

UCH-FC
Biotecnología
V. 945
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO



**“IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO DETERMINANTE DE
RESISTENCIA A COBRE EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*
ATCC 23270”**

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

DIEGO VON BERNATH PREECE

Dr. Carlos A. Jerez Guevara
Director

Julio 2014

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

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

Diego von Bernath Preece

“IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO DETERMINANTE DE RESISTENCIA A COBRE EN *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270”

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

Dr. Carlos A. Jerez
Director Seminario de Título:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Carlos A. Jerez", written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Francisco Chávez
Presidente Comisión:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Francisco Chávez", written over a horizontal line.

Dra. Julieta Orlando
Evaluador:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Julieta Orlando", written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Julio de 2014



A mis padres, Carolina y Zoltan, con mucho cariño.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mis padres por todo su apoyo incondicional y cariño. A mis hermanos por su compañía y entusiasmo.

A la Ara por ser mi partner en todo, por su paciencia y por compartir este proceso conmigo.

A mis amigos de Bachillerato y Ciencias, que hicieron de ésto algo más entretenido. A la Coni por su alegría y por obligarme a estudiar.

Al profesor Carlos Jerez por aceptarme en su laboratorio y por compartir sus conocimientos científicos y fotográficos.

Finalmente, a todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología por su buena onda y ayuda en este proceso. Especialmente a Don Juan, Alejandro, Claudio, Rodrigo, Sebastián, Matías y Cristóbal.

Este Seminario de Título fue financiado por el proyecto FONDECYT 1110214.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 HIPÓTESIS	7
1.2 OBJETIVO GENERAL	7
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	8
2.1.1 Análisis de secuencia.....	8
2.1.2 Contexto genómico	9
2.1.3 Modelamiento estructural.....	9
2.2 CEPAS.....	9
2.3 PLASMIDIOS.....	10
2.4 CONDICIONES DE CULTIVO	10
2.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	12
2.5.1 Extracción de DNA genómico	12
2.5.2 Extracción de RNA total.....	12
2.5.3 Cuantificación de DNA y RNA.....	13
2.5.4 Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa.....	14
2.5.5 Purificación de plasmidios y de fragmentos obtenidos por PCR	14
2.5.6 Diseño de oligonucleótidos	15
2.5.7 Reacciones de PCR.....	16
2.5.8 Transcripción reversa.....	16
2.5.9 Reacciones de PCR en tiempo real.....	17
2.5.10 Cuantificación por PCR en tiempo real.....	17
2.5.11 Clonación de AFE_1862 en el vector pTrcHis2-TOPO.....	19
2.5.12 Mutagénesis sitio-dirigida.....	19
2.5.13 Transformación de Escherichia coli	20
2.5.14 Análisis de colonias transformantes.....	21
2.6 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE COBRE PARA ALGUNAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI	22
3. RESULTADOS	23
3.1 CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA DE AFE_1862.....	23
3.1.1 Análisis de secuencia.....	23
3.1.2 Contexto genómico	26
3.2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN AFE_1862 EN PRESENCIA DE COBRE	29

3.3 CLONACIÓN DE AFE_1862 Y GENERACIÓN DEL MUTANTE EN EL SITIO DE UNIÓN A COBRE.....	30
3.3.1 Clonación de AFE_1862 en pTrcHis2-TOPO	31
3.3.2 Mutagénesis sitio dirigida.....	32
3.4 EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE AFE_1862 EN ESCHERICHIA COLI 3MUT Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA PARA COBRE	33
4. DISCUSIÓN	36
5. CONCLUSIÓN.....	40
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41
7. ANEXO	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este trabajo.	9
Tabla 2. Plasmidios usados en este trabajo	10
Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.....	15
Tabla 4. Lista de proteínas homólogas a AFE_1862.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de la homeostasis de cobre en <i>Escherichia coli</i>	4
Figura 2. Modelo de la homeostasis de cobre en <i>Enterococcus hirae</i>	5
Figura 3. Alineamiento múltiple entre AFE_1862 y las chaperonas de cobre más caracterizadas.....	25
Figura 4. Contexto genómico de AFE_1862 y algunos de los genes ortólogos identificados.....	27
Figura 5. Modelo estructural de AFE_1862 a partir de la estructura de CopZ de <i>Bacillus subtilis</i>	28
Figura 6. Niveles de expresión transcripcional del gen AFE_1862 en células de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecidas en presencia de cobre.....	30
Figura 7. Selección de clones que tienen pTrcHis2-TOPO con AFE_1862 orientado correctamente mediante digestión con <i>EcoRV</i>	32
Figura 8. Confirmación de la mutación en el posible sitio de unión a cobre mediante secuenciación de DNA.....	33
Figura 9. Confirmación de la expresión heteróloga de AFE_1862 nativa y mutante en <i>Escherichia coli</i> 3mut.....	34
Figura 10. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de cobre en células de <i>Escherichia coli</i> hipersensibles a cobre transformadas con pTrcHis2-TOPO que expresa AFE_1862 nativa o AFE_1862 mutante.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

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

cDNA: ADN complementario, por sus siglas en inglés "Complementary Deoxyribonucleic Acid"

CT: Ciclo de PCR en el cual se sobrepasa el umbral de fluorescencia, por sus siglas en inglés "Cycle Treshold"

ICPL: Análisis de proteómica cuantitativa, por sus siglas en inglés "Isotope Coded Protein Label"

IPTG: Isopropil- β -D-1-Tiogalactopiranosido

LB: Medio de cultivo Luria-Bertani

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica, por sus siglas en inglés "National Center for Biotechnology Information"

pb: Pares de base

aa: Aminoácidos

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

qPCR: PCR en tiempo real ó PCR cuantitativo, por sus siglas en inglés "Quantitative Polymerase Chain Reaction"

RT-PCR: Transcripción reversa acoplada a PCR, por sus siglas en inglés "Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction"

RND: Superfamilia de bombas de eflujo, por sus siglas en inglés "Resistance, Nodulation, Cell división"

RESUMEN

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria, Gram-negativa, quimiolitotrofica y es uno de los principales microorganismos presentes en los consorcios biomineros que participan en la extracción de cobre. Una de las cepas más caracterizadas de *A. ferrooxidans* es la cepa ATCC 23270, la que es capaz de resistir concentraciones muy elevadas de cobre de hasta 100 mM. Este acidófilo es capaz de utilizar varias estrategias para resistir el metal, en las que están involucrados principalmente el metabolismo de los polifosfatos, la tolerancia al estrés oxidativo, la utilización de chaperonas periplasmáticas capaces de unir cobre y la expresión de sistemas de eflujo de cobre formados por P-ATPasas y complejos del tipo RND (Resistencia, Nodulación y División celular). Recientemente en nuestro laboratorio se descubrió, mediante proteómica cuantitativa, que cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se expone a concentraciones altas de cobre, esta bacteria sobre-expresa proteínas relacionadas con la biosíntesis de cisteína e histidina, dos aminoácidos capaces de unir cobre, y también sobre-expresa proteínas del tipo DsbG, que serían capaces de restaurar los enlaces disulfuro de proteínas afectadas por el cobre. También se descubrió que esta bacteria sobre-expresa la proteína codificada por AFE_1862, que es una proteína pequeña de función desconocida. En este trabajo se caracterizó la proteína codificada por AFE_1862 mediante distintos análisis bioinformáticos, se midió la expresión del gen mediante PCR en tiempo real y se analizó su posible función mediante la expresión heteróloga del gen en *Escherichia coli*. Se encontró que el gen AFE_1862 se expresa en presencia de 10, 20 y 40 mM de CuSO_4 y que la proteína codificada por este gen es posiblemente una metalochaperona del tipo CopZ que es capaz de unir cobre. Mediante mutagénesis sitio-dirigida de las cisteínas 13 y 16 del

posible sitio de unión a metales, se determinó que estos aminoácidos participarían en la unión a este metal, puesto que la expresión de la proteína mutante en *E. coli* no aumentó la resistencia a cobre de esta bacteria. Además, AFE_1862 sería el primer determinante de resistencia a cobre citoplasmático descrito en *A. ferrooxidans*.

ABSTRACT

Acidithiobacillus ferrooxidans is a Gram-negative and chemolithoautotrophic γ -proteobacteria, which is one of the most abundant microorganisms present in the biomining consortia used for the bioleaching of copper. *A. ferrooxidans* ATCC 23270 is one of the most studied strains of this bacterium and is able to grow at very high copper concentrations (up to 100 mM). This acidophile uses a wide repertoire of strategies to withstand copper, like: polyphosphate metabolism, oxidative stress tolerance, the use of periplasmic metallochaperones and the expression of known copper-resistance determinants (P-type ATPases and RND metal efflux system). Recently, in our laboratory it was found by using quantitative proteomics that when *A. ferrooxidans* ATCC 23270 is exposed to high concentrations of copper some proteins involved in the cysteine and histidine biosynthesis are over-expressed. Also, the over-expression of a DsbG-like protein that might be involved in the restoration of the disulfide bonds of some proteins affected by copper was observed. It was also discovered that this bacterium over-expresses a protein coded by ORF AFE_1862, which is a small protein with unknown function. In this work the protein coded by AFE_1862 was bioinformatically characterized, the expression of its ORF was measured by real-time PCR and the possible function of the protein was analyzed by its heterologous expression in *Escherichia coli*. We found that AFE_1862 is up-regulated in the presence of 10, 20 and 40 mM CuSO₄ and that the protein codified by this ORF may be a CopZ-like metallochaperone that is able to bind copper. This binding of copper involves cysteines 13 and 16 of the possible metal-binding site, as determined by site-directed mutagenesis of these amino acids since the mutant protein expressed in *E. coli*

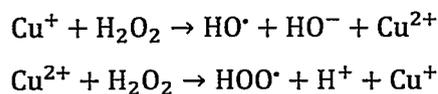
did not confer higher copper resistance to this bacterium. Furthermore, AFE_1862 may be the first cytoplasmic copper resistance determinant described in *A. ferrooxidans*.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, Chile es uno de los mayores exportadores de cobre del mundo y la extracción de este metal es una de las principales actividades económicas del país. En general, los procesos más utilizados para la extracción de metales son la pirometalurgia y la hidrometalurgia. Sin embargo, la creciente necesidad por reprocesar relaves mineros y usar minerales de baja ley para extraer los metales, además de buscar técnicas de extracción más amigables con el ambiente, hacen que los bioprocesos como la biolixiviación y la biooxidación sean de especial interés (Johnson, 2013). Los procesos biomineros se llevan a cabo por consorcios de microorganismos extremófilos, formados por bacterias y arqueas acidófilas que son capaces de obtener su energía mediante reacciones redox en las que el mineral es el dador de electrones y el oxígeno el aceptor. Estas reacciones permiten liberar los metales deseados a partir de compuestos minerales sulfurados. Uno de los microorganismos más abundantes en los consorcios biomineros es *A. ferrooxidans* que es una γ -proteobacteria, Gram-negativa, quimiolitioautotrófica, capaz de obtener su energía a partir de la oxidación de ion ferroso, azufre elemental y diversos compuestos de azufre parcialmente reducidos. Este microorganismo se utiliza para recuperar una gran variedad de metales como cobre, uranio y níquel (Olson y col., 2003; Rohwerder y col., 2003; Jerez, 2011; Vera y col., 2013). *A. ferrooxidans* es una bacteria mesófila-acidófila puesto que su crecimiento óptimo ocurre a una temperatura de 30 °C y a pH 1,8. A pesar de crecer a pH ácido, esta bacteria es capaz de mantener un pH interno de 6,5, lo que genera un Δ pH de membrana muy grande. Este Δ pH es uno de los principales componentes de la fuerza protón motriz en los organismos acidófilos y favorece una gran cantidad de procesos energéticos en la célula (Baker-Austin & Dopson, 2007).

En algunos procesos biomineros las concentraciones de cobre son muy elevadas, generalmente se encuentra en un rango de 15 a 100 mM de cobre (Watling, 2006; Jerez, 2011; Jerez, 2013), por lo que es importante estudiar cómo estos microorganismos son capaces de tolerar dichas concentraciones del metal. En general, las arqueas y las bacterias acidófilas toleran concentraciones de metales pesados muy elevadas si se compara con otros microorganismos (Dopson y col., 2003; Orell y col., 2010; Navarro y col., 2013). Por ejemplo, *A. ferrooxidans* puede crecer a concentraciones de sulfato de cobre superiores a 100 mM (Das y col., 1998).

El cobre es un metal esencial para todos los organismos, puesto que es un componente fundamental en la estructura y actividad catalítica de algunas proteínas muy importantes, como por ejemplo la citocromo c oxidasa, la plastocianina y la superóxido dismutasa (Festa & Thiele, 2011; Argüello y col., 2013). Sin embargo, el cobre libre puede ser extremadamente perjudicial para la célula ya que su capacidad de cambiar entre los estados redox Cu(I)/Cu(II), puede generar especies reactivas de oxígeno mediante una reacción de tipo Fenton:



Estos radicales pueden generar la peroxidación de lípidos, oxidar proteínas y generar daños en los ácidos nucleicos. Además, el cobre puede desplazar de las metalo-proteínas otros metales que éstas contienen. Debido a la gran afinidad entre el cobre y los grupos tioles, este metal puede además desestabilizar los centros Fe-S de algunas proteínas (Dupont y col., 2011). Es por esto que, además de poseer proteínas que utilizan el cobre y sacan provecho de sus capacidades redox es necesario que los

microorganismos posean sistemas para evitar la toxicidad generada por este metal.

Las bacterias, en general, poseen mecanismos de resistencia que involucran el eflujo de cobre y también la captura de este metal mediante chaperonas que evitan la presencia de cobre libre. Dos de los modelos bacterianos mejor caracterizados son los de la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (Figura 1) y el de la bacteria Gram-positiva *Enterococcus hirae* (Figura 2). En el caso de *E. coli*, el mecanismo de ingreso del cobre hacia el citoplasma no se conoce. Sin embargo, se cree que el metal podría difundir a través de las membranas o ingresar hasta el espacio periplasmático mediante porinas inespecíficas. Una vez dentro, el cobre es captado en el citoplasma por la proteína CueR, que pertenece a la familia de los reguladores transcripcionales tipo MerR. Esta proteína es capaz de activar la transcripción de *copA* y *cueO*, que codifican para una ATPasa de cobre y una oxidasa de cobre, respectivamente. CopA es capaz de utilizar la energía obtenida mediante la hidrólisis de ATP para sacar el cobre desde el citoplasma hacia el periplasma. El Cu (I) que se encuentre en el periplasma es oxidado a la forma menos tóxica de cobre Cu (II) mediante la oxidasa de cobre CueO. Además existe un sistema de dos componentes *cusRS* que codifica para un regulador transcripcional (CusR) y una histidina kinasa (CusS) que es capaz de captar la presencia de cobre en el periplasma y activar la transcripción del operón *cusCFBA*. Este operón codifica para un sistema de eflujo de cobre formado por CusA (proteína del tipo RND), CusB (proteína de fusión de membrana) y una proteína de membrana externa (CusC) que forma un canal para el tráfico de cobre. Además, este operón codifica para una chaperona periplasmática, CusF, que podría entregar cobre desde el periplasma al complejo CusCBA para así sacar el cobre desde la célula (Kim y col., 2011; Argüello y col., 2013). Por cada molécula de Cu (I) que sale mediante este sistema, ingresa un protón al citoplasma.

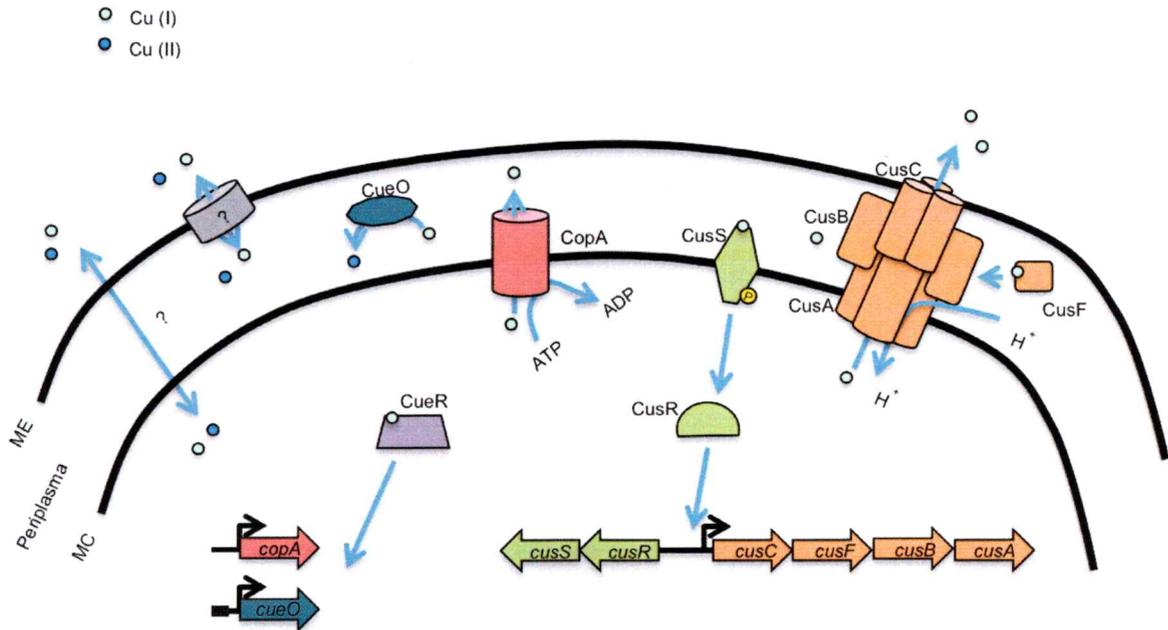


Figura 1. Modelo de la homeostasis de cobre en *E. coli*. El metal es capaz de ingresar a la célula mediante porinas inespecíficas o mediante difusión a través de las membranas. Una vez en el interior el cobre es captado por la proteína citoplasmática CueR, la cual permite la regulación de los genes *copA* y *cueO*, que codifican para una ATPasa de cobre y una oxidasa de cobre, respectivamente. Además *E. coli* posee un sistema de dos componentes, CusRS, capaz de activar la expresión del operón *cusCFBA* que codifica para un sistema de eflujo del tipo RND. Figura modificada de Rensing y Grass (2003).

En el caso de los mecanismos de homeostasis de cobre en *E. hirae* (Figura 2) se cree que el Cu (I) es capaz de ingresar mediante una ATPasa de influjo denominada CopA. El cobre que utiliza CopA podría ser generado por la reductasa de cobre extracitoplasmática CorA, la que reduce el cobre de Cu (II) a Cu (I). El cobre que ingresa a la célula puede ser captado por la chaperona de cobre citoplasmática CopZ, que es capaz de unir cobre mediante las cisteínas del sitio MXCXXC. Además de atrapar el cobre, CopZ puede entregarle cobre al represor transcripcional CopY. En condiciones normales de cobre CopY tiene unido un átomo de zinc y se encuentra reprimiendo la transcripción del operón *copYZAB*. Cuando hay exceso de cobre, CopZ reemplaza el zinc de CopY por dos átomos de cobre, lo que genera un cambio conformacional en la proteína que permite su liberación de la región promotora del

operón, iniciando así su transcripción. Además CopZ es capaz de cederle cobre a la ATPasa de eflujo CopB para así eliminar el exceso de cobre celular (Solioz & Stoyanov, 2003). Este mecanismo de homeostasis de cobre está ampliamente distribuido en las bacterias Gram-positivas. Sin embargo, no todos estos microorganismos poseen la proteína CopY. Este regulador se encuentra principalmente en los *Firmicutes*. Otras bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* poseen un operón formado por la chaperona y las ATPasas y que es regulado por CsoR (Smaldone & Helmann, 2007).

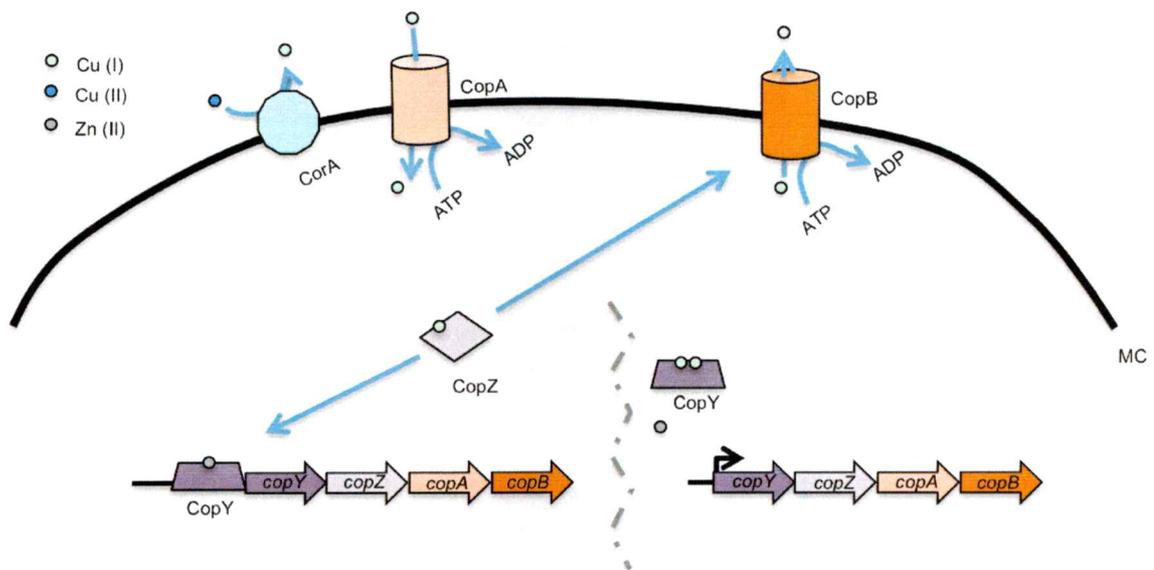


Figura 2. Modelo de la homeostasis de cobre en *E. hirae*. La reductasa extracelular CorA genera Cu (I) que puede ser utilizado por la ATPasa de influjo CopA para ingresar cobre a la célula. El cobre que ingresa es captado por la metalochaperona CopZ, la cual es capaz de entregarle el Cu (I) al represor CopY para que éste se libere de su promotor y permita la transcripción del operón *copYZAB*. En caso de estar en presencia de un exceso de cobre, CopZ puede cederle el metal a la ATPasa de eflujo CopB para eliminar el exceso de cobre. Figura modificada de Solioz y Stoyanov (2003).

A. ferrooxidans ATCC 23270 es considerado un microorganismo modelo y ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de tolerar concentraciones elevadas de una gran variedad de metales. Los mecanismos de resistencia a cobre han sido estudiados en esta bacteria, y al parecer la resistencia al metal es multifactorial, puesto

que estarían involucrados el metabolismo de los polifosfatos, la resistencia al estrés oxidativo y una gran variedad de determinantes de resistencia a cobre (Álvarez & Jerez, 2004; Navarro y col.; 2009; Almárcegui y col., 2014). Dentro de los determinantes de resistencia a cobre se ven involucradas proteínas encargadas del eflujo de este metal, que consisten principalmente en tres P-ATPasas de cobre y un sistema del tipo RND, y otras chaperonas periplasmáticas encargadas de secuestrar el cobre (Navarro y col., 2009). La presencia de estos determinantes de resistencia canónicos, formados por sistemas de eflujo o captura de cobre, no explican completamente la gran resistencia a cobre en este microorganismo, por lo que en nuestro laboratorio se analizó, mediante proteómica cuantitativa ICPL (Isotope Coded Protein Label), la expresión de algunas proteínas que podrían estar involucradas en la resistencia a cobre (Almárcegui y col., 2014). En este estudio se encontró que, a 40 mM de CuSO_4 , *A. ferrooxidans* ATCC 23270 sobre-expresa las proteínas Cus del sistema RND canónico y también otro sistema RND putativo. Además se vió la sobreexpresión de algunas disulfuro isomerasas periplasmáticas y de una gran cantidad de proteínas involucradas en la síntesis de cisteína e histidina. También se vió la disminución de algunas porinas y de algunos transportadores de iones, los que posiblemente están involucrados en el ingreso del cobre. Una de las proteínas que más se sobreexpresó a 40 mM de CuSO_4 fue AFE_1862, que en comparación al control sin cobre, aumentó casi 15 veces su expresión. Esta proteína posee un sitio de unión a cobre del tipo MXCXXC que es característico de muchas metalochaperonas (O'Halloran & Cizewski, 2000), por lo que se propuso que AFE_1862 podría ser una chaperona del tipo CopZ. En esta trabajo se caracterizó inicialmente la proteína codificada por AFE_1862 y se analizó el posible papel que podría cumplir ésta en la resistencia al cobre en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

1.1 Hipótesis

El gen AFE_1862 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 codifica para una chaperona de cobre del tipo CopZ.

1.2 Objetivo general

Estudiar la expresión del gen AFE_1862 y la funcionalidad de la proteína que codifica cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crece en presencia de cobre.

1.3 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar bioinformáticamente la proteína codificada por AFE_1862.
- 2) Determinar la expresión del gen AFE_1862 en células de *A. ferrooxidans* crecidas a concentraciones crecientes de cobre mediante PCR en tiempo real.
- 3) Determinar la funcionalidad de AFE_1862 mediante la expresión heteróloga de la proteína nativa y mutante en una cepa de *E. coli* hipersensible a cobre expuesta a este metal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Métodos bioinformáticos

2.1.1 Análisis de secuencia

Para inferir la funcionalidad de la proteína AFE_1862 (según la anotación de NCBI) se utilizó pblast, herramienta que permite encontrar proteínas con un alto grado de identidad con la proteína entregada, para realizar la búsqueda se utilizó la base de datos de NCBI. Debido a la gran cantidad de proteínas identificadas, se realizó una búsqueda en la base de datos UniProt para utilizar aquellas con una identidad superior al 30% o que estuviesen bien caracterizadas. Se seleccionaron proteínas de los siguientes organismos: *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 (B5ES89), *A. ferrivorans* SS3 (G0JRF6), *A. caldus* SM-1 (F9ZUH0), *Halothiobacillus neapolitanus* ATCC 23641 (D0KZ95), *Thermus thermophilus* HB8 (Q5SHL2), *Pseudomonas stutzeri* DSM 4166 (F2MZE0), *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (Q2FV63), *Enterococcus hirae* ATCC 9790 (Q47840), *Bacillus subtilis* 168 (O32221), *Ferroplasma acidarmanus* fer1 (S0ARH4), *Sulfolobus solfataricus* P2 (Q97UU5), *Saccharomyces cerevisiae* S288c (P38636), *Arabidopsis thaliana* (Q94BT9), *Homo sapiens* (O00244). Entre paréntesis se muestra el código de acceso UniProt de las proteínas utilizadas.

Se descargaron estas secuencias en el programa Geneious v.6.0.5 y se realizó un alineamiento de secuencia con ClustalW para identificar los aminoácidos conservados. También se utilizaron los programas CELLO v.2.5 (Yu y col., 2006), PSORTb v.3 (Yu y col., 2010) y PSLpred (Bhasin y col., 2005) para predecir la ubicación subcelular de AFE_1862 a partir de su secuencia de aminoácidos.

2.1.2 Contexto genómico

Para analizar el contexto genómico de las proteínas estudiadas se utilizó el programa Absynte (Despalins y col., 2011). Este programa permite buscar secuencias de proteínas homólogas a la secuencia entregada y generar un alineamiento de los contextos genómicos de éstas. También se utilizó el programa Geneious para visualizar los genomas.

2.1.3 Modelamiento estructural

Para el modelamiento estructural de la proteína AFE_1862 se utilizó el servidor Swiss-Model (Peitsch, 1995; Arnold y col., 2006; Kiefer y col., 2009) y se utilizó como molde la proteína CopZ de *B. subtilis* cepa 168 (código de acceso en "Protein Data Bank": 1P8G). Para visualizar los modelos obtenidos se utilizó el programa PyMOL.

2.2 Cepas

Se utilizó la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 obtenida desde la colección americana por tipo (ATCC, USA). Para los experimentos de expresión heteróloga se utilizó *E. coli* TOP10 y una cepa de *E. coli* hipersensible a cobre, denominada triple mutante (3mut) debido a que lleva mutaciones en tres sistemas de resistencia a cobre de *E. coli* (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>A. ferrooxidans</i>	ATCC 23270	ATCC
<i>E. coli</i> TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> 3mut	<i>E. coli</i> K12 Δ (<i>cusCFBA-copA-cueO</i>)	Laboratorio ^a
<i>E. coli</i> 3mut /pTrcHis2	Cepa 3mut con el Plasmidio pTrcHis2-TOPO	Este trabajo
<i>E. coli</i> 3mut /AFE_1862	Cepa 3mut con el plasmidio pTrcHis2- TOPO/AFE_1862	Este trabajo
<i>E. coli</i> 3mut /AFE_1862 _{mut}	Cepa 3mut con el plasmidio pTrcHis2- TOPO/AFE_1862 _{mut}	Este trabajo

^a Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

2.3 Plasmidios

Los plasmidios utilizados en este trabajo derivan del vector pTrcHis2-TOPO (Invitrogen) y se enlistan en la Tabla 2. Las principales características de este vector son que posee en sus extremos una timina desapareada y que tiene adherida la enzima topoisomerasa, por lo que se puede clonar directamente un fragmento de DNA amplificado por PCR. Para que la topoisomerasa pueda ligar el fragmento al vector, es necesario hacer la reacción de PCR con la polimerasa *Taq*, ya que esta enzima deja en ambos extremos del fragmento amplificado, una adenina libre que puede aparearse con la timina presente en el vector.

El plasmidio pTrcHis2-TOPO contiene la secuencia *lacO* y el represor Lac, por lo que se puede inducir la expresión del gen clonado agregando IPTG.

Tabla 2. Plasmidios usados en este trabajo

Plasmidio	Características	Referencia
pTrcHis2-TOPO	pBR322 ori, P _{trc} , <i>lacI</i> ^q / <i>lacO</i> , <i>bla</i> (Amp ^r)	Invitrogen
pTrcHis2-TOPO/ AFE_1862	pBR322 ori, P _{trc} , <i>lacI</i> ^q / <i>lacO</i> , <i>bla</i> (Amp ^r), AFE_1862	Este trabajo
pTrcHis2-TOPO/ AFE_1862 _{mut}	pBR322 ori, P _{trc} , <i>lacI</i> ^q / <i>lacO</i> , <i>bla</i> (Amp ^r), AFE_1862 _{mut} (C13S, C16S)	Este trabajo

2.4 Condiciones de cultivo

Para el crecimiento de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se utilizó medio 9K modificado (0,1 g/l de (NH₄)₂SO₄; 0,4 g/l de MgSO₄ x 7H₂O; 0,04 g/l de K₂HPO₄ x 3H₂O y 33,33 g/l de FeSO₄ x 7H₂O) que contiene hierro como fuente de energía. Se ajustó el pH a 1,5 agregando H₂SO₄ concentrado. El medio se esterilizó en autoclave (121 °C por 20 min). Se ocuparon tres condiciones de cultivo:

- 1) En ausencia de cobre: Células crecidas en medio 9K modificado.

- 2) En presencia de cobre: Se utilizó como inóculo células que nunca fueron expuestas a cobre y se inocularon en medio 9K con concentraciones de 10 ó 20 mM de CuSO_4 .
- 3) Adaptadas a cobre: Se utilizó un inóculo de células que no han sido expuestas a cobre y se realizaron subcultivos sucesivos en los que la concentración de CuSO_4 fue en aumento. Una vez que se alcanzó la concentración deseada (40 mM de CuSO_4) se realizaron tres subcultivos sucesivos a esa concentración.

En todos los casos se utilizó una solución 1 M de CuSO_4 filtrada (Millex GV 0,22 μm , Durapore) para obtener medios de cultivo con las distintas concentraciones de cobre y las células se crecieron a 30 °C con una agitación rotatoria de 150 rpm. Una vez alcanzada la fase exponencial tardía de crecimiento, las células se colectaron y se lavaron para utilizarlas en los distintos experimentos. El crecimiento celular se determinó mediante el recuento celular en microscopio óptico utilizando una cámara de Petroff-Hausser.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó medio LB: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl. Para determinar la concentración inhibitoria mínima (MIC) de las distintas cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo, se utilizó una solución de CuSO_4 500 mM filtrada (Millex GV 0,22 μm , Durapore) para realizar diluciones con concentraciones de 0 a 2 mM en intervalos de 0,25 mM. Se crecieron las células a 37 °C con agitación rotatoria (120 rpm) de 5 ml y se determinó el crecimiento celular midiendo la OD_{600} en un espectrofotómetro Thermo Spectronic (Thermo, USA). Para el crecimiento en medio sólido, se cultivó *E. coli* en placas LB con agar al 1,5%. Como marcador de selección en los ensayos de clonación se utilizó ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Para los ensayos de funcionalidad se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM.

2.5 Técnicas de biología molecular

2.5.1 Extracción de DNA genómico

Se creció un cultivo de 200 ml de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 hasta la fase exponencial tardía (\approx 4 días), momento en el que se colectaron las células por centrifugación a 5.000 x g durante 15 min. Con el fin de extraer el medio remanente y el Fe^{3+} que queda en las células, éstas se lavaron dos veces con 700 μl de una solución de agua ácida (H_2SO_4 , pH = 1,5) y dos veces con 700 μl de una solución de citrato de sodio 10 mM (pH 7). Luego se utilizó el kit de extracción de DNA "Wizard[®] DNA Purification Kit" (Promega, USA) siguiendo las recomendaciones para bacterias Gram-negativas.

2.5.2 Extracción de RNA total

Para la extracción de RNA total se usaron células de *A. ferrooxidans* en fase exponencial tardía de crecimiento. Las células se colectaron por centrifugación a 5.000 x g durante 15 min, luego se realizaron dos lavados con agua ácida (H_2SO_4 , pH = 1,5) y dos lavados con citrato de sodio 10 mM (pH 7). Se utilizaron entre 10 y 20 mg de células (peso húmedo), se resuspendieron en 200 μl de una solución de lisis celular (acetato de sodio 0,02 M; pH 5,5; SDS 0,5%; EDTA 1 mM) y se incubaron a 70 °C por 5 min. Desde este punto se comenzó a trabajar en hielo para que las muestras se mantengan a una temperatura aproximada de 4 °C. A cada suspensión celular se le agregó 1 ml de TRIzol (Invitrogen) y se mezcló por inversión. Se incubó 5 min a 70 °C. Inmediatamente se agregaron 200 μl de cloroformo y se homogenizó con agitación en vortex. Después se centrifugó a 10.000 x g por 10 min a 4 °C y se recuperó la fase superior acuosa. Se precipitó el RNA de la fase acuosa agregando un volumen de isopropanol 100% y se incubó a temperatura ambiente por 10 min, seguido de

centrifugación a 13.000 x g durante 10 min a 4 °C. El pellet obtenido se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.

Para evitar una posible contaminación de la muestra con DNA, se trató la solución con 4U de DNasa libre de RNasa "TURBO DNA-Free" (Ambion) durante 60 min a 37 °C. Se usó un volumen final de 100 µl, que contenían 10 µl de RNA (Concentración máxima de 200 ng/µl), 10 µl de Buffer DNA-free (Ambion) y 80 µl de agua libre de nucleasas. Luego se agregaron 10 µl de Buffer "DNase inactivation" (Ambion) y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 10.000 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperaron aproximadamente 100 µl de la fase acuosa y se precipitó el RNA contenido en ésta con 2,5 volúmenes de etanol al 100% y 1/10 volumen de acetato de sodio 3 M durante toda la noche. Para mejorar la precipitación, se centrifugó a 15.600 x g por 30 min a 4 °C. Luego se lavó dos veces el pellet obtenido con 700 µl de etanol 70% y finalmente se resuspendió el pellet en 20 µl de agua libre de nucleasas.

2.5.3 Cuantificación de DNA y RNA

La cuantificación del DNA genómico y del RNA total obtenidos, se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un espectrofotómetro de multi-volúmenes Epoch (Biotek, USA). La pureza de las muestras se determinó mediante la relación A_{260}/A_{280} .

En el caso del DNA, la medición se realizó utilizando una dilución de 50 veces del DNA obtenido y se consideró la relación $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$. Sólo se utilizaron muestras que tuviesen una razón $A_{260}/A_{280} > 1,8$. De esta forma, se usan preparaciones que tienen una menor cantidad de proteínas. La cuantificación del RNA se realizó en dos oportunidades, antes de realizar los tratamientos con DNasa y antes de la

transcripción inversa. Se consideró la relación $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$ y se usaron preparaciones con una razón $A_{260}/A_{280} > 1,6$ (Wilfinger y col., 1997).

2.5.4 Electroforesis de DNA y RNA en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa se utilizó para comprobar la calidad del DNA genómico y del RNA total. La integridad del RNA se comprobó antes y después del tratamiento con DNasa. También se usó para verificar los tamaños de los fragmentos obtenidos por PCR, de los plasmidios y de los productos de las digestiones enzimáticas. Se prepararon geles de agarosa al 1% en TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato pH 8; 0,5 mM EDTA). Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25% de bromofenol, 50% glicerol, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM pH = 7,6) y se utilizó GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) para teñir los geles. La electroforesis se realizó a 100 V entre 15 y 30 min dependiendo del análisis realizado. Para visualizar los geles se utilizó luz ultravioleta de 320 nm.

2.5.5 Purificación de plasmidios y de fragmentos obtenidos por PCR

Para la purificación de plasmidios se utilizó el kit "E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit I" (Omega Bio-Tek). La purificación se realizó según el protocolo sugerido por el fabricante, pero se hizo una variación en la cual las células utilizadas para purificar el plasmidio se crecieron en placas de LB-agar a 37 °C por 16 h y no en medio líquido como sugiere el protocolo del fabricante.

Los fragmentos obtenidos por PCR se purificaron utilizando el kit "E.Z.N.A. Gel Extraction Kit" (Omega Bio-Tek). Para esto se debe realizar una electroforesis en gel de agarosa y se debe cortar la banda que contenga el producto de PCR. Luego se siguieron las indicaciones del fabricante. Los fragmentos se eluyen con agua tibia libre

de nucleasas para mejorar el rendimiento, seguido de la cuantificación como se indica en la sección 2.5.3 y finalmente se conservan a -20 °C.

2.5.6 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar el gen AFE_1862 desde DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, para realizar reacciones de PCR en tiempo real y para generar un mutante del sitio de unión a cobre de la proteína codificada por AFE_1862 (Tabla 3).

Tabla 3. Partidores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Uso
16S rRNA fw	TGGTGCCTACGTA CTGAGTG	q-PCR
16S rRNA rv	CCGAAGGGCACTTCCGCA	q-PCR
q-1862 fw	GAAGGCATACCTGGTGTGGAA	q-PCR
q-1862 rv	CGCTCTGTGACTTTTTGCACT	q-PCR
c-1862 fw	ATGAGCGATATCAGATTGAAGATCACC	Clonación
c-1862 rv	CTACGATCCGCTCTGTGACT	Clonación
m-1862 C13/16S fw	ATGACCAGCGGACACAGCGTGCGGGCCGTGACCAA GGCG	Mutagénesis
m-1862 C13/16S rv	GCTGTGTCCGCTGGTCATGCCGGTGATCTTCAATCT GATATCGCT	Mutagénesis
m-1862 fw	GTGCGGGCCGTGACCAAGGCG	Mutagénesis
m-1862 rv	GCCGGTGATCTTCAATCTGATATCGCT	Mutagénesis

Para diseñar los oligonucleótidos se utilizó el programa Geneious v.6.0.5 que contiene una herramienta basada en el programa Primer3 y se usó la secuencia anotada del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 descargada en el mismo programa. Los oligonucleótidos se sintetizaron por la empresa IDT (Integrated DNA Technologies, www.idtdna.com). En general se seleccionaron partidores de entre 18 a 20 pb, que generen estructuras secundarias débiles, con una Tm no menor a 50 °C y que permitan obtener un amplificado de entre 100 a 250 pb para el PCR en tiempo real

y el gen completo para el Clonación de AFE_1862. El diseño de los partidores para generar el mutante se explicará en la sección 2.5.12.

2.5.7 Reacciones de PCR

Para amplificar el gen AFE_1862 se realizaron reacciones de 50 μ l en las que se utilizaron, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de cada pareja de partidores 10 μ M, 5 μ l de buffer 10X, 0,5 U de *Taq* DNA polimerasa (New England Biolabs) y se utilizó DNA genómico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 como molde. El programa utilizado para la amplificación se inició con 3 min a 94 °C para una desnaturalización inicial, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C, 45 s a 68 °C y se finalizó con una extensión final de 10 min a 68 °C.

Para descartar la contaminación con DNA genómico en la síntesis de cDNA (ver sección 2.5.8) se amplificó mediante PCR un fragmento del gen rRNA 16S usando como molde la mezcla del RT-PCR obtenido con y sin la enzima transcriptasa reversa. Se buscó la presencia del fragmento sólo en la mezcla obtenida obtenido con la enzima. Se usó una dilución de 1/10 del cDNA obtenido y se usó un programa idéntico al anterior, cambiando sólo el número de ciclos (40 en lugar de 30).

2.5.8 Transcripción reversa

Con el RNA obtenido para cada condición estudiada, se realizó una reacción de transcripción reversa (RT-PCR) para obtener cDNA. Para esto, se ocuparon 0,8 μ g de RNA y 0,5 μ g de "random primers" (hexadesoxinucleotidos al azar) de la empresa Promega. Inicialmente se incubó una mezcla de 5 μ l de RNA y partidores a 70 °C durante 5 min con el fin de desnaturalizar las estructuras secundarias del RNA, facilitando así la hibridización de los partidores. Luego se incubó durante 5 min en hielo y se agregaron 15 μ l de una mezcla de amortiguador ImProm-II 5X (Promega), 0,5 mM

dNTPs, 3 mM de MgCl₂ y 1 U de la enzima transcriptasa reversa ImProm-II (Promega). El programa utilizado comenzó con una incubación a 25 °C por 10 min para promover la unión de los partidores y luego la síntesis se realizó por 1 h a 42 °C. Luego se dejó durante 15 min a 70 °C para que la enzima transcriptasa reversa se desnaturalizara.

2.5.9 Reacciones de PCR en tiempo real

Se utilizó la técnica de qRT-PCR para cuantificar la expresión del gen AFE_1862 cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 es crecida en presencia de distintas concentraciones de cobre. Para esto se utilizó el equipo Corbett rotor gene 6000 (Corbett Research) y tubos de 0,2 ml del tipo "PCR tubes" (Qiagen). El volumen final de cada reacción fue de 15 µl y se utilizó 1 µl de cDNA. En el caso del gen AFE_1862 se usó una dilución de 1:20 y para la medición del rRNA 16S la dilución usada fue de 1:200. Además se agregaron los partidores para alcanzar una concentración de 1 µM cada uno y 7,5 µl de "master mix" Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen). El programa utilizado fue el siguiente: una desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C, 30 ciclos con 15 s a 95 °C, 30 s a 60°C para la hibridización de los partidores y la síntesis del fragmento.

2.5.10 Cuantificación por PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real permite cuantificar la expresión relativa de genes. En este caso se cuantificó la expresión del gen AFE_1862 en tres réplicas biológicas. Este método se basa en la relación existente entre la fluorescencia de distintas reacciones de PCR. Para esto se usa el fluoróforo SYBR GREEN, el cual se intercala en las moléculas de DNA de doble hebra (dsDNA), de tal forma que a medida que la reacción de PCR avanza, irá aumentando la cantidad de dsDNA y por lo tanto también lo hará la fluorescencia. El equipo de PCR en tiempo real es capaz de detectar el ciclo en el cual

la fluorescencia de una reacción sobrepasa el nivel umbral. Este ciclo se llama "cycle threshold" ó CT, y este es el valor que se utilizó en los cálculos posteriores.

Se utilizó el método de cuantificación relativo para la cuantificación de transcritos, el cual se basa en la razón de los transcritos de una muestra de estudio versus una muestra control (Pfaffl, 2001). En este caso se cuantificó la cantidad de transcritos de una muestra crecida en presencia de cobre contra una muestra crecida sin cobre. Para realizar estos cálculos es necesario utilizar un gen normalizador y se utilizó el gen del rRNA 16S.

La expresión relativa de un gen de la muestra de estudio sobre la muestra control se calcula de la siguiente forma:

$$\text{Inducción} = \frac{(E_G)^{\Delta CT_G(\text{control-cobre})}}{(E_R)^{\Delta CT_R(\text{control-cobre})}}$$

En donde E_G es la eficiencia del qPCR para el gen a estudiar, E_R es la eficiencia del qPCR para el gen referencia o normalizador, ΔCT_G es la diferencia entre el CT del control y la muestra para el gen a estudiar y ΔCT_R es la diferencia entre el CT del control y la muestra para el gen referencia.

Para medir la eficiencia de los partidores (E) se realizaron cinco diluciones seriadas desde 10 ng hasta 1pg de DNA genómico de *A. ferrooxidans*, las que se utilizaron para generar una curva de calibración (concentración vs CT) de pendiente "m". Se consideró que una eficiencia óptima se encuentra en rectas con pendientes que oscilan entre -3,743 y -3,322, lo que significa una eficiencia de un 85-100%, respectivamente. La eficiencia se calculó de la siguiente forma: $E = 10^{-1/m}$

Como la eficiencia obtenida fue cercana a 95%, se supuso una eficiencia de 100% para simplificar los cálculos, por lo que $E = 2$ lo que significa que la fórmula queda de la siguiente forma:

$$\text{Inducción} = \frac{2^{\Delta CT_G(\text{control-cobre})}}{2^{\Delta CT_R(\text{control-cobre})}} = 2^{\Delta CT_G - \Delta CT_R} = 2^{\Delta \Delta CT}$$

2.5.11 Clonación de AFE_1862 en el vector pTrcHis2-TOPO

Se mezclaron 0,5 µl del vector pTrcHis2-TOPO (5 ng de DNA), 1 µl del inserto AFE_1862 amplificado por PCR (10-20 ng de DNA) y se completó con agua libre de nucleasas para llegar a 5 µl. Se agitó suavemente y se incubó por 5 min a temperatura ambiente (25 °C aproximadamente). Inmediatamente se utilizó la mezcla para realizar la transformación de *E. coli* 3mut quimiocompetente (ver sección 2.5.13).

2.5.12 Mutagénesis sitio-dirigida

Para generar las mutaciones Cys13Ser y Cys16Ser en el posible sitio de unión a metales de AFE_1862, se utilizó la técnica de SLIM (Site-directed, Ligase-Independent Mutagenesis) (Chiu y col., 2004), la cual permite realizar las mutaciones sitio dirigidas mediante PCR. Para realizar esta técnica se deben diseñar cuatro partidores, dos de los cuales llevan la mutación, para amplificar el plasmidio en el que debe estar clonado el gen que se desea mutar. Se utilizaron los siguientes partidores: m-1862 C13/16S fw ATGACCAGCGGACACAGC-GTGCGGGCCGTGACCAAGGCG, m-1862 fw GTGCGGGCCGTGACCAAGGCG, m-1862 C13/16S rv GCTGTGTCCGCTGGTCATGCCGGTGATCTTCAATCTGATAT-CGCT y m-1862 rv GCCGGTGATCTTCAATCTGATATCGCT. Las secuencias subrayadas en los partidores se denominan secuencias adaptadoras, son estas las que llevan la mutación deseada (en negrita se muestran los nucleótidos modificados) y son las que permitirán la recircularización del vector al transformar los productos obtenidos por PCR en *E. coli*. Se realizó una pequeña modificación al protocolo de Chiu y col., (2004), en la cual, para amplificar el vector, sólo se utilizó la enzima PfuUltra™II (Agilent) en lugar de la

polimerasa Platinum *Pfx* (Invitrogen) y además los productos obtenidos se transformaron por electroporación (ver sección 2.5.13) en *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Luego se seleccionaron algunos clones transformantes y se purificó el vector para confirmar la mutación mediante secuenciación. Finalmente, se transformó el vector mutante en *E. coli* 3mut quimiocompetente (ver sección 2.5.13), para luego realizar los ensayos de funcionalidad.

2.5.13 Transformación de *E. coli*

Luego de haber clonado el gen AFE_1862 en el vector pTrcHis2-TOPO como se indica en la sección 2.5.11, se utilizó este producto para transformar mediante “shock” térmico células quimiocompetentes de *E. coli* 3mut, obtenidas mediante tratamiento con CaCl₂. Para esto se mezclaron 50 µl de células y 5 µl del producto de la clonación. La mezcla se incubó por 20 min en hielo. Luego se realizó el “shock” térmico a 42 °C por 45 s e inmediatamente se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregaron 900 µl de medio LB y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación rotatoria. Luego se centrifugó por 2 min a 4.500 x g y se descartó parte del líquido, dejando aproximadamente 80 µl. Se resuspendió el pellet en el líquido remanente y se utilizó para sembrar en medios sólidos de LB-agar suplementados con ampicilina.

La transformación de *E. coli* TOP10 con los productos de PCR obtenidos por SLIM se realizó mediante electroporación. Para obtener las células electrocompetentes se crecieron 60 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento (DO₆₀₀ ≈ 0,6) y se colectaron las células mediante centrifugación a 3.000 x g durante 12 min a 4 °C. Luego se realizaron tres lavados con 30 ml de glicerol al 10% estéril, centrifugando siempre de la misma manera. Finalmente se resuspendieron las células en 1,5 ml de glicerol al 10% estéril. Una vez obtenidas las células electrocompetentes se mezcló el

producto de PCR obtenido en la mutagénesis con 100 µl de células electrocompetentes y se utilizó el electroporador "BIORAD" para realizar la transformación. Estas células se crecieron en 900 µl de medio LB durante 1 h a 37°C con agitación rotatoria, para luego sembrar en medio sólido de la misma manera que se mencionó anteriormente. Luego se purificó el vector mutante desde las colonias transformantes y se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* 3mut mediante "shock" térmico como se mencionó anteriormente.

2.5.14 Análisis de colonias transformantes

Para verificar la obtención de la cepa deseada, se realizaron diferentes ensayos. Inicialmente se seleccionaron distintos clones transformantes y se sembraron formando parches de alrededor de 1 cm² en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina. Luego se realizó una revisión de estos parches. Para esto, se resuspendió una sección del parche en 40 µl de solución "One-Step" (sacarosa 0,18 M; Tris-HCl 3,2 mM, pH 7; azul de bromofenol, pH 7) y 15 µl de fenol-cloroformo básico. Se agitó en vortex por 15 s y luego se centrifugó por 2 min a máxima velocidad. Finalmente se cargaron 15 µl del sobrenadante en un gel de agarosa al 1% y se verificó el tamaño de los plasmidios obtenidos mediante electroforesis. De esta manera se diferenció entre plasmidios que tenían o no el inserto puesto que migran de manera diferencial.

En el caso de la obtención del plasmidio con el gen mutante, este paso es suficiente, puesto que sólo crecen los clones que hayan recircularizado el vector correctamente. Las células que no lo hacen, no pueden crecer en ampicilina. En el caso de los clones que se obtuvieron mediante la transformación con el producto de la clonación del gen AFE_1862 con el vector pTrcHis2-TOPO, es necesario comprobar la orientación del inserto. Para esto se eligieron los clones que tenían el plasmidio del

tamaño esperado y se purificó el vector como se menciona en la sección 2.5.5 para realizar una digestión enzimática del vector y así poder verificar la orientación del inserto. Se eligió la enzima *EcoRV* puesto que presenta un único sitio de corte tanto en el vector como en la secuencia del gen. Esto permitió que un vector con el inserto orientado correctamente (5'-3') libere un fragmento de un tamaño distinto al de un vector con el inserto mal orientado (3'-5'). Para realizar la digestión, se mezclaron 5 μ l del vector purificado, 1,5 μ l de la enzima *EcoRV* (Fermentas), 2 μ l de buffer R⁺ y agua libre de nucleasas hasta completar 20 μ l. La mezcla se incubó por 2 h a 37 °C y luego se verificó el resultado de la digestión mediante electroforesis como se indica en 2.5.4.

2.6 Evaluación de la concentración inhibitoria mínima de cobre para algunas cepas de *E. coli*

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (MIC, por sus siglas en inglés) para las tres cepas desarrolladas en este trabajo. Inicialmente se crecieron cultivos, en medio LB líquido, de estas cepas durante toda la noche para ser usados como pre-inóculos. Luego, una alícuota de estos cultivos se inoculó 1 mL de medio LB suplementado con una solución de CuSO₄ estéril (de 0 a 2 mM), ampicilina (100 μ g/ml) e IPTG (1 mM). Posteriormente se incubó por 16 h a 37 °C con agitación rotatoria de 120 rpm. Se usaron tubos Falcon-BD de 5 ml para el crecimiento y en estos mismos se realizó la medición de la OD₆₀₀. La MIC se consideró como aquella concentración de CuSO₄ capaz de inhibir el crecimiento celular en un 50% en relación a la OD₆₀₀ de la cepa crecida en ausencia de CuSO₄. Este procedimiento se realizó con tres réplicas biológicas.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización bioinformática de AFE_1862

Para comprender la función de la proteína AFE_1862 es necesario realizar una caracterización de ésta. Comparando la secuencia de AFE_1862 con la de otras proteínas homólogas, bien caracterizadas experimentalmente, hemos podido inferir la funcionalidad de AFE_1862.

3.1.1 Análisis de secuencia

Al realizar una búsqueda mediante pblast se pudieron identificar muchas proteínas con alto grado de identidad (> 30%) con AFE_1862 en una gran variedad de organismos presentes en los tres dominios de la vida (Tabla 4). La gran mayoría de éstas se encuentran anotadas como “proteína de transporte/desintoxicación de metales pesados”, “proteína de unión a metales pesados” o incluso algunas están como “chaperona de cobre”. Gran parte de las proteínas identificadas son pequeñas (de 60 a 80 aminoácidos) y presentan un dominio HMA (Hheavy Metal Associated). Este es un dominio muy conservado (Pfam00403) de aproximadamente unos 30 residuos de aminoácidos y que posee dos cisteínas involucradas en la unión de metales. Está presente en ATPasas y chaperonas involucradas en el transporte ó desintoxicación de metales como cobre, cadmio y zinc (Jordan y col., 2001; Arnesano y col., 2002).

Tabla 4. Lista de proteínas homólogas a AFE_1862

Organismo	Descripción proteína	Largo secuencia	Identidad
<i>A. ferrooxidans</i>	Proteína de transporte/desintoxicación de metales pesados	74 aa	100%
<i>A. ferrivorans</i>	Proteína de transporte/desintoxicación de metales pesados	68 aa	76,7%
<i>A. caldus</i>	Proteína de transporte/desintoxicación de metales pesados	68 aa	74,0%
<i>H. neapolitanus</i>	Proteína de transporte/desintoxicación de metales pesados	68 aa	57,4%
<i>T. thermophilus</i>	Proteína de unión a metales pesados	66 aa	56,1%
<i>P. stutzeri</i>	Proteína de unión a cobre putativa	87 aa	45,9%
<i>S. aureus</i>	Chaperona de cobre CopZ	68 aa	38,2%
<i>E. hirae</i>	Chaperona de cobre CopZ	69 aa	31,9%
<i>B. subtilis</i>	Chaperona de cobre CopZ	69 aa	30,4%
<i>F. acidarmanus</i>	Chaperona de cobre	76 aa	32,0%
<i>S. solfataricus</i>	Proteína de unión a cobre	82 aa	25,3%
<i>S. cerevisiae</i>	Factor de homeostasis de metales ATX1	73 aa	25,0%
<i>A. thaliana</i>	Proteína de transporte de cobre ATX1	106 aa	24,3%
<i>H. sapiens</i>	Proteína de transporte de cobre ATOX1	68 aa	23,0%

También se encontró que AFE_1862 presentaba una gran identidad con algunas ATPasas relacionadas con el eflujo de metales pesados, específicamente con una sección del sitio N-terminal de dichas proteínas. Se encontró que AFE_1862 presenta un 34% de identidad con una de las tres ATPasas de cobre conocidas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, específicamente con la ATPasa CopB_{Af} (AFE_2021).

De todas las proteínas identificadas, sólo cuatro están bien caracterizadas. Éstas corresponden a CopZ en las bacterias gram-positivas *E. hirae* y *B. subtilis*, ATX1 en la levadura *S. cerevisiae* y ATOX1 en *H. sapiens* (Boal & Rosenzweig, 2009). Estas cuatro proteínas cumplen la función de chaperonas de cobre capaces de capturar este metal y de traspasarlo a una P-ATPasa (O'Halloran & Cizewski, 2000; Singleton & Le Brun, 2007), función en donde participa un sitio de unión a metales del tipo MXCXXC capaz de unir cobre.

Al realizar un alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de estas proteínas y AFE_1862 se pudo identificar que en esta última hay varios residuos conservados (Figura 3), especialmente los aminoácidos del sitio de unión a metales y una gran cantidad de residuos hidrofóbicos. Estos residuos se encuentran muy conservados en varias metalochaperonas del tipo CopZ/Atx1 (Arnesano y col., 2002). Además, se puede ver que hay pequeñas diferencias entre las chaperonas de procariontes y eucariontes. En los procariontes estas chaperonas tienen un potencial electrostático de superficie negativo y hay ciertos residuos negativos muy conservados. Estos dos aspectos son esenciales para estabilizar la interacción entre la chaperona y la ATPasa. Sin embargo, en eucariontes el potencial electrostático de superficie es positivo y hay una serie de lisinas que estabilizan la interacción. En ambos casos, el potencial electrostático de superficie de la ATPasa es opuesto al de la chaperona, lo que favorece la interacción proteína-proteína.



Figura 3. Alineamiento múltiple entre AFE_1862 y las chaperonas de cobre más caracterizadas. El rectángulo rojo muestra el sitio de unión a cobre MXCXXC. En azul se ven las cisteínas que unen el cobre, en verde los aminoácidos hidrofóbicos conservados, en amarillo residuos positivos clave y en rojo residuos negativos clave. En la fila 1 se muestra la secuencia aminoacídica de la chaperona de *A. ferrooxidans*, en la 2 la de *E. hirae*, en la 3 la de *B. subtilis*, en la 4 la de *S. cerevisiae* y en la 5 la de *H. sapiens*.

Los resultados de la predicción de la ubicación subcelular de AFE_1862 indican que esta proteína podría encontrarse en el citoplasma. Los programas PSLpred y CELLO v.2.5 predicen que AFE_1862 sería una proteína citoplasmática. El programa PSORTb v.3.0.2 no predice ninguna ubicación subcelular, sin embargo al usar una versión anterior (v.2.0.4) de este programa la predicción fue que la proteína se ubicaba en el citoplasma.

3.1.2 Contexto genómico

Utilizando el programa Absynte se pudo estudiar el contexto genómico de AFE_1862 y de otros genes ortólogos (Figura 4). Se observa que en las cepas ATCC 23270 y ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* el gen de la posible chaperona de cobre no se encuentra formando parte de ningún operón y no está cercano a otros determinantes de resistencia a cobre conocidos. Sin embargo, en las bacterias *E. hirae* y *B. subtilis*, la chaperona CopZ se encuentra formando parte de un operón en conjunto a un regulador transcripcional y dos ATPasas de cobre (Solioz & Stoyanov, 2003; Smaldone & Helmann, 2007). En otras especies del género *Acidithiobacillus*, los genes ortólogos a AFE_1862 no son parte de un operón como el de *E. hirae*, pero se encuentran cercanos a una ATPasa de eflujo de metales (Figura 4).

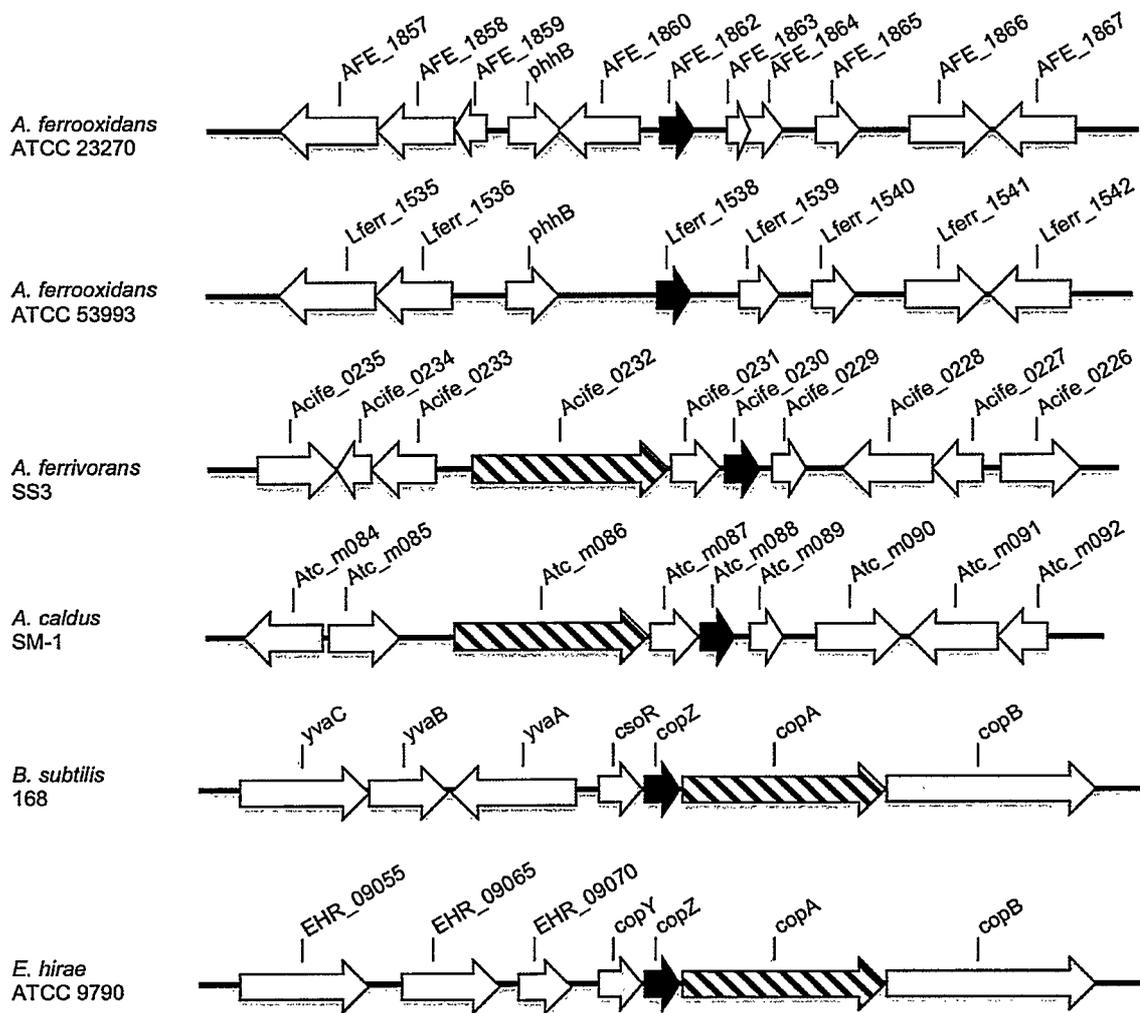


Figura 4. Contexto genómico de AFE_1862 y algunos de los genes ortólogos identificados. En negro se muestran los genes que codifican para chaperonas tipo CopZ, los genes achurados corresponden a P-ATPases asociadas a las chaperonas y en gris otros genes relacionados con cobre u otros metales.

3.1.3 Modelamiento estructural

Para realizar el modelo estructural de AFE_1862 y del mutante propuesto (C13S/C16S) (Figura 5), se utilizó como moldela estructura de la chaperona CopZ de *B. subtilis* 168 resuelta por resonancia magnética nuclear (Banci y col., 2003) (apo-CopZ_{Bs}; Código PDB: 1P8G). La secuencia aminoacídica de ésta posee un 30% de identidad con la de AFE_1862.

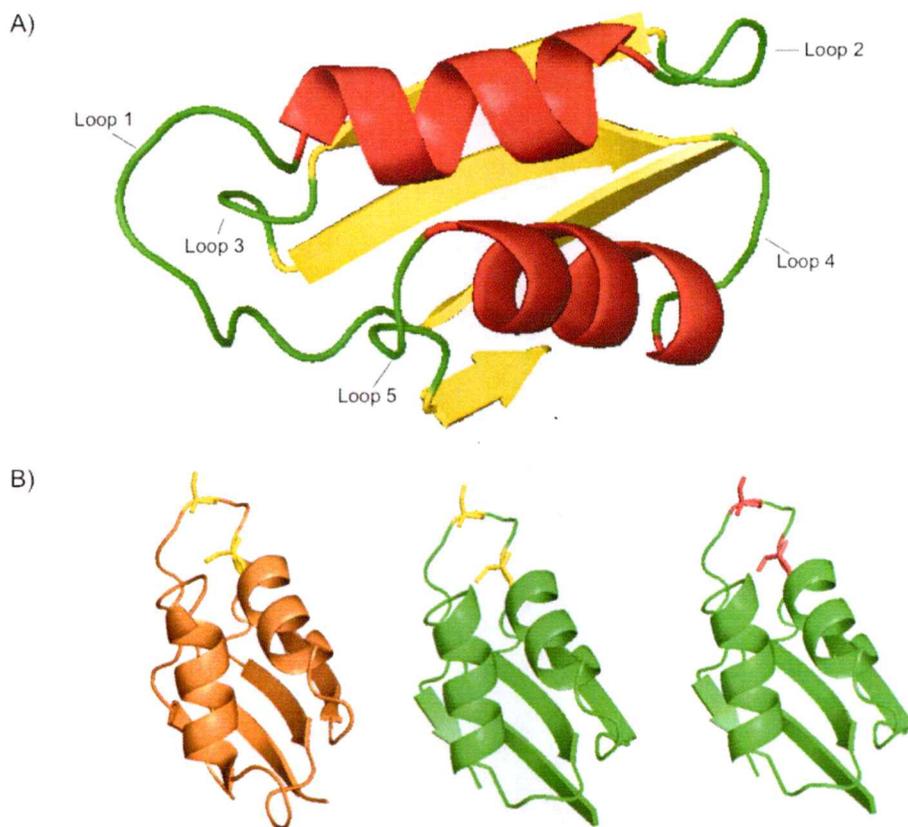


Figura 5. Modelo estructural de AFE_1862 a partir de la estructura de CopZ de *B. subtilis*. A) Modelo estructural coloreado según la estructura secundaria (hélice- α en rojo y sábana- β en amarillo). B) De izquierda a derecha: estructura terciaria de CopZ_{Bs} y de AFE_1862, nativa y mutante (cisteína: amarillo; serina: rojo).

En el modelo se observa que AFE_1862 posee una conformación estructural muy similar a la de CopZ_{Bs} y que en su estructura secundaria posee un plegamiento tipo ferredoxina ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) que es característico de este tipo de chaperonas (Arnesano y col., 2002). También se puede observar que, al igual que en la chaperona CopZ_{Bs}, el modelo de la proteína nativa y mutante poseen los residuos del sitio de unión a cobre expuestos entre el loop 1 y la primera α -hélice.

3.2 Estudio de la expresión del gen AFE_1862 en presencia de cobre

Mediante proteómica cuantitativa encontramos que la proteína codificada por AFE_1862 se sobreexpresa en células crecidas en presencia de cobre (Almárcegui y col., 2014). Para confirmar que la expresión de este gen también se regula a nivel transcripcional, se analizó mediante PCR en tiempo real la expresión relativa de AFE_1862 en células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en tres condiciones distintas: la primera en presencia de 10 mM de CuSO₄, la segunda en presencia de 20 mM de CuSO₄ y la tercera en células adaptadas a 40 mM de CuSO₄. En este último caso, es necesario adaptar las células, es decir, hay que realizar pasos intermedios de crecimiento a concentraciones más bajas antes de llegar a 40 mM puesto que no pueden crecer inmediatamente en esa concentración de cobre. Se eligieron estas concentraciones del metal en base a los estudios proteómicos previos (Almárcegui y col., 2014) que mostraron cambios notorios en estas condiciones. La condición control para realizar la comparación, fue la cantidad de transcrito de AFE_1862 presente en células crecidas en ausencia de cobre. En la Figura 6 se puede observar que hay una inducción de AFE_1862 en las tres condiciones ensayadas, sin embargo, ésta es mayor a las concentraciones más elevadas. En nuestro laboratorio se determinó la expresión de AFE_1862 mediante proteómica cuantitativa ICPL a 40 mM de CuSO₄ (Almárcegui y col. 2014) y se observó que es una de las proteínas que más se induce

en éstas condiciones. Los resultados transcripcionales obtenidos en esta tesis confirman lo obtenido anteriormente a nivel de la síntesis de la proteína.

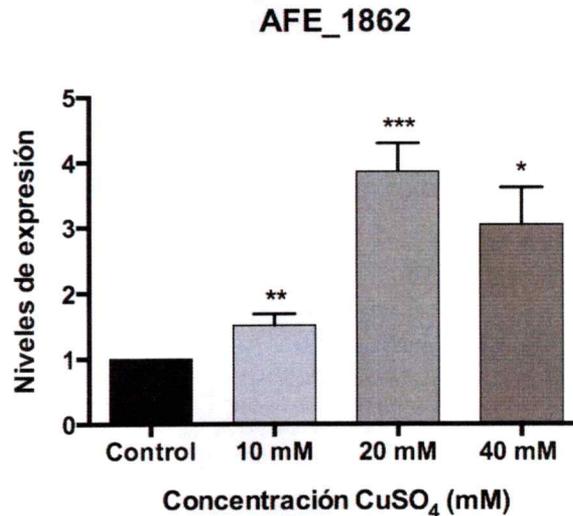


Figura 6. Niveles de expresión transcripcional del gen AFE_1862 en células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecidas en presencia de cobre. La expresión se midió en relación al control del experimento que corresponde a células crecidas en ausencia de cobre. Los valores se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas y las barras de error muestran la desviación estándar. Se realizó la prueba estadística t-Student donde; *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$ y * indica $p \leq 0,05$.

3.3 Clonación de AFE_1862 y generación del mutante en el sitio de unión a cobre

Como en la actualidad no existen métodos eficientes para transformar *A. ferrooxidans*, una forma de estudiar la función de las proteínas de este microorganismo es mediante expresión heteróloga en *E. coli*. Para ello, es necesario amplificar el gen AFE_1862 desde gDNA de *A. ferrooxidans* para luego clonarlo en un vector de expresión apto para *E. coli* y realizar los ensayos de funcionalidad pertinentes para estudiar la posible función de esta proteína.

3.3.1 Clonación de AFE_1862 en pTrcHis2-TOPO

Una vez obtenido el producto de la ligación entre pTrcHis2-TOPO y el fragmento de AFE_1862 amplificado por PCR, se transformó este producto en *E. coli* 3mut. Para seleccionar aquellas colonias que tengan el plasmidio deseado, con AFE_1862 orientado 5'-3', se purificaron los plasmidios de seis clones distintos y se utilizaron para realizar una digestión con la enzima *EcoRV* (Figura 7). Tanto el vector como el fragmento presentan un único sitio de corte para *EcoRV* por lo que se esperaba que al cortar con la enzima se liberaran dos fragmentos. Como el sitio de corte en el gen de la chaperona se encuentra en los primeros 20 nucleótidos, se esperaba una diferencia cercana a los 200 pb (el largo de AFE_1862 es de 225 pb) entre el fragmento liberado por una secuencia correcta ó incorrectamente orientada. En la Figura 7 se puede ver que los clones 2, 3 y 6 poseen el vector pero no tienen ningún fragmento, puesto que de haber tenido el fragmento, al realizar la digestión se hubiesen generado dos fragmentos y sólo se genera uno que corresponde al plasmidio linearizado. Al comparar los fragmentos generados por los clones 1, 4 y 5, se puede notar que para los clones 1 y 5 el fragmento pequeño es de menor tamaño que el fragmento pequeño generado por el clon 4. Esto indica que el clon 4 posee AFE_1862 orientado en dirección 3'-5' y que los clones 1 y 5 poseen un plasmidio con AFE_1862 orientado correctamente, por lo que se utilizaron estos clones para realizar los ensayos de funcionalidad.

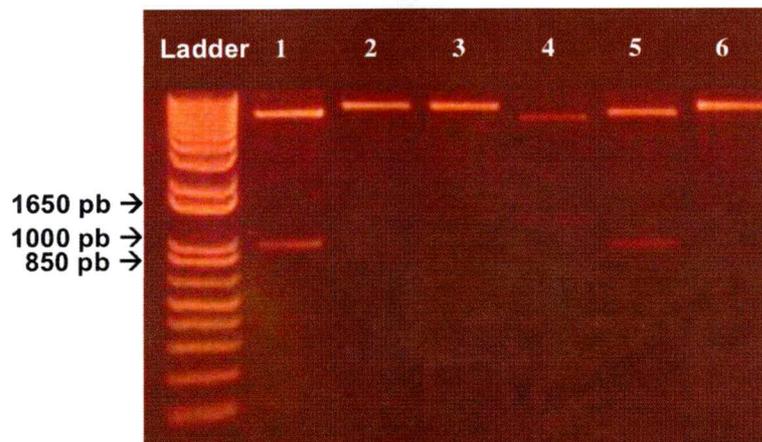


Figura 7. Selección de clones que tienen pTrcHis2-TOPO con AFE_1862 orientado correctamente mediante digestión con *EcoRV*. Se purificaron los plasmidios a partir de clones de *E. coli* 3mut transformados con el producto de la ligación entre pTrcHis2-TOPO y el fragmento de AFE_1862 amplificado por PCR. Luego se hizo una digestión de los plasmidios con *EcoRV* y se usó el producto de esta digestión para realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el primer carril se ve el estándar "1 Kb Plus DNA Ladder" (Invitrogen). En los demás carriles se ve el producto de la digestión con *EcoRV* de los plasmidios purificados desde distintos clones transformantes. Cada número indica un clon diferente.

3.3.2 Mutagénesis sitio dirigida

Se realizaron dos mutaciones sitio dirigidas, mediante PCR, sobre la secuencia de AFE_1862, en las que se modificó un nucleótido de los codones correspondientes a las cisteínas 13 y 16 para generar codones que codifiquen serinas. El fin de esta mutación es afectar el posible sitio de unión a cobre de AFE_1862. Al cambiar las cisteínas por serinas, se espera que el sitio de unión a metales de la proteína mutante sea incapaz de unir cobre, tal como ocurre en un mutante C13S/C16S de CopZ en *B. subtilis* (Kihlken y col., 2002).

La Figura 8 muestra el resultado de la secuenciación de un fragmento del plasmidio pTrcHis2-TOPO/AFE_1862_{mut} y se puede ver que los codones 13 y 16 presentan la mutación en la que se cambió el codón TGC que codifica para cisteína, por el codón AGC que codifica para serina.

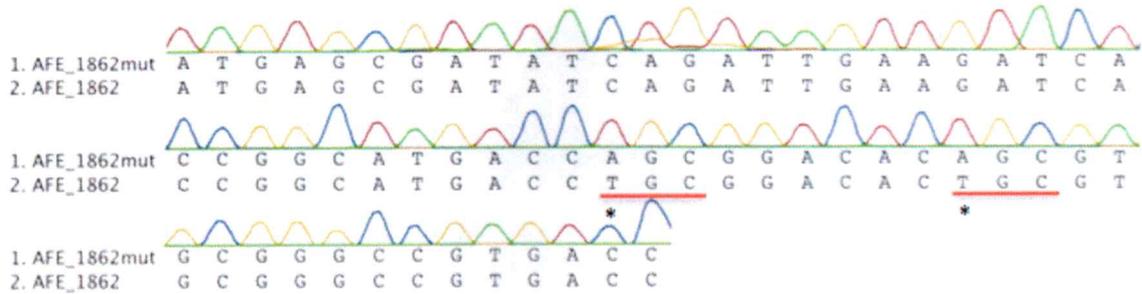


Figura 8. Confirmación de la mutación en el posible sitio de unión a cobre mediante secuenciación de DNA. Para confirmar las mutaciones sitio-dirigidas se secuenció el plasmidio pTrcHis2-TOPO/AFE_1862_{mut} utilizando los partidores diseñados para el Clonación de AFE_1862. Se muestra un fragmento de la secuencia obtenida y se compara con la secuencia de AFE_1862. Subrayado en rojo se muestran los codones mutados y con un asterisco los nucleótidos afectados.

3.4 Expresión heteróloga de AFE_1862 en *E. coli* 3mut y determinación de la concentración mínima inhibitoria de cobre

Con el fin de determinar el efecto de la expresión de AFE_1862 y AFE_1862_{mut} en *E. coli* se utilizó una cepa hipersensible a cobre (*E. coli* 3mut), que posee mutaciones en tres de sus sistemas de resistencia a cobre más estudiados. De esta forma, al expresar la proteína es más fácil evaluar el verdadero aporte de la posible chaperona en la resistencia a cobre. Se utilizó como control una cepa de *E. coli* 3mut que posee el vector sin inserto. Para confirmar la expresión de las proteínas nativa y mutante se realizó una electroforesis en gel de acrilamida al 20% (Figura 9).

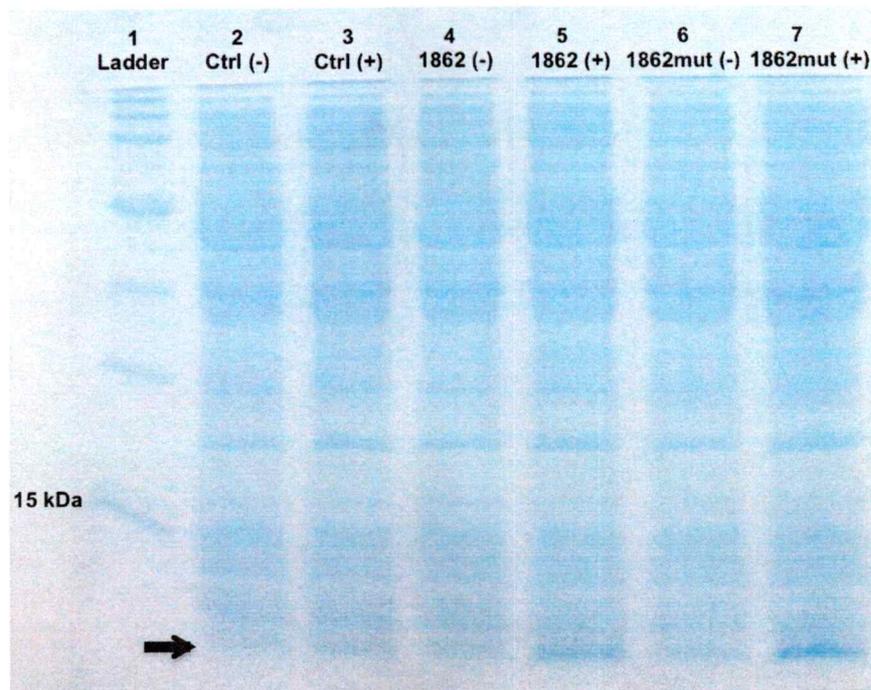


Figura 9. Confirmación de la expresión heteróloga de AFE_1862 nativa y mutante en *E. coli* 3mut. Se crecieron 5 ml de las distintas cepas de *E. coli* 3mut en medio líquido con ampicilina durante 1 h a 37 °C. Luego se agregó IPTG para inducir la expresión de la proteína y se incubó otras 4 h en las mismas condiciones. Luego se lisaron las células por sonicación y se cuantificaron las proteínas solubles para aplicarlas en un gel de poliacrilamida al 20%. En el primer carril se ve el estándar de proteína “Perfect Protein Marker,” 15-150 kDa (Novagen). En los carriles dos y tres, el clon control con pTrcHis2-TOPO sin inserto. En los carriles cuatro y cinco, el clon con pTrcHis2-TOPO/AFE_1862 y en los carriles seis y siete, el clon con pTrcHis2-TOPO/AFE_1862_{mut}. (-) y (+) indica ausencia o presencia de IPTG en el cultivo.

Al revisar la expresión en la cepa control (con el vector vacío) se puede observar que no hay ningún cambio en la intensidad de las bandas al inducir con IPTG. Sin embargo, en los carriles cinco y siete, correspondientes a la cepa con la proteína nativa y mutante respectivamente, se puede observar un aumento en la intensidad de la banda con la mayor migración (señalada por la flecha). La proteína AFE_1862 tiene un tamaño aproximado de 7,8 kDa por lo que el aumento en la intensidad de esta banda puede deberse a la sobreexpresión de la proteína.

Como se muestra en la Figura 10, la cepa control que tiene el vector sin inserto posee una MIC de 0,5 mM de CuSO₄ y la MIC de la cepa que posee AFE_1862 es cercana a 1,5 mM de CuSO₄, lo que significa un aumento de casi 3 veces con respecto

al control. Sin embargo, al analizar el clon que expresa la proteína mutante se puede ver que la MIC es similar a la de la cepa control. La leve diferencia entre la resistencia de la cepa control con la cepa que posee AFE_1862_{mut} puede explicarse porque la chaperona, a pesar de tener las cisteínas mutadas, aún es capaz de unir un poco de cobre y al ser sobreexpresada, esta unión puede otorgar cierto grado de resistencia (Kihlken y col., 2002).

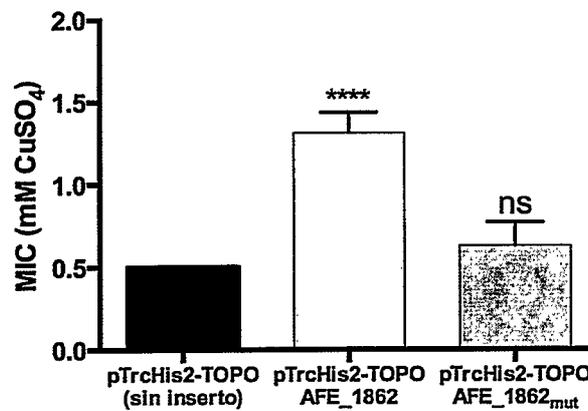


Figura 10. Determinación de la concentración inhibitoria mínima a CuSO₄ en células de *E. coli* hipersensibles a cobre transformadas con pTrcHis2-TOPO que expresa AFE_1862 nativa o AFE_1862 mutante. Las células se crecieron en medio líquido por 16 h a 37 °C en presencia de IPTG para inducir la expresión de los genes. Se agregó sulfato de cobre en un rango de 0 a 2 mM. Se determinó la MIC como la concentración a la cual un clon disminuye su OD₆₀₀ hasta un 50% en relación al control. Los valores se obtuvieron a partir de tres réplicas biológicas y las barras de error muestran la desviación estándar. Se realizó la prueba estadística t-Student donde; **** indica $p \leq 0,0001$ y ns indica $p > 0,05$.

4. DISCUSIÓN

El análisis bioinformático de AFE_1862 indicó que esta proteína sería una chaperona del tipo CopZ. Se puede ver que estas chaperonas son ubicuas, puesto que hay representantes en todos los dominios de la vida. Estructuralmente, AFE_1862 tiene un sitio de unión a metales MXCXXC muy conservado y también una serie de residuos hidrofóbicos que son fundamentales para el plegamiento tipo ferredoxina que presentan este tipo de proteínas. Al igual que la metalochaperona CopZ, la proteína codificada por AFE_1862 es capaz de otorgar resistencia a cobre, puesto que al sobreexpresar esta proteína en *E. coli*, su resistencia a este metal es mayor si se compara con la resistencia de una cepa control. Además, el posible sitio de unión a metales identificado en la secuencia aminoacídica de AFE_1862 podría estar relacionado con la unión a cobre, puesto que al expresar en *E. coli* la proteína de *A. ferrooxidans* mutada (que posee serinas en vez de cisteínas en el posible sitio de unión a cobre) le otorga una resistencia a cobre significativamente menor que la observada cuando se expresa en ella AFE_1862 nativa. La ventaja de mutar las cisteínas por serinas, es que ambos aminoácidos son estructuralmente casi idénticos y sólo difieren en el grupo radical que poseen. La cisteína posee un tiol (SH) que es capaz de coordinar cobre y la serina posee un alcohol (OH) que es incapaz de unir cobre. Por ello, se espera que las mutaciones no afecten estructuralmente a la proteína, si no que sólo su capacidad de ligar cobre.

Las cisteínas 13 y 16 que forman parte del posible sitio de unión a metales de AFE_1862, al igual que en CopZ_{Bs}, están expuestas al solvente, lo que permite que estas chaperonas puedan coordinar metales y cumplir su papel de metalochaperonas. Se han propuesto diversas funciones para este tipo de chaperonas, pero

principalmente se ha descrito su función relacionada con la homeostasis de cobre y con la resistencia a este metal, funciones que en general están ligadas a la interacción entre la chaperona y una ATPasa de eflujo de metales. En procariontes, este tipo de chaperonas citoplasmáticas serían capaces de unir el cobre libre que hay al interior de la célula y luego traspasarlo a una ATPasa de eflujo para sacar el cobre hacia el exterior. Estas proteínas se han descrito principalmente en bacterias gram positivas como *E. hirae* y *B. subtilis*, sin embargo recientemente se ha descrito que en la bacteria gram negativa *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* podría estar involucrada en la homeostasis de cobre una chaperona del tipo CopZ, denominada GolB (Espariz y col., 2007). Se especula que GolB podría formar parte de una ruta que permite traspasar el cobre en la superóxido dismutasa, en la que además estarían involucradas una ATPasa y una chaperona periplasmática (Nies & Herzberg, 2013; Osman y col., 2013).

Como se mostró en la Figura 4, en *E. hirae* y en *B. subtilis*, la metalochaperona CopZ se encuentra formando un operón junto con un regulador transcripcional y una ATPasa. Además, en *A. caldus* y *A. ferrivorans*, dos de los acidófilos más cercanos a *A. ferrooxidans*, las posibles chaperonas de tipo CopZ podrían estar formando un operón con una proteína hipotética y una posible ATPasa de metales. Sin embargo, en las dos cepas de *A. ferrooxidans* la chaperona no está cercana a ninguna proteína relacionada con la homeostasis de cobre. Al analizar el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se pueden encontrar tres ATPasas de cobre (Navarro y col., 2009), de las cuales sólo CopB_{Af} (AFE_2021) presenta los dominios HMA característicos de las ATPasas relacionadas con CopZ o Atx1 (Boal & Rosenzweig, 2009), por lo que esta proteína podría ser una candidata ideal para recibir el cobre de AFE_1862, a pesar de no formar un operón como en el resto de las bacterias analizadas.

Los resultados de cuantificación génica mostraron que en presencia de cobre la inducción de AFE_1862 no es muy elevada si se compara con la inducción de otros determinantes de resistencia a cobre para la misma bacteria en condiciones similares, en el que se alcanzan niveles de inducción de hasta 300 veces (Navarro y col. 2009). Sin embargo, el número de copias de transcrito (ver Anexos) de AFE_1862 en la condición control es del orden de $1,5 \times 10^4$ copias/ μ l y teniendo en cuenta que el número de copias calculado para el rRNA 16S en éste microorganismo es del orden de 10^7 copias/ μ l, los niveles basales de AFE_1862 son relativamente altos, por lo que una pequeña inducción podría aumentar significativamente la cantidad de proteína. En otros determinantes de resistencia a cobre de la misma cepa, como *copB_{Af}* o *cusCBA_{Af}*, se ha visto una sobreexpresión a nivel transcripcional de entre 90 y 300 veces en presencia de 25 mM de CuSO₄ (Navarro y col., 2009), pero los niveles de transcrito en la condición control son del orden de 10^2 copias/ μ l para estos genes, lo que es considerablemente más bajo que el número de copias de AFE_1862 en las mismas condiciones. En el mismo estudio se vió que el gen *copC_{Af}*, que codifica para una posible chaperona periplasmática, aumenta levemente su transcripción en comparación a otros determinantes de resistencia a cobre, pero los niveles de transcrito en la condición control fueron muy elevados y fue una de las proteínas que otorgó mayor resistencia a cobre cuando se expresó en *E. coli* (Navarro y col., 2009). Además, se ha visto que en células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 expuestas a 40 mM de CuSO₄, una de las proteínas que más se inducen es AFE_1862 (Almárcegui y col., 2014), por lo que a pesar de su baja inducción a nivel transcripcional, AFE_1862 podría ser muy importante para la resistencia a cobre de esta bacteria.

La evidencia recopilada en este trabajo indica que AFE_1862 sería la primera chaperona de cobre citoplasmática descrita en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y confirma que esta proteína podría cumplir directamente un papel en la resistencia a cobre (Almárcegui y col., 2014). La proteína AFE_1862 podría cumplir dos funciones en esta bacteria: primero, podría tener un papel importante en la resistencia a cobre de este microorganismo, evitando el daño que podría causar este metal en el citoplasma; y segundo, podría tener un papel en la homeostasis de cobre al entregar este metal a distintas proteínas o simplemente evitando que este metal compita por el sitio de unión de otras metaloproteínas citoplasmáticas. Algunas de las proteínas que podrían interactuar con AFE_1862 son las ATPasas de cobre presentes en la cepa ATCC 23270, específicamente CopB_{Af}. Sin embargo, es posible que en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 existan otras proteínas, como reguladores transcripcionales o algunas cuproenzimas, que necesiten de AFE_1862 para funcionar correctamente. Será importante por lo tanto seguir estudiando esta proteína y su posible interacción con otras proteínas para así saber qué implicancias puede tener en el metabolismo de *A. ferrooxidans* más allá de su participación en la resistencia a cobre.

5. CONCLUSIÓN

La caracterización bioinformática de AFE_1862 indica que esta proteína presenta las características de una chaperona de cobre del tipo CopZ, puesto que posee el sitio de unión a metales MXCXXC y la conformación estructural típica de estas proteínas.

La expresión del gen AFE_1862 aumenta cuando *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crece a concentraciones crecientes de cobre. Estos resultados confirman lo obtenido anteriormente a nivel proteico, lo que sugiere fuertemente que esta proteína cumple un papel en la resistencia a cobre de esta bacteria.

Al expresar la proteína AFE_1862 en una cepa de *E. coli* hipersensible a cobre, la resistencia a cobre de esta bacteria aumenta significativamente. Sin embargo, al expresar una proteína mutante en el posible sitio de unión a metales la resistencia de *E. coli* al cobre es menor. Esto indica que AFE_1862 funciona como un determinante de resistencia a cobre en esta bacteria y que el sitio de unión a metales MXCXXC es fundamental para que esta proteína cumpla dicha función. La proteína codificada por AFE_1862 tendría el mismo papel en *A. ferrooxidans*.

6. BIBLIOGRAFÍA

Almárcegui, R. J.; Navarro, C. A.; Paradela, A.; Albar, J. P.; von Bernath, D.; Jerez, C. A. 2014. New copper resistance determinants in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a quantitative proteomic analysis. *J. Proteome. Res.* **13**: 946-960.

Alvarez, S.; Jerez, C. A. 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5177-5182.

Argüello, J. M.; Raimunda, D.; Padilla-Benavides, T. 2013. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**: 73.

Arnesano, F.; Banci, L.; Bertini, I.; Ciofi-Baffoni, S.; Molteni, E.; Huffman, D. L.; O'Halloran, T. V. 2002. Metallochaperones and metal-transporting ATPases: A comparative analysis of sequence and structures. *Genome. Res.* **12**: 255-271.

Arnold, K.; Bordoli, L.; Kopp, J.; Schwede, T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**: 195-201.

Baker-Austin, C.; Dopson, M. 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *TRENDS Microbiol.* **15**: 165-171.

Banci, L.; Bertini, I.; Del Conte, R. 2003. Solution structure of apo-CopZ from *Bacillus subtilis*: further analysis of the changes associated with the presence of copper. *Biochemistry.* **42**: 13422-13428.

Bhasin, M.; Garg, A.; Raghava, G. P. S. 2005. PSLpred: prediction of subcellular localization of bacterial proteins. *Bioinformatics.* **21**: 2522-2524.

Boal, A. K.; Rosenzweig, A. C. 2009. Structural biology of copper trafficking. *Chem. Rev.* **109**: 4760-4779.

Chiu, J.; March, P. E.; Lee, R.; Tillett, D. 2004. Site-directed, ligase independent mutagenesis (SLIM): a single-tube methodology approaching 100% efficiency in 4h. *Nucleic Acids Res.* **32**: e174.

Das, A.; Modak, J.; Natarajan, K. A. 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **73**: 215-222.

Despalins, A.; Souhir, M.; Jacques, O. 2011. Absynte: a web tool to analyze the evolution of orthologous archaeal and bacterial gene clusters. *Bioinformatics*. **27**: 2905-2906.

Dopson, M.; Baker-Austin, C.; Koppineedi, P. R.; Bond, P. L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology*. **149**: 1959-1970.

Dupont, C. L.; Grass, G.; Rensing, C. 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance – new insights and applications. *Metallomics*. **3**: 1109-1118.

Espariz, M.; Checa, S.K.; Audero, M. E.; Pontel, L. B.; Soncini, S. C. 2007. Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology*. **153**: 2989-2997.

Festa, R. A.; Thiele, D. J. 2011. Copper: an essential metal in biology. *Curr. Biol*. **21**: R877-R883.

Jerez, C. A. 2011. Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. *En M. Moo-Young* (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed. Vol 3, pp 717-729. Elsevier, Boston.

Jerez, C. A. 2013. The use of extremophilic microorganisms in industrial recovery of metals. *En O. Songh* (ed.), *Extremophiles: Sustainable Resources and Biotechnological Implications*. pp 319-344. John Wiley & Sons, Inc, New York.

Johnson, D. B. 2013. Development and application of biotechnologies in the metal mining industry. *Environ. Sci. Pollut. Res*. **20**: 7768-7776.

Jordan, I. K.; Natale, D. A.; Koonin, E. V.; Galperin, M. Y. 2001. Independent evolution of heavy metal-associated domains in copper chaperones and copper-transporting ATPases. *J. Mol. Evol*. **53**: 622-633.

Kiefer, F.; Arnold, K.; Künzli, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. 2009. The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Res*. **37**: 387-392.

Kihlken, M. A.; Leech, A. P.; Le Brun, N. E. 2002. Copper-mediated dimerization of CopZ, a predicted copper chaperone from *Bacillus subtilis*. *Biochem. J*. **368**: 729-739.

Kim, E.; Nies, D. H.; McEvoy, M. M.; Rensing, C. 2011. Switch or Funnel: How RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J. Bacteriol*. **192**: 2381-2387.

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

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

Nies, D. H.; Herzberg, M. 2013. A fresh view of the cell biology of copper in enterobacteria. *Mol. Microbiol.* **87**: 447-454.

O'Halloran, T. V.; Cizewski, V. 2000. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* **275**: 25057-25060.

Olson, G. J.; Brierley, J. A.; Brierley, C. L. 2003. Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 249-257.

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

Osman, D.; Patterson, C.; Bailey, K.; Fisher, K.; Robinson, N. J.; Rigby, S. E. J.; Cavet, J. S. 2013. The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-superoxide dismutase involves P_{1B}-type ATPase copper-efflux and periplasmic CueP. *Mol. Microbiol.* **87**: 466-477.

Peitsch, M. C. 1995. Protein modeling by E-mail. *Nat. Biotechnol.* **13**: 658-660.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 2002-2007.

Rensing, C.; Grass, G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of Cu homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol.* **27**:197-213.

Rohwerder, T.; Gehrke, T.; Kinzler, K.; Sand, W. 2003. Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 239-248.

Singleton, C.; Le Brun, N. E. 2007. Atx1-like chaperones and their cognate P-type ATPases: copper-binding and transfer. *Biomaterials.* **20**: 275-289.

Smaldone, G. T.; Helmann, J. D. 2007. CsoR regulates the copper efflux operon *copZA*

in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. **153**: 4123-4128.

Solioz, M.; Stoyanov, J. V. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Res.* **27**: 183-195.

Vera, M.; Schippers, A.; Sand, W. 2013. Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation – part A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 7529-7541.

Watling, H. R. 2006. The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides: a review. *Hydrometallurgy*. **84**: 81-108.

Wilfinger, W. W.; Mackey, K.; Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*. **22**: 474-481.

Yu, C. S.; Chen, Y. C.; Lu, C. H.; Hwang, J.K. 2006. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **64**: 643-651.

Yu, N. Y.; Wagner, J.R.; Laird, M. R.; Melli, G.; Rey, S.; Lo, R.; Dao, P.; Sahinalp. S. C.; Ester, M.; Foster, L. J.; Brinkman, F. S. L. 2010. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*. **26**: 1608-1615.

7. ANEXO

7.1. Ejemplo de cálculo realizado para determinar el número de copias en la reacción de PCR en tiempo real

Primero, se realizó una curva de calibración para cada gen que se va a ensayar. Para esto se realizaron diluciones seriadas desde 10 ng hasta 1 pg de DNA genómico de *A. ferrooxidans*. Luego se midió el CT para cada una de estas diluciones y a partir de la ecuación de la recta del gráfico de concentración de DNA vs CT se estimó la concentración de cDNA de cada una de las muestras estudiadas.

Para calcular el número de copias relativo es necesario saber el peso del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Teniendo en cuenta que el tamaño del genoma de esta bacteria es cercano a 2,98 Mb y que 1 pb pesa 660 Da aproximadamente, se calculó el peso del genoma de la siguiente forma:

$$\text{Peso genoma} = 2,98 \times 10^6 \text{ pb} \times \frac{660 \text{ Da}}{1 \text{ pb}} \times \frac{1,67 \times 10^{-24} \text{ g}}{1 \text{ Da}} = 3,28 \times 10^{-15} \text{ g}$$

Esto permite estimar el número de genomas presentes en una masa determinada de DNA genómico, por ejemplo en una solución de gDNA que está a una concentración de 50 ng/μl, hay aproximadamente $1,52 \times 10^7$ genomas/μl. Este número de genomas presentes es equivalente al número de copias de un gen que posee una sola copia en el genoma. Por lo que al calcular la concentración de cDNA en cada reacción mediante los CT, se puede estimar el número de copias relativo de cDNA que se aplicó en cada reacción.