de la ecuación de la recta de la curva de calibración Abs vs masa de proteína $y = 0.0131x - 0,022$ determinada en una curva estándar con distintas concentraciones de BSA se estimaron las siguientes concentraciones: dilución 1/500 = 2,76 mg/ml y dilución 1/10 = 2,23 mg/ml, por lo que la concentración estimada promedio fue de 2,5 mg/ml. Por lo tanto, en total se purificaron 8,8 mg de proteína Afel.

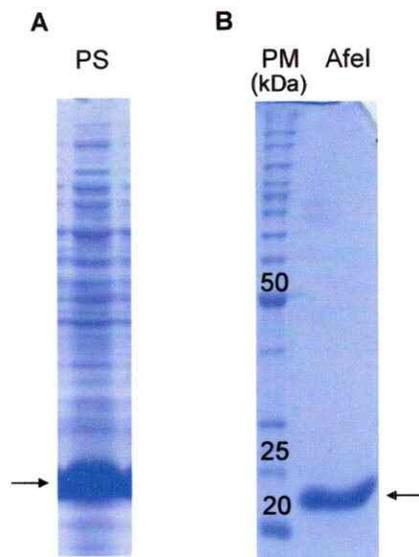


Figura 16. Electroelución de la proteína Afel desde geles en gradiente de poliacrilamida. A. Muestra de proteína solubilizada (PS) (Fig. 13) gel desde donde fueron extraídas las "manchas" para su posterior electroelución. Se indica la "mancha" de sobreexpresión con una flecha. B. SDS-PAGE mostrando la proteína Afel purificada a partir de dos electroeluciones independientes. La mancha correspondiente a la proteína pura se indica con una flecha.

Se corrió la muestra final purificada y cuantificada en un gel SDS-PAGE (Fig. 16B). Se observa claramente una única banda que migra alrededor de los 20 kDa, que corresponde a la proteína Afel. La identidad de la proteína fue confirmada por microsecuenciación del extremo amino-terminal. 7,7 mg de proteína purificada se enviaron a la empresa Bios-Chile donde se efectuaron inmunizaciones a conejos. Además, con la finalidad de inmunizar ratones Balb/c, se guardó 1 mg de proteína purificada, el cual se alicuotó en fracciones de 20 μ l (50 μ g de proteína) que se congelaron a -20°C.

5.3.4. Inmunodetección de Afel en extractos de *A. ferrooxidans*

Con el objeto de poner a prueba la efectividad del suero policlonal α -Afel generado, se realizó un ensayo de "western blot" para detectar la proteína en un extracto proteico de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental. Se logró detectar la presencia de una banda única en el extracto, utilizando el suero policlonal generado en ratón. La banda detectada, sin embargo, migra de manera distinta a la proteína Afel purificada desde *E. coli*, sugiriendo diferencias en el peso molecular de ambas (Figura 17) (ver discusión). El suero generado en conejo no entregó resultados positivos.



Figura 17. Western blot utilizando suero policlonal α -AfeI contra un extracto proteico de *A. ferrooxidans*. AF. Extracto de proteínas de *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental. AfeIr. Proteína AfeI recombinante purificada como control positivo. PM, marcador de peso molecular (Benchmark prestained protein ladder)

6. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue desarrollar herramientas que permitan seguir el nivel de expresión de la sintasa de *N*-acil homoserina lactona Afel de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Por una parte, se obtuvo suero policlonal α -Afel, para poder posteriormente, mediante experimentos de western blot, monitorear la expresión proteica de Afel u otros homólogos que inmunorreaccionen con el suero. Por otra parte, se implementó la técnica de separación y detección de AHLs mediante cromatografía en capa fina de fase reversa acoplada al biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4), para monitorear la producción de AHLs por parte de *A. ferrooxidans* u otros microorganismos de interés de manera rutinaria en el laboratorio.

Para el desarrollo de los anticuerpos α -Afel fue necesario clonar, sobreexpresar y purificar la enzima Afel. En primera instancia, la proteína fue expresada en un vector que agrega una "cola" de 35 aminoácidos en el extremo amino-terminal de la proteína. El suero obtenido no inmunoreaccionó con un extracto proteico total de *A. ferrooxidans*, mientras que si lo hizo contra un extracto proteico de la cepa de *E. coli* que sobreexpresa Afelc (no mostrado). La posibilidad de que se hayan generado anticuerpos contra la "cola" amino-terminal fue considerada. El hecho de que el anticuerpo reaccionó de manera cruzada con dos proteínas que solo comparten los 35 aminoácidos adicionales en común, sugiere fuertemente que la hipótesis es correcta. La proteína Afel, esta vez sin "cola", fue sobreexpresada y purificada nuevamente. Las inmunizaciones se reanudaron con esta nueva proteína.

El suero policlonal que se obtuvo luego de esta nueva serie de inmunizaciones, permitió obtener finalmente un suero policlonal α -Afel cuya especificidad está en curso

de evaluación actualmente. El ensayo de western blot de la figura 17 muestra la detección de una banda discreta en un extracto proteico de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, Existe una diferencia importante en el peso molecular de la proteína detectada en el extracto de *A. ferrooxidans* y la versión recombinante purificada. Para el ensayo mencionado, las muestras de proteína fueron resueltas en un gel SDS-PAGE. Las condiciones desnaturantes del gel impiden la agregación de proteínas que puedan dar cuenta de la diferencia de peso. Sin embargo, existe la posibilidad de que la proteína Afel forme agregados estables resistentes a la concentración de SDS utilizada. Esta supuesta agregación no ocurría con la proteína extraída desde *E. coli*. Otra posibilidad es que la proteína de *A. ferrooxidans* posea modificaciones post-traduccionales que den cuenta de la diferencia de tamaño. También se debe considerar la posibilidad de que la proteína se encuentre formando homo o heterooligómeros estabilizados por puentes disulfuro. En la figura 17 no se logra apreciar con exactitud la diferencia de peso que existe entre las bandas detectadas, por lo que es difícil inferir el tipo de oligomerización supuesta. Sería acertado secuenciar la proteína detectada para confirmar la especificidad del anticuerpo antes de poner a prueba estas hipótesis.

En nuestro laboratorio se han efectuado extracciones orgánicas de sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans* en distintas condiciones. La identidad de las AHLs presentes en sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans* ha sido determinada por medio de cromatografía líquida de fase reversa acoplada a un espectro de masas (liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectroscopy (LC-MS-MS)) en el Laboratorio de Biología y Química Marina de la Universidad de Bretaña en Francia. Los resultados indican que las AHLs C12-HSL, C14-HSL, OH-C8-HSL, OH-C10-HSL, OH-C12-HSL, OH-C14-HSL, OH-C16-HSL están presentes en sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans*. Resultados previos indican

que la enzima Afel es la responsable de la síntesis de las AHLs producidas por *A. ferrooxidans* (Farah y col., 2005). Recientemente se describió la actividad *N*-acil homoserina lactona sintasa de un gen denominado *act1* en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, éste gen es homólogo a la enzima HdtS de *P. fluorescens* y podría ser responsable, junto con Afel, de la síntesis de alguna de las AHLs detectadas en sobrenadantes de *A. ferrooxidans* (Rivas y col., 2007).

La necesidad de implementar una técnica rutinaria para efectuar la detección de AHLs desde extractos de sobrenadantes de interés, nos llevó a plantear el objetivo de desarrollar la técnica de cromatografía en capa fina acoplada al biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4). La técnica fue implementada con éxito a través del uso de estándares sintéticos que fueron utilizados para estimar la sensibilidad del biosensor por las distintas AHLs disponibles. Se efectuaron extracciones orgánicas desde sobrenadantes de cultivo de *E. coli* (que sobreexpresa Afel) y de *A. ferrooxidans*. Moléculas presentes en ambos sobrenadantes fueron capaces de activar al biosensor. Los patrones migratorios presentes en los extractos de *E. coli* y *A. ferrooxidans* son similares, pero no idénticos. En extractos de sobrenadantes de *A. ferrooxidans* se detectó un máximo de siete señales (Fig. 11).

Las moléculas detectadas en sobrenadantes de cultivo de *A. ferrooxidans* con la técnica de TLC/biosensor no necesariamente corresponden a las moléculas detectadas en sobrenadantes similares, usando la técnica de LC-MS-MS. Los resultados obtenidos utilizando esta última, indican la presencia de las AHLs de cadena larga (C-14-HSL, OH-C14-HSL y OH-C16-HSL). No obstante, el biosensor posee baja sensibilidad a AHLs de cadenas largas por lo tanto su detección es poco probable. Por otra parte, AHLs detectadas con el biosensor pueden no haber sido detectadas con la técnica de espectrometría de masas, sobre todo aquellas AHLs que se encuentran en el rango de

mayor sensibilidad. Por ejemplo, se necesitan tan sólo 0,5 fmoles de la molécula oxo-C8-HSL para activar al biosensor NTL4(pZLR4) (Shaw y col., 1997), mientras que para detectar la misma molécula con la técnica de espectrometría de masas usada, se necesitan 0,8 pmoles (Morin y col., 2003). Por otro lado, las señales detectadas por el biosensor no son necesariamente AHLs. Esto queda en evidencia con la detección de la molécula denominada "compuesto polar" (CP, sección 5.2.1), cuya estructura es desconocida. "CP" no comigra con AHLs de tamaño próximo y sin embargo es capaz de activar a TraR. Con el fin de identificar de manera tentativa las moléculas presentes en extractos orgánicos de sobrenadantes de *A. ferrooxidans* capaces de activar el biosensor, se comparó los valores de migración relativa (Rf) de los estándares disponibles con los valores de Rf de las manchas en la muestra. Sólo 2 de las 7 "manchas" detectadas migraron de manera similar a estándares sintéticos (Fig. 10B, a y b). Esto sugiere que estas dos moléculas corresponderían a las AHLs C12-HSL y C10-HSL. La baja resolución de la técnica en la zona cercana al origen de migración imposibilita asegurar que las migraciones son idénticas. La señal "b" (Fig. 10) migra como la molécula C10-HSL, sin embargo, usando espectroscopia de masas, esta molécula no se detectó en sobrenadantes de *A. ferrooxidans*. La sensibilidad de la técnica de LC-MS-MS es mayor para la molécula C10-HSL que la técnica del biosensor (0,6 pmoles y 100 pmoles, respectivamente). Creemos que lo más probable es que la molécula "b" sea más bien OH-C12-HSL, ya que ésta migra muy cerca de C10 (Shaw y col., 1997) y sí fue detectada previamente mediante espectroscopía de masas (Farah y col., 2005). La diferencia en la migración de "b" y C10-HSL se aprecia mejor en la figura 11, esta se corrió 3 veces, por lo que tiene mejor resolución en la zona cercana al origen. La molécula "a" podría corresponder a C14 ó OH-C14 a una mezcla de ellas. La baja sensibilidad del biosensor por estas moléculas y la baja resolución

cromatográfica en esta zona, no nos permiten identificar esta señal. Las señales c, d, y e (Fig. 10 y Fig. 11) no poseen valores de Rf similares a estándares sintéticos.

Los comportamientos en la migración cromatográfica de las moléculas en la figura 10b (carril 2), en relación a los estándares no sustituidos (carril 1), sugiere fuertemente que dos de las tres moléculas antes mencionadas ("c", "d", y "e"), corresponden a 3-hidroxi-C8-HSL y 3-hidroxi-C10-HSL ("c" y "e"). Esto es posible gracias a la detección de AHLs hidroxiladas en el trabajo de Shaw y col. (1997). En dicho trabajo se sometió al ensayo de biosensor NTL4(pZLR4) un extracto de sobrenadante de cultivo de la bacteria *P. fluorescens* (cepa 2-79). El resultado fue que cuatro de las cinco moléculas detectadas en dicho extracto, presentaron valores de Rf distintos a todas las moléculas estándar no sustituidas con cadenas acilo pares de entre 12 y 6 carbonos. Tres de estas moléculas sí compartieron valores de Rf con los estándares oxo-sustituidos 3-oxo-C6-HSL, 3-oxo-C8-HSL y oxo-C10-HSL. A pesar de la comigración de las 3 manchas problema con AHLs oxo-sustituidas, existían diferencias en la forma de la mancha. Las AHLs oxo-sustituidas adquieren una forma de "cometa" ó "mancha con cola", mientras que la forma de las manchas problema era redonda, al igual que las AHLs sintéticas no sustituidas. Esto condujo a los autores a determinar la estructura de las moléculas presentes en estas tres manchas mediante espectrometría de masas. Se concluyó que éstas correspondían a las AHLs 3-hidroxi-C6-HSL, 3-hidroxi-C8-HSL y 3-hidroxi-C10-HSL. El comportamiento cromatográfico y la forma de las manchas "c" y "e" (Fig. 10A), es similar a las AHLs hidroxiladas detectadas en los extractos de *P. fluorescens*. La comparación de los valores de Rf de las manchas "c" y "e" (Fig. 10A) con los valores de Rf de las moléculas detectadas en sobrenadantes de *P. fluorescens*, permitió inferir la identidad de las moléculas (3-hidroxi-C10-HSL y 3-hidroxi-C8-HSL, como ya se mencionó).

La tercera mancha (Fig. 10B, "d") puede corresponder a una molécula no sustituida o hidroxí-sustituida de largo de cadena con un número impar de carbonos. Las moléculas "f" y "g" (Fig. 11) migraron como los estándares CP y oxo-C6-HSL, respectivamente. Ninguna molécula de AHL de este largo fue encontrada por LC-MS-MS, por lo que la identidad de estas moléculas debe ser determinada.

También se efectuaron extracciones orgánicas a las células de *A. ferrooxidans* (Fig. 11, carril 3). Se logró detectar la presencia de al menos una señal hidrofóbica que permanece asociada con las células, ya sea en el citoplasma o en las membranas. La retención de las moléculas más hidrofóbicas por parte de las células del cultivo ya ha sido reportada (Pearson y col., 1999; Schaefer y col., 2002). Los resultados sugieren una relación entre la hidrofobicidad de las señales y la retención en las células ó membranas de las mismas. El hecho de que este biosensor presente una baja sensibilidad hacia las señales hidrofóbicas y que el volumen que corresponde a las células es muy pequeño comparado con el volumen de sobrenadante sugieren que la concentración de estas señales podría ser alta en las células, ya sea en membranas o en el citoplasma.

La técnica de TLC/biosensor será utilizada como herramienta de rutina en la detección de señales de comunicación producidas por otros microorganismos que forman parte del consorcio biolixivante. La presencia de otras bacterias capaces de establecer comunicación célula-célula dentro del consorcio podría explicar la aparente redundancia en las señales producidas por *A. ferrooxidans* y aumenta la complejidad en la regulación de los fenotipos dependientes de QS entre las bacterias pertenecientes al nicho común, complejidad que debe aún ser dilucidada.

El hecho de que la proteína Afel se encuentre formando cuerpos de inclusión no impidió detectar la presencia de AHLs en sobrenadantes de cultivo, esto implica que al

menos una parte de la proteína se encuentra activa. Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteína que se forman generalmente en bacterias hospedadoras durante la sobreexpresión de proteínas recombinantes. Un ensayo de western blot efectuado las fracciones soluble e insoluble de un extracto proteico de la cepa *E. coli* BL21(DE3)-AfeIc utilizando un anticuerpo anti-6xHis no logró detectar proteína en la fracción soluble (no mostrado). Estos resultados indican que una pequeña cantidad de AfeI es capaz de sintetizar y acumular AHLs. Por otra parte, es sabido que la formación de cuerpos de inclusión es un proceso reversible y que existe un equilibrio entre la agregación y la solubilización de estos (Villaverde y Carrio, 2003). La presencia de actividad AfeI en la cepa transformada puede ser explicada a través de las siguientes hipótesis: 1. Existe una cantidad de proteína AfeI en la fracción soluble suficiente para sintetizar las AHLs encontradas en el medio, pero esta cantidad es insuficiente para ser inmunodetectada en un western blot. 2. La proteína está presente en la fracción soluble y es activa, pero es degradada durante el proceso de extracción por lo que no se detecta en el ensayo de western blot. 3. La cantidad total de AHL encontrada en sobrenadantes fue sintetizada antes de que el equilibrio fuera desplazado hacia la formación de cuerpos de inclusión. 4. La proteína, a pesar de estar formando parte de cuerpos de inclusión, posee actividad. Resulta interesante que la primera alternativa implica que la proteína AfeI es capaz de sintetizar una cantidad considerable de AHL, comparable con la producida por *A. ferrooxidans*, a pesar de encontrarse esta en cantidades ínfimas. La tercera alternativa implica que la actividad de la proteína es lo suficientemente alta como para sintetizar una cantidad apreciable de AHL en un tiempo relativamente corto. La cuarta alternativa ha sido observada para otras proteínas que han sido expresadas en forma heteróloga (Worrall y Goss, 1989)

La cantidad total de AHLs presentes en el medio de cultivo de *A. ferrooxidans* y *E. coli* que sobreexpresa Afel es similar. Cuando se cargan en una TLC 20 μ l de un extracto proveniente de 200 ml de sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* o *E. coli*, se obtienen manchas de tamaños similares. El extracto de *E. coli* se encuentra concentrado 300 veces y el de *A. ferrooxidans* 4000, sin embargo el crecimiento de *E. coli* es al menos un orden de magnitud mayor que el de *A. ferrooxidans*, razón por la cual el número aproximado de AHLs producidas por célula es similar. Esto indica que en el citoplasma de *E. coli* existe cantidad suficiente de Afel activa para producir cantidades equivalentes a *A. ferrooxidans*, a pesar de la acumulación de ésta en cuerpos de inclusión.

7. CONCLUSIONES

- La proteína Afel de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se clonó y sobreexpresó de forma heteróloga en *E. coli*. Ésta se purificó en condiciones desnaturalantes y se generó suero policlonal α -Afel en ratón.
- Se implementó la técnica de separación y detección de AHLs por medio de cromatografía en capa fina acoplada a un biosensor.
- El biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) es capaz de detectar al menos 7 señales en sobrenadantes de *A. ferrooxidans*, bajo nuestras condiciones experimentales.
- Una señal hidrofóbica permanece asociada con las células en el cultivo, por lo que podría ser de interés seguir las variaciones de concentración de las AHLs a nivel intracelular.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Amaro A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I. y Jerez, C.A. 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**:910-5
- Andersson R.A., Eriksson, A.R., Heikinheimo, R., Mae, A., Pirhonen, M., Koiv, V., Hyytiainen, H., Tuikkala, A. y Palva, E.T. 2000. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR*(Ecc). *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:384-93
- Chilton M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. y Nester, E.W. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **71**:3672-6
- Davies D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. y Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-8
- Dunlap P.V. 1999. Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:5-12
- Eberhard A. 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* **109**:1101-5
- Eberhard A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealon, K.H. y Oppenheimer, N.J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**:2444-9
- Engbrecht J. y Silverman, M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **81**:4154-8
- Farah C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A. y Guiliani, N. 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7033-40
- Federle M.J. y Bassler, B.L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* **112**:1291-9
- Fuqua C. y Winans, S.C. 1996. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J. Bacteriol.* **178**:435-40
- Fuqua W.C. y Winans, S.C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**:2796-806
- Fuqua W.C., Winans, S.C. y Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-75
- Gilson L., Kuo, A. y Dunlap, P.V. 1995. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* **177**:6946-51
- Gray K.M. y Garey, J.R. 2001. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**:2379-87
- Hanzelka B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E., Jr. y Greenberg, E.P. 1999. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* **181**:5766-70
- Kaiser D. 2004. Signaling in *myxobacteria*. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:75-98

- Kaplan H.B. y Greenberg, E.P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**:1210-4
- Keller L. y Surette, M.G. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:249-58
- Kempner E.S. y Hanson, F.E. 1968. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* **95**:975-9
- Laue B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F. y Williams, P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** (Pt 10):2469-80
- Marketon M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A. y Gonzalez, J.E. 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **185**:325-31
- McGowan S.J., Barnard, A.M., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. y Salmond, G.P. 2005. Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol. Microbiol.* **55**:526-45
- Miller M.B. y Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165-99
- Minogue T.D., Wehland-von Trebra, M., Bernhard, F. y von Bodman, S.B. 2002. The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol. Microbiol.* **44**:1625-35
- More M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. y Winans, S.C. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**:1655-8
- Morin D., Grasland, B., Vallee-Rehel, K., Dufau, C. y Haras, D. 2003. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J Chromatogr A* **1002**:79-92
- Nealson K.H., Platt, T. y Hastings, J.W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* **104**:313-22
- Pearson J.P., Van Delden, C. y Iglewski, B.H. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**:1203-10
- Piper K.R., Beck von Bodman, S. y Farrand, S.K. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**:448-50
- Pirhonen M., Flego, D., Heikinheimo, R. y Palva, E.T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J.* **12**:2467-76
- Ramirez P., Toledo, H., Guigliani, N. y Jerez, C.A. 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1837-45
- Rawlings D.E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:65-91
- Rawlings D.E. y Kusano, T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**:39-55

- Rivas M., Seeger, M., Holmes, D.S. y Jedlicki, E. 2005. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* **38**:283-97
- Rivas M., Seeger, M., Jedlicki, E. y Holmes, D.S. 2007. A second acyl homoserine lactone (AHL) producing system in the extreme acidophile, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Sambrook J. y Russell, D.W. 2001. *En* Cold Spring Harbor Laboratory Press (eds.), *Molecular cloning : a laboratory manual.*
- Schaefer A.L., Taylor, T.A., Beatty, J.T. y Greenberg, E.P. 2002. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J Bacteriol* **184**:6515-21
- Schaefer A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr. y Greenberg, E.P. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**:9505-9
- Shadel G.S. y Baldwin, T.O. 1992. Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri* luxR gene. LuxR and autoinducer activate cAMP-catabolite gene activator protein complex-independent and -dependent luxR transcription. *J. Biol. Chem.* **267**:7696-702
- Shaw P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Jr., Rinehart, K.L. y Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**:6036-41
- Vannini A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. y Marco, S.D. 2002. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *Embo J.* **21**:4393-401
- Villaverde A. y Carrio, M.M. 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnol. Lett.* **25**:1385-95
- von Bodman S.B., Ball, J.K., Faini, M.A., Herrera, C.M., Minogue, T.D., Urbanowski, M.L. y Stevens, A.M. 2003. The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpR(Ecc), homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. *J. Bacteriol.* **185**:7001-7
- West S.A., Griffin, A.S., Gardner, A. y Diggle, S.P. 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:597-607
- Wilkinson A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J.K. y Downie, J.A. 2002. *N*-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* **184**:4510-9
- Worrall D.M. y Goss, N.H. 1989. The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *5thm*. *Aust. J. Biotechnol.* **3**:28-32
- Xavier K.B. y Bassler, B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:191-7
- Zhang R.G., Pappas, T., Brace, J.L., Miller, P.C., Oulmassov, T., Molyneaux, J.M., Anderson, J.C., Bashkin, J.K., Winans, S.C. y Joachimiak, A. 2002. Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature* **417**:971-4
- Zhu J. y Winans, S.C. 2001. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**:1507-12