

“Participación de proteínas con dominio CHAD en  
la resistencia a cobre en la  
bacteria *Escherichia coli*”

Tesis

Entregada A La  
Universidad de Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Gabriela González Madrid

Octubre, 2023

Director de Tesis Dr. Carlos A. Jerez

Santiago, Chile

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION**

**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

**Gabriela González Madrid**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día .....

Director de Tesis:

Dr. ....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. ....

Dr. ....

## Dedicatoria

Dedico este trabajo a aquellos que con su granito de arena me ayudaron a culminar este proceso. Han sido mi principal fuente de apoyo e inspiración a lo largo de mi camino académico. A mis padres, cuyo amor incondicional y sacrificio han sido la base de mi formación y éxitos. Este logro es un tributo a su confianza en mí y a su constante aliento.

A mi pareja Mauricio cuyo amor, apoyo y comprensión me han sostenido en los momentos más complejos.

A mis profesores y mentores, cuyos conocimientos y guía me han moldeado como estudiante e investigadora. En especial a Claudio Navarro, quien me guio, pulió, aconsejó y contuvo durante todo este camino. Te admiro y agradezco muchísimo. A mis amigos José y Matías, que han sido un constante apoyo emocional.

A todos aquellos que creyeron en mí, incluso cuando yo dudaba de mí misma. Gracias por su compañía y apoyo durante estos largos 2.5 años.

## Resumen biográfico



Mi nombre es Gabriela González Madrid. Desde niña tuve esencia curiosa y una fascinación innata por la naturaleza y los seres vivos. A medida que fui creciendo, esa curiosidad se convirtió en una profunda pasión por las Ciencias, especialmente por la Biología. Me deslumbraba la idea de entender cómo el mundo a mi alrededor funciona.

Sin saber con exactitud a qué me quería dedicar, seguí mi pasión por la Biología y en 2016 ingresé a la Universidad de Chile a estudiar Licenciatura en Ciencias con mención en Biología. Al culminar mi carrera, continué mis estudios en el programa de Magíster en Ciencias Biológicas, desarrollando mi tesis en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, dirigido por el Dr. Carlos Jerez, donde hoy me estoy titulando. Este largo camino me ha ayudado a entender que, en el fondo, siempre quise esto: ser científica.

# Agradecimientos

Le quisiera agradecer, en mi primera instancia, a mi familia. A mi madre, por ser la mujer que más me inspira en el mundo, que me enseñó de responsabilidad, disciplina y esfuerzo desde pequeña, a ser ambiciosa y potenciar al máximo mis capacidades. A mi padre, mi mayor fuente de admiración e inspiración, cuyo amor y paciencia me permitieron escoger con libertad mi camino. Su esfuerzo me permitió explotar mis capacidades y llegar hasta este punto. Les agradezco por todas las posibilidades que me brindan, por permitirme estudiar algo que me llena todos los días, por dejarme seguir el corazón y la pasión, sin presiones ni prejuicios.

A mis hermanas, que desde pequeña han sido un referente para mí, demostrándome que con esfuerzo y disciplina podía lograr todo lo que me propusiera. A mis sobrinas, por su compañía, contención y preocupación. Gracias a cada una de ustedes, por inspirarme todos los días. Por lejos son las mujeres más inteligentes y fuertes que conozco, como también las más sencillas. Gracias por todo el apoyo y amor incondicional que siempre me han brindado.

A mis amigos, que fueron una red de apoyo sumamente importante para mí durante en todo este proceso. Rodrigo y Camila, gracias por su contención, por las conversaciones profundas y reflexiones de todo tipo. A Bárbara, quien, a su manera siempre me ha inspirado a seguir mi propio camino. A Catalina, mi amiga de toda la vida y del alma, por siempre confiar en mí, incluso cuando era esa pequeña Gabita de 13 años que ni siquiera pensaba en la posibilidad de entrar a la universidad porque creía que no era capaz.

A mi pareja, Mauricio, quien ha sido mi apoyo en todos los ámbitos posibles, durante casi 6 años. Mauricio además de ser un excelente Químico Ambiental, cuyos conocimientos me aportaron muchísimo durante todo este proceso, ha sido una contención incondicional para mí. Gracias por todas tus palabras de ánimo, apoyo, consejos, las noches en vela estudiando. Siempre has sido una fuente de admiración para mí, un ejemplo de perseverancia y esfuerzo.

A todo el grupo del laboratorio. Al Dr. Carlos Jerez, mi profesor tutor, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad, el apoyo y la formación durante todos estos años.

Al Dr. Claudio Navarro (aka Dr. All F\$\$k). No me alcanzan las palabras para expresar cuánta gratitud siento hacia ti, aún menos para describir cuánto te admiro y respeto. Claudio fue uno de los pilares fundamentales para mí durante todo este proceso. Agradezco enormemente tu contribución a mi formación académica, por contenerme en mi fase lag, por confiar en mí, por ayudarme a crecer profesional y personalmente. Gracias por todas las enseñanzas, consejos y conversaciones de todo ámbito. Por compartir tus experiencias conmigo, tus conocimientos en el mesón, tus “mañas”. Te admiro como científico y persona.

A Alejandra Recalde, quien fue una de mis primeras personas en recibirme en el laboratorio. Me enseñó mis primeras prácticas en el laboratorio, desde como pipetear bien hasta ocupar un Microscopio de Fluorescencia. Alejandra es una excelente científica, me enorgullece poder decir que con ella quien tuve mis primeros acercamientos a la Ciencia. Muchas gracias por recibirme tan bien, por la buena onda, los conocimientos que me transmitiste, y por integrarme al laboratorio.

A Javier Bustamante, por su por su amabilidad y habilidades en el laboratorio, así como por su apoyo y consejos.

A José Acevedo, mi compañero desde el pregrado, quien me sugirió acercarme al laboratorio del Dr. Carlos Jerez para realizar mi Unidad de investigación. Fuiste y eres un compañero y amigo increíble. Me llevo conmigo todas las tardes que pasamos, cuando ya todos se iban y nosotros seguíamos ahí. Aprovechábamos de poner música y hablar tonteras para distender la mente un poco. Las vueltas a fumar tabaco, los chistes de humor negro. A Matías, que, si bien no es parte formalmente de nuestro laboratorio, nosotros lo consideramos como tal. Sin duda, eres uno de mis mejores amigos, una de las personas que más contención me brinda. Además de un excelente científico, obviamente. Como dice Claudio, Matías camina tranquilo por el barrio. Gracias por todo estos años de compañía y amistad. Por lejos, la amistad de José, Matías y Claudio fue lo mejor que me dejó mi paso por el Magíster.

Recordaré con mucho cariño las reuniones extralaborales que teníamos luego de una extensa jornada de trabajo. Allí surgieron innumerables anécdotas, risas, consejos y valiosas ideas para futuros experimentos.

A Lorena Saragoni, por su paciencia y amabilidad al enseñarme a utilizar el Microscopio de Fluorescencia.

Finalmente, a la Comisión revisora de la tesis, profesores Dr. Nicolas Guiliani y Dra. Julieta Orlando, por las correcciones y sugerencias que contribuyeron a la finalización exitosa de este trabajo.

## Tabla de contenido

Índice de tablas .....	viii
Índice de figuras.....	viii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	9
Objetivo general:.....	9
Objetivos específicos: .....	9
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
1. Cepas bacterianas y medios de cultivo .....	10
2. Técnicas de biología molecular .....	10
2.1 Extracción de ADN genómico.....	10
2.2 Cuantificación de ADN .....	11
2.3 Extracción y purificación de ADN plasmídico.....	11
2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	12
2.5 Electroforesis de ácidos nucleicos .....	12
2.6 Purificación de ADN desde geles de agarosa .....	13
2.7 Digestión y ligación de ADN .....	13
2.8 Generación de células competentes de <i>E. coli</i> Bw25113 .....	14
2.9 Transformación de <i>E. coli</i> Bw25113.....	15
2.11 Clonamiento y expresión de proteínas CHAD.....	17
2.12 Mutación sitio-dirigida.....	18
2.13 Construcción de fusiones con proteínas fluorescentes .....	20
3. Ensayos de resistencia a cobre .....	21
4. Análisis bioinformáticos.....	21
5. Métodos de extracción y purificación de polifosfato (PoliP).....	22
5.1 Extracción de PoliP.....	22
5.2 Cuantificación de PoliP.....	23
6. Métodos para el análisis de proteínas .....	23
6.1 Cuantificación de proteínas mediante el método colorimétrico Bradford.....	23
7. Tinción y montaje de células.....	24
8. Microscopía Confocal Laser .....	24

9. Análisis estadísticos .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	26
1.1 Efecto de la carencia del gen endógeno <i>ygiF</i> en la resistencia a cobre en <i>E. coli</i> .....	29
Ensayos de resistencia al cobre .....	29
1.2 Clonamiento y expresión de proteínas CHAD bacterianas y sus dominios individuales	31
2. Mutación sitio-dirigida sobre los sitios de unión a cobre de la proteína YgiF mediante cambios de aminoácidos.....	34
2.1 Análisis estructural de proteínas CHAD .....	34
2.2 Análisis bioinformáticos .....	39
2.3 Mutación de sitio-dirigida .....	46
2.4 Ensayos de resistencia en las cepas mutantes sitio-dirigidas .....	47
2.5 Niveles de PoliP en las mutantes sitio-dirigidas.....	49
3. Visualización de la dinámica celular de la proteína YgiF mediante microscopía fluorescente en <i>E. coli</i> .....	51
3.1 Generación de las construcciones moleculares.....	51
3.2 Visualización de la dinámica celular de la proteína YgiF.....	54
<b>DISCUSIÓN</b> .....	59
Efecto de la carencia de YgiF en la resistencia a cobre en <i>E. coli</i> . .....	59
Rol del sitio de unión a cobre de YgiF en la resistencia al metal. ....	60
Dinámica celular de la proteína YgiF en presencia de cobre. ....	65
Proyecciones sobre el acidófilo <i>A. ferrooxidans</i> . ....	71
<b>CONCLUSIONES</b> .....	73
<b>FINANCIAMIENTO</b> .....	74
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	75
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO</b> .....	79

## Índice de tablas

**Tabla S1.** Partidores utilizados y sus usos.

**Tabla S2.** Detalle del programa PCR utilizado para generar la cepa de *E. coli* mutante nula *ygiF::cm*, las cepas complementadas YgiF, CHAD, CYTH y Afe.

**Tabla S3.** Detalle del programa PCR utilizado para generar el gen mutante *ygiF\*H345A*, *ygiF\*H349A* e *ygiF\*H345,349A* de *E. coli*.

**Tabla S4.** Detalle del programa PCR utilizado para generar la construcción molecular RFP-YgiF e YgiF-RFP.

## Índice de figuras

**Figura 1.** Vías de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de cobre.

**Figura 2.** Resumen del modelo de trabajo de los determinantes de la resistencia al cobre en *E. coli* en presencia del metal.

**Figura 3.** Esquema de la reacción enzimática catalizada por la enzima Polifosfato quinasa (PPK).

**Figura 4.** Esquema de la reacción enzimática catalizada por la enzima Exopolifosfatasa (PPX).

**Figura 5.** Disminución del contenido de polifosfato durante la exposición a cobre en *A. ferrooxidans*.

**Figura 6.** Análisis del contexto génico de las proteínas CHAD en algunas *Enterobacterias*.

**Figura 7.** Análisis del contexto génico de las proteínas CHAD en *Acidithiobacillus*.

**Figura 8.** Efecto de la proteína YgiF en la resistencia a cobre en la cepa silvestre y mutante nula *ygiF::cm* de *E. coli*.

**Figura 9.** Esquema del clonamiento del gen *ygiF* al vector de expresión pTrc-His2A.

**Figura 10.** Resistencia a cobre de diferentes mutantes de *E. coli*.

**Figura 11.** Estructura general y sitios de unión a cobre de la proteína PptA de *S. chartreusis*.

**Figura 12.** Comparación de la estructura general de proteínas CHAD disponibles en PDB y AlphaFold.



**Figura 13.** Análisis “multiseq” de las proteínas CHAD de *C. tepidum*, *R. communis*, *S. chartreusis*, *E. coli* y *A. ferrooxidans*.

**Figura 14.** Predicción de sitios de unión a  $\text{Cu}^{+1}$  en la proteína YgiF de *E. coli* en el servidor MIB.

**Figura 15.** Alineamiento local de proteínas CHAD de bacterias acidófilas de los géneros *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus*, *Thiobacillus*, *Leptospirillum* y *Acidimicrobium*.

**Figura 16.** Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas CHAD de *E. coli*, *C. tepidum*, *R. communis* y *S. chartreusis*.

**Figura 17.** “Docking” molecular realizado por el servidor MIB de la proteína YgiF de *E. coli* y  $\text{Cu}^{+1}$ .

**Figura 18.** Análisis “multiseq” de las proteínas CHAD de *C. tepidum*, *R. communis*, *S. chartreusis*, *A. ferrooxidans* y “docking” realizado por MIB de la proteína YgiF de *E. coli*.

**Figura 19.** Diagrama esquemático de la mutagénesis sitio-dirigida por PCR.

**Figura 20.** Efecto de la mutación en el posible sitio de unión a cobre de la proteína YgiF.

**Figura 21.** Niveles de PoliP de las cepas *ygiF*\*H345,349A,  $\Delta ygiF$  y silvestre de *E. coli*

**Figura 22.** Esquema general del gen de fusión *RFP-ygiF*.

**Figura 23.** Esquema para el ensamble de los genes *RFP* e *ygiF*.

**Figura 24.** Co-localización de la proteína YgiF con los gránulos de PoliP.

**Figura 25.** Evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en presencia de cobre.

**Figura 26.** Modelo hipotético de la actividad de las proteínas CHAD en la dinámica de los polifosfatos.

**Figura S1.** Mapa del vector pkD3.

**Figura S2.** Mapa vector pkD46.

**Figura S3.** Mapa vector pTrc-His2A.

**Figura S4.** Análisis estadístico de la resistencia a cobre en la cepa silvestre e *ygiF*::cm de *E. coli*.

**Figura S5.** Análisis estadístico de la resistencia al cobre de diferentes mutantes de *E. coli*.

**Figura S6.** Predicción de sitios de unión a  $\text{Cu}^{+1}$  en las proteínas CHAD de *Chlorobium tepidum* (cadena A y B), *Ricinus communis* y *Streptomyces chartreusis* en el servidor MIB.

**Figura S7.** Análisis estadístico de la resistencia al cobre de las cepas variantes,  $\Delta ygiF$  y cepa silvestre de *E. coli*.

**Figura S8.** Réplicas de micrografías de fluorescencia obtenidas desde cultivos de la cepa  $\Delta phoU$  de *E. coli*.

**Figura S9.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en medio LB. Tiempo 0 minutos (sin cobre).

**Figura S10.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en presencia de cobre. Tiempo 30 minutos post exposición.

**Figura S11.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en presencia de cobre. Tiempo 1 hora post exposición.

**Figura S12.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en presencia de cobre. Tiempo 24 horas post exposición.

**Figura S13.** Visualización de la localización de la proteína YgiF en los polos celulares de la cepa  $\Delta phoU$  de *E. coli*.

**Figura S14.** Secuencia del gen *ygiF* silvestre de *E. coli*.

**Figura S15.** Secuencia del gen *ygiF* mutado de las cepas: A. *ygiF*\*H345A, B. *ygiF*\*H349A y C. *ygiF*\*H345,349A de *E. coli*.

## Lista de abreviaturas

<b>ADN</b>	: Ácido desoxirribonucleico
<b>ADP</b>	: Adenosín difosfato
<b>ATP</b>	: Adenosín trifosfato
<b>BLAST</b>	: Basic Local Alignment Search Tool
<b>CHAD</b>	: Conserved Histidine Alpha-helical Domain
<b>CMI</b>	: Concentración Mínima Inhibitoria
<b>Cu<sup>+1</sup></b>	: ion cuproso
<b>Cu<sup>+2</sup></b>	: ion cúprico
<b>CYTH</b>	: CyaB and ThTPase
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>D.O.</b>	: Densidad óptica
<b>dNTP</b>	: Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	: Ácido etilendiaminotetraacético
<b>Fig</b>	: Figura
<b>GITC</b>	: Isotiocianato de guanidina
<b>IPTG</b>	: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
<b>LB</b>	: Luria-Bertani
<b>MIB</b>	: Metal Ion-Binding site prediction and docking server
<b>MCL</b>	: Microscopía Confocal Laser
<b>Min</b>	: Minutos
<b>pb</b>	: Pares de bases
<b>PCR</b>	: Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDB</b>	: Protein Data Bank
<b>Pi</b>	: Ortofosfato inorgánico
<b>Pit</b>	: Transportador de fosfato inorgánico
<b>PoliP</b>	: Polifosfatos
<b>PSI-BLAST</b>	: Position-Specific Iterated BLAST
<b>PPK</b>	: Polifosfato quinasa
<b>PPX</b>	: Exopolifosfatasa
<b>RND</b>	: Resistance Nodulation cell Division
<b>ROS</b>	: Reactive Oxygen Species
<b>s</b>	: Segundos
<b>SDS</b>	: Dodecil sulfato de sodio
<b>U</b>	: Unidad

## Resumen

Los metales son elementos esenciales para el desarrollo celular y el funcionamiento adecuado de todos los organismos. El cobre, cobalto, hierro, entre otros, desempeñan funciones cruciales en procesos como la síntesis de ADN, el metabolismo energético y actuando como cofactores. Sin embargo, a concentraciones elevadas, pueden volverse tóxicos debido a su participación en reacciones de Fenton, causando estrés oxidativo y daño celular.

Por lo tanto, los microorganismos han desarrollado una serie de mecanismos moleculares que les permitan resistir la presencia de altas concentraciones de estos metales en su entorno, como es el caso de aquellos que participan en procesos de biominería. Se ha observado que estos microorganismos acumulan grandes cantidades de polifosfato (PoliP) en su citoplasma. Estos biopolímeros se han relacionado a una gran variedad de fenotipos en bacterias, destacando especialmente la resistencia a metales pesados.

Recientemente se reportó que en la bacteria *Ralstonia eutropha*, una familia de proteínas conocidas como proteínas CHAD (“Conserved Histidine Alpha-helical Domain”) se asocia *in vivo* a los gránulos de PoliP. Sin embargo, se desconoce la actividad de estas proteínas más allá de su interacción con estos gránulos. Se ha descrito que, frente a un shock de cobre, los niveles intracelulares de PoliP disminuyen rápidamente en la bacteria modelo de biominería, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Sin embargo, esta degradación se detiene posteriormente y sus niveles comienzan a recuperarse con el tiempo, lo que se considera un mecanismo importante en la respuesta inmediata al estrés por cobre. Además, existen antecedentes que sugieren que las proteínas con dominio CHAD podrían desempeñar un papel importante en el metabolismo de polifosfatos.

En base a lo anterior, en este trabajo se estudió el posible rol de la proteína YgiF (una proteína con dominio CHAD) en la resistencia a cobre de *Escherichia coli*. Para ello se generó una cepa de *E. coli* mutante carente del gen que codifica la proteína YgiF, y mediante ensayos de resistencia a cobre se evaluó su sensibilidad al metal. Los resultados mostraron que la cepa mutante *ygiF* es más sensible a cobre respecto a la cepa silvestre. Además, se analizó el posible sitio de unión a cobre de la proteína YgiF, y se observó que cuando este sitio se muta, el fenotipo es similar a la cepa mutante. Por último, mediante microscopía de fluorescencia se pudo observar la dinámica de la proteína YgiF en presencia de cobre. Se observó que YgiF se disocia del gránulo de PoliP ante la presencia de cobre, sin embargo, al paso de unas horas la proteína vuelve a unirse al gránulo. Los resultados de esta tesis podrían brindar la primera evidencia sobre la participación de las proteínas con dominio CHAD en la resistencia a cobre en *E. coli*.

Palabras claves: *Escherichia coli*, polifosfatos, YgiF, resistencia a cobre.

## **Abstract**

Metals are essential elements for cellular development and the proper functioning of all organisms. Copper, cobalt, iron, among others, play crucial roles in processes such as DNA synthesis, energy metabolism, and acting as cofactors. However, at elevated concentrations, they can become toxic due to their involvement in Fenton reactions, causing oxidative stress and cellular damage.

Therefore, microorganisms have developed a series of molecular mechanisms that enable them to resist the presence of high concentrations of these metals in their environment, as is the case with those involved in biomineralization processes. It has been observed that these microorganisms accumulate large amounts of polyphosphate (PolyP) in their cytoplasm. These biopolymers have been associated with a wide variety of phenotypes in bacteria, particularly highlighting resistance to heavy metals.

It was recently reported that in the bacterium *Ralstonia eutropha*, a family of proteins known as CHAD proteins (Conserved Histidine Alpha-helical Domain) are attached *in vivo* to polyphosphate granules. However, the activity of these proteins beyond their interaction with these granules is unknown. It has been described that, in response to a copper shock, intracellular levels of PolyP rapidly decrease in the model biomining bacteria, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. However, this degradation subsequently stops, and PolyP levels begin to recover over time. This is considered an important mechanism in the immediate response to copper stress. Additionally, there is evidence suggesting CHAD domain proteins could play an important role in polyphosphate metabolism.

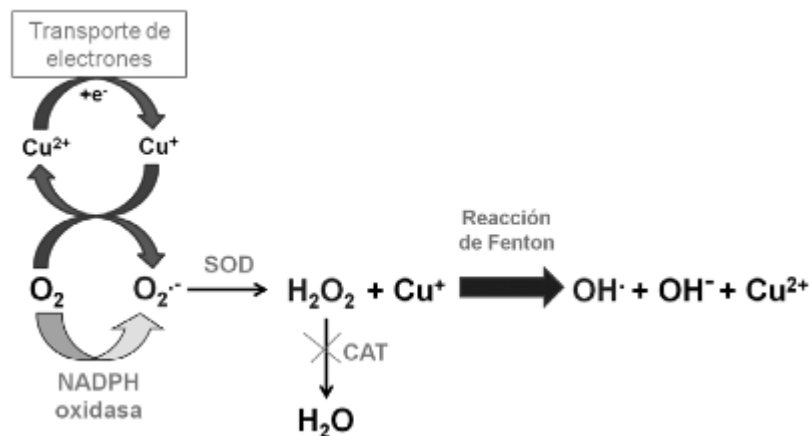
Based on the above, in this work the possible role of YgiF protein (CHAD domain protein) in copper resistance in *Escherichia coli* was analyzed. To do this, a mutant strain of *E. coli* lacking

the gene encoding for the YgiF protein was generated, and copper resistance assays were conducted to evaluate its metal sensitivity. The results showed that *ygiF* mutant strain was more sensitive to copper compared to the wild-type strain. Furthermore, the possible copper binding site of YgiF protein was also analyzed. When this site was mutated, the phenotype was similar to that of the YgiF mutant strain. Finally, fluorescence microscopy was used to analyze the dynamics of the YgiF protein in presence of copper. It was observed that YgiF protein dissociates from the PolyP granule in presence of copper, but after a few hours, the protein reattached to the granule. The results of this thesis could provide the first evidence for the involvement of CHAD domain proteins in copper resistance in *E. coli*.

Keywords: *Escherichia coli*, polyphosphates, YgiF, copper resistance.

## INTRODUCCIÓN

El cobre es un elemento esencial para todos los organismos debido a su rol como cofactor de algunas enzimas redox y proteínas de la cadena transportadora de electrones (Linder., 1991). El cobre posee dos estados de oxidación,  $\text{Cu}^{+1}$  (ion cuproso) y  $\text{Cu}^{+2}$  (ion cúprico). En ambientes aeróbicos, como el espacio extracelular el ion cúprico  $\text{Cu}^{+2}$  es más abundante, mientras que, en el ambiente intracelular, altamente reductor, el estado  $\text{Cu}^{+1}$  es más común. La capacidad del cobre para alternar entre ambos estados de oxidación lo convierte en un cofactor biológico ideal. Sin embargo, cuando se encuentra libre en la célula, su ciclo redox lo hace extremadamente tóxico debido a que participa en la reacción de Fenton, causando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fig. 1) (Krumshnabel y cols., 2005).



**Figura 1.** Vías de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en presencia de cobre. SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa. Modificada de Morales y Jiménez (2012).

La generación del radical hidroxilo, un tipo de ROS que oxida biomoléculas como el ADN, proteínas y lípidos, puede alterar funciones celulares básicas, como integridad de la membrana, síntesis de proteínas y catálisis enzimática (Bruins y cols., 2000, Banu y cols., 2004). Debido a esto, los microorganismos han evolucionado y desarrollado mecanismos moleculares que les

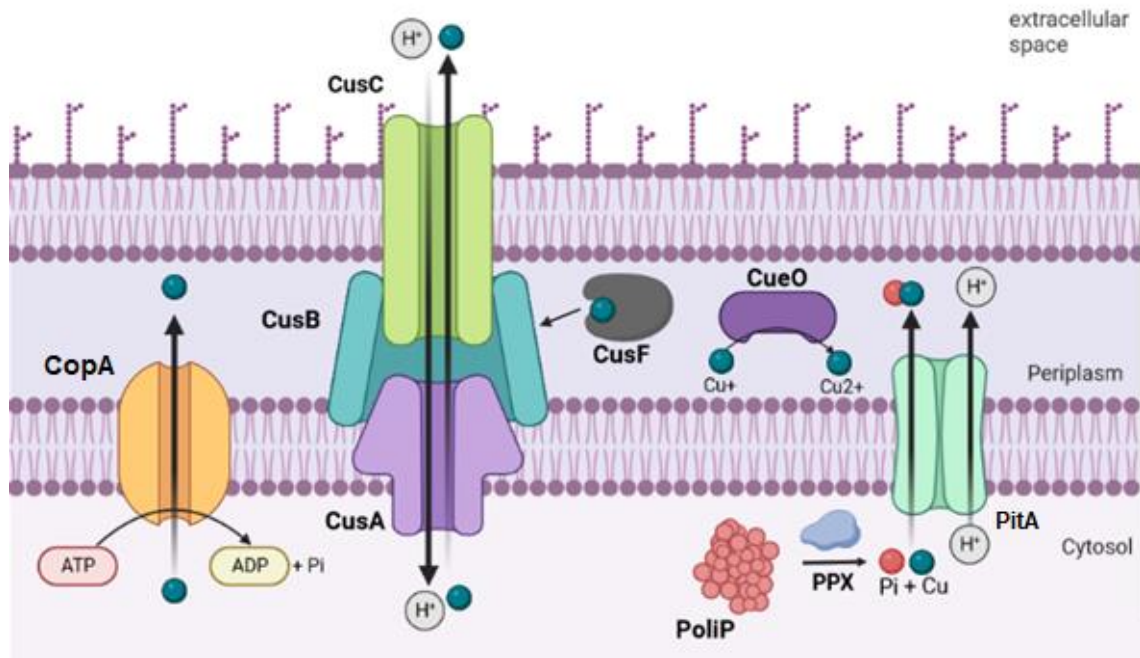


permiten adquirir, transportar, capturar y exportar el cobre, asegurando niveles adecuados y evitando la acumulación de cantidades tóxicas (Rubino y Franz., 2002). De esta manera, pueden enfrentar los altos niveles de este metal en su entorno.

Además, los microorganismos han desarrollado una variedad de mecanismos para regular los niveles de cobre libre en la célula, e incluso han generado estrategias para mantener la homeostasis cuando la concentración de este metal aumenta (Magnani y Solioz, 2007; Rensing y Grass., 2002; Silver y Phung., 1996; Teitzel y cols., 2006).

En la bacteria *Escherichia coli*, los mecanismos utilizados para resistir al cobre consisten en el eflujo activo del metal desde el citoplasma hacia el espacio periplasmático mediante la ATPasas CopA, presente en la membrana celular interna (Rensing y cols., 2000) (Fig. 2). Por otro lado, el cobre se expulsa desde el citoplasma hacia el exterior de la célula mediante el sistema Cus, una familia de sistemas transportadores denominados RND (del inglés, resistance nodulation cell division) (Franke y cols., 2003, Outten y cols., 2000). Otro determinante de resistencia reportado en *E. coli*, que requiere la participación conjunta de CopA, es la multioxidasa CueO, que se encarga de oxidar el ion cuproso a la forma menos tóxica del metal, el ion cúprico, en el espacio periplasmático (Fig. 2) (Singh y cols., 2004).

Por último, se ha descrito un sistema de resistencia basado en polifosfato inorgánico (PoliP). Este sistema consiste en la degradación de PoliP por parte de la enzima Exopolifosfatasa (PPX) en presencia de cobre. Los monómeros de fosfato inorgánico formados podrían, posiblemente, unir cobre citoplasmático y ser exportados como complejos cobre-fosfato hacia el periplasma a través del transportador PitA (Grillo-puertas y cols., 2014).

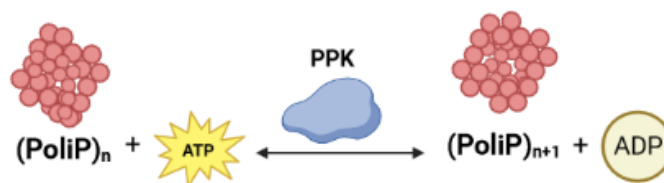


**Figura 2.** Resumen del modelo de trabajo de los determinantes de la resistencia al cobre en *E. coli* en presencia del metal.

Los sistemas de detoxificación de cobre descritos anteriormente para *E. coli*, una bacteria Gram-negativa neutrófila, le permiten resistir concentraciones del metal mucho más bajas que las que resisten los microorganismos biolixivantes (Franke y cols., 2003; Dopson y cols, 2003). La mayoría de estos microorganismos que participan en procesos de biominería, acumulan grandes cantidades de PoliP en su citoplasma (a diferencia de *E. coli*), el cual desempeña un papel importante en la adaptación a su ambiente, participando en la formación de biopelículas sobre los minerales, resistencia a altas concentraciones de metales pesados, entre otras (Orell y cols., 2010,

Rashid y cols., 2000). El PoliP es una fuente clave de  $P_i$  para la detoxificación de metales, formando complejos metal-fosfato y su posterior eliminación (Álvarez y Jerez, 2004; Navarro y cols 2013; Ulloa y cols., 2018).

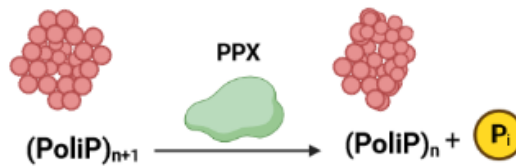
Los PoliP corresponden a biopolímeros lineales formados por cientos de residuos de ortofosfato unidos mediante enlaces fosfoanhídrido (Kornberg., 1999). Este biopolímero se encuentra en los tres dominios de la vida: Bacteria, Eukarya y Archaea. En Bacteria y Euryarchaeotas su síntesis es catalizada por la enzima Polifosfato quinasa (PPK) a partir de ATP (Fig.3) (Kornberg., 1957; Ahn y Kornberg., 1990).



**Figura 3.** Esquema de la reacción enzimática catalizada por la enzima Polifosfato quinasa (PPK).

Esta es una reacción reversible, es decir, los PoliP en determinadas condiciones celulares se utilizan como fuente de energía (Akiyama y cols., 1992; Kato y cols., 1993). Sin embargo, la reacción más favorecida es la de formación de PoliP, ya que sólo cuando la relación ADP/ATP es igual o mayor a 10, se desplaza el equilibrio de la reacción hacia la formación de ATP a partir de PoliP, es decir, cuando la célula ha utilizado la mayor parte de su reserva de ATP (Kornberg., 1999).

En Bacteria y Crenarchaea la degradación de los PoliP es catalizada por la enzima Exopolifostasa (PPX), la cual hidroliza los PoliP liberando fosfato inorgánico ( $P_i$ ) en una reacción irreversible (Fig. 4) (Akiyama y cols., 1993; Rangarajan y cols., 2006).

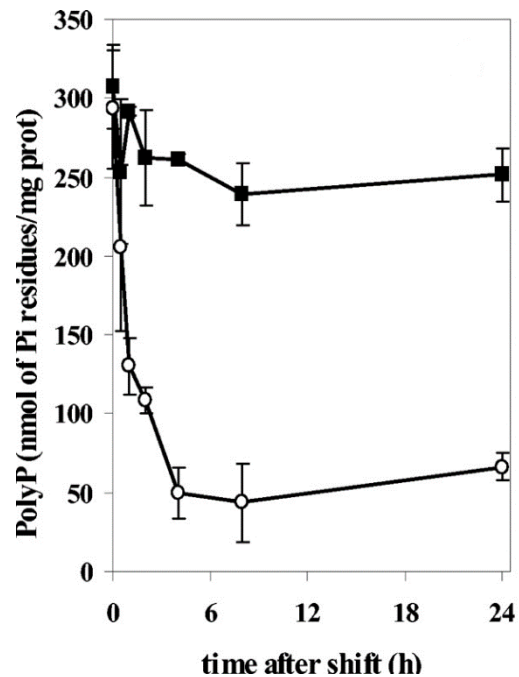


**Figura 4.** Esquema de la reacción enzimática catalizada por la enzima Exopolifosfatasa (PPX).

Los PoliP forman un importante depósito de fosfato y energía en células procariontas y eucariotas (Brown y Kornberg., 2004; Rao y cols., 2009). Algunas células procariontes tienen la capacidad de almacenar PoliP en forma de gránulos insolubles densos al paso de electrones visibles por microscopía electrónica o en forma soluble (Kulaev y Kulakovskaya., 2000). Sin embargo, no todos los tipos celulares presentan los mismos patrones de acumulación de PoliP. Algunas especies presentan gránulos densos al paso de electrones, que son claramente visibles bajo microscopía, mientras que en otros casos estos gránulos pueden resultar imperceptibles.

En la mayoría de los organismos, incluidos bacterias, arqueas y eucariotas, la tolerancia a metales fue relacionada con los niveles de PoliP (Kornberg y cols., 1999). El mecanismo de tolerancia a metales propuesto en *E. coli* se explica mediante un modelo que plantea que: I) la concentración intracelular de cationes estimula la hidrólisis de PoliP mediante la actividad de la Exopolifosfatasa, II) el fosfato liberado desde los PoliP es transportado al exterior de la célula y III) el transporte de los fosfatos al exterior celular es acompañado por los cationes, los cuales en muchos casos son metales tóxicos para las células de *E. coli* (Keasling., 1997, Grillo-Puertas y cols., 2014). En los microorganismos extremófilos esta hipótesis se sustenta principalmente en evidencia experimental que muestra un aumento en la actividad de la enzima PPX junto con una disminución en los niveles intracelulares de PoliP cuando se expone *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Alvarez y cols., 2004) o *Sulfolobus metallicus* (Remonsellez y cols., 2006) a la presencia de cobre (Orell y cols., 2012)

(Fig. 5). No obstante, dicha degradación posteriormente se detiene y sus niveles comienzan a recuperarse con el paso de las horas, lo que se considera es un importante mecanismo de respuesta rápida frente a la presencia de metales tóxicos.



**Figura 5.** Disminución del contenido de polifosfato durante la exposición a cobre. Las células de *A. ferrooxidans* se crecieron en medio de azufre en ausencia de cobre hasta la fase estacionaria temprana y se dividieron en dos porciones. A una se le añadió 20 mM CuSO<sub>4</sub> (○), y se añadió un volumen igual de medio fresco a la muestra control (▪). A continuación, ambos cultivos se incubaron a 30°C. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se cuantificó el polifosfato. Modificado de (Alvarez y cols., 2004).

Recientemente se reportó que una familia de proteínas se encuentra asociada a los gránulos de PoliP (Tumlirsch y Jendrossek., 2017). Estos autores identificaron dos proteínas en *Ralstonia eutropha* que poseen dominios CHAD (“Conserved Histidine Alpha-helical Domain”), y mediante su fusión a proteínas fluorescentes, observaron que estas proteínas co-localizan con los gránulos de PoliP. Este mismo fenómeno fue reportado en las bacterias *Magnetospirillum gryphiswaldense* y *Pseudomonas putida*, en base a lo cual Tumlirsch y Jendrossek proponen que

los polipéptidos de esta familia, denominadas en adelante proteínas CHAD, se encuentran asociadas *in vivo* a los gránulos de PoliP.

Por otro lado, mediante análisis bioinformáticos, el grupo de Lorenzo-Orts (Lorenzo-Orts y cols., 2019) reportaron la presencia de proteínas CHAD en los diferentes reinos de la vida. Según la base de datos Interpro cerca del 99% de las proteínas CHAD corresponden a bacterias, mientras que sólo 1% y 0,1% pertenecen a arqueas y eucariontes, respectivamente. Posteriormente, los autores caracterizaron la estructura y funcionalidad de las proteínas CHAD. Determinaron que por lo general estas proteínas comprenden dos dominios, correspondiente a CYTH (“CyaB and ThTPase”), ubicado en la región amino terminal, y un dominio CHAD, ubicado en la región carboxilo terminal. Se especula que estos dominios participan en el metabolismo de fosfatos y nucleótidos (Iyer-Aravind y cols., 2002). Mediante la fusión de los polipéptidos completos o los dominios individuales a proteínas fluorescentes, se evidenció que sólo el dominio CHAD es responsable de la unión a los PoliP, y que residuos básicos ubicados en dicho dominio son esenciales para esta asociación (Lorenzo-Orts y cols., 2019). A pesar que se han caracterizado bioquímicamente los dominios CHAD como proteínas de unión a PoliP, se desconoce la actividad biológica de estas proteínas.

No obstante, el grupo de Hinrichs (Werten y cols., 2019) sugiere que una proteína con dominio CHAD de *Streptomyces chartreusis* (denominada PptA), tiene un rol en el metabolismo, la movilización o la detección de polifosfatos. Esto se basa en la identificación de dos sitios distintos de unión a metales, en los que el ion metálico predominante era el ion cúprico. Estas observaciones sugieren que es posible que PptA actúe como un sensor o modificador de la concentración intracelular de  $\text{Cu}^{+2}$ , mientras que simultáneamente mide o afecta la disponibilidad de polifosfato (Werten y cols., 2019). Teniendo en cuenta que las proteínas CHAD presentan la capacidad de

unirse a los PoliP y a cobre (al menos el polipéptido de *S. chartreusis*), resulta interesante analizar la posibilidad de que estas proteínas tengan un rol en la homeostasis a cobre.

Considerando que la mayoría de los microorganismos que participan en biolixiviación contienen gránulos de PoliP en su citoplasma que los hacen altamente resistente a metales tóxicos presentes en su entorno (Orell y cols., 2010; Martínez y cols., 2017), es de especial interés identificar la presencia y la dinámica celular de las interacciones de esta familia de proteínas CHAD. Esto permitirá avanzar en el conocimiento del papel de estas proteínas en las adaptaciones microbianas a su entorno.

En base a lo anterior y continuando con el análisis de las proteínas con dominio CHAD, este trabajo se centró en el estudio de la participación de la proteína con dominio CHAD de *Escherichia coli*, correspondiente a la trifosfatasa inorgánica YgiF, en su resistencia a cobre.

*E. coli* es una bacteria Gramnegativa de la familia *Enterobacteriaceae*, utilizada ampliamente como microorganismo modelo dentro del dominio Bacteria. Esto se debe a su facilidad de cultivo, rápida reproducción y disponibilidad de herramientas moleculares para su modificación genética, altamente estandarizadas. Si bien *E. coli* no es una bacteria que forma parte del consorcio utilizado en biominería, se espera que los resultados obtenidos en esta tesis puedan ser extrapolados a microorganismos biolixivantes, los que poseen menos herramientas moleculares para su modificación.

## **HIPÓTESIS**

“Las proteínas con dominio CHAD participan en la resistencia a cobre en la bacteria modelo *Escherichia coli*”.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo general:

Estudiar el efecto de la carencia de las proteínas CHAD en la resistencia a cobre de *E. coli*, y analizar la dinámica celular de las interacciones de estas proteínas con los gránulos de PoliP ante la presencia y ausencia de  $\text{Cu}^{+1}$ .

### Objetivos específicos:

1. Generar de una mutante carente del gen que codifica la proteína YgiF de *E. coli*, y determinación de su resistencia a cobre.
2. Diseñar e implementar mutaciones sobre los sitios de unión a cobre de la proteína YgiF mediante cambios de aminoácidos utilizando mutagénesis sitio-dirigida por PCR.
3. Visualizar de la dinámica celular de la proteína YgiF mediante microscopía fluorescente en *E. coli*.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Cepas bacterianas y medios de cultivo**

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C y con una agitación orbital de 150 rpm, en medio Luria Bertani (LB) con el antibiótico adecuado cuando corresponda. El medio LB consistió en Triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L. Para la selección de clones, las células se crecieron en placas sólidas de LB-agar al 1,5% p/V, con el antibiótico adecuado. En el caso de carbenicilina se usó en una concentración de 100 µg/mL y 35 µg/mL para el cloranfenicol. Las inducciones se realizaron adicionando L-arabinosa 2 mM concentración final en el caso del vector pKD46 e IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) 1-2 mM concentración final para el vector pTrc-His2A.

### **2. Técnicas de biología molecular**

#### **2.1 Extracción de ADN genómico**

Para la extracción de ADN genómico se procedió según indicación del fabricante utilizando el kit “Genomic Wizard” ® (Promega). Se empleó un cultivo de noche y las células se recolectaron mediante centrifugación por 10 min a 4.000 x g. Se resuspendieron suavemente en 600 µL de la solución de lisis “Nuclei Lysis Solution” y se incubaron durante 5 min a 80°C para lisar las células. Tras enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 3 µL de solución de ARNasa y se agitó suavemente invirtiendo el tubo varias veces. Se incubó el lisado a 37°C durante 30 min, se enfrió a temperatura ambiente antes de agregar 200 µL de la solución precipitante de proteínas y se mezcló por vortex durante 20 s. La mezcla se incubó en hielo por 5 min y luego se centrifugó a 13.000 x g durante 3 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 mL limpio que contiene 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión hasta que las hebras de ADN formen una masa visible. Se centrifugó a 13.000 x g durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se lavó con 600 µL de etanol 70% una vez y se dejó evaporar los restos del alcohol durante 10 a 15 min. Finalmente, el ADN genómico obtenido se rehidrató

durante toda la noche a 4°C en 100 µL de la solución de rehidratación contenida en el kit. El ADN se cuantificó por espectrofotometría y su integridad se observó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7%. El ADN se almacenó a -20°C.

### 2.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro multi volumen Epoch (Biotek, USA). Para la pureza se acepta una razón  $Abs_{260}/Abs_{280} > 1,8$ .

### 2.3 Extracción y purificación de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante el método de la lisis alcalina, utilizando el kit “E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini” (Omega), siguiendo el protocolo especificado por el fabricante. Primeramente, se crecieron las células que contienen el plásmido de interés en las condiciones adecuadas. Las células se centrifugaron 1 min a 10.000 x g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 250 µL de solución I (50 mM glucosa, 20 mM 20 Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA (pH 8,0)), se agitó mediante un vortex para mezclar completamente. Posteriormente se agregaron 250 µL de solución II (20 mM NaOH, 1% SDS) e inmediatamente se invirtió el tubo suavemente varias veces hasta obtener un lisado claro. La muestra se incubó 2-3 min a temperatura ambiente, para luego agregar 250 µL de solución III (5 M acetato de potasio, ácido acético glacial) y se centrifugó durante 10 min a 13.000 x g. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo colector que contiene una mini columna de ADN dentro de éste, y se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µL de buffer HBC para luego volver a centrifugar durante 1 min a máxima velocidad. Luego se descartó el sobrenadante y se agregaron 700 µL de buffer de lavado de ADN y se centrifugó por 30 s a máxima velocidad. Se descartó el sobrenadante y se centrifugó el tubo colector con la columna vacía por 2 min a máxima velocidad para eliminar las trazas de etanol. Finalmente se

descartó el sobrenadante, se secó el sedimento, y el ADN se resuspendió en 50  $\mu$ L de agua de grado molecular.

### 2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para realizar las reacciones de PCR, se utilizó la enzima One-Taq o Pfu Ultra II, por lo que las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Para el caso de la enzima One-Taq, en cada reacción se usó 10  $\mu$ L de amortiguador 5X “One Taq Standard Buffer”, 10  $\mu$ M de partidores, 10 mM de dNTPs, 0,25  $\mu$ L de enzima One-Taq, 1  $\mu$ L de muestra y agua de grado molecular hasta un volumen final de 50  $\mu$ L.

En el caso de la enzima Pfu ultra II, en cada reacción se usó 5  $\mu$ L de amortiguador “10X Pfu Ultra II reaction buffer”, 10  $\mu$ M de partidores, 25 mM de dNTPs, 1  $\mu$ L de enzima Pfu Ultra II, 1  $\mu$ L de muestra y agua de grado molecular hasta un volumen final de 50  $\mu$ L. Para la amplificación se utilizó un programa de 30 ciclos con temperatura de “annealing” variables, dependiendo de los partidores utilizados (al menos 5°C menos que la Tm menor de la pareja de partidores).

### 2.5 Electroforesis de ácidos nucleicos

Para visualizar el resultado de los diferentes PCR realizados, el producto obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en tampón TAE 1X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 1 mM EDTA). Todas las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25 % de bromofenol, 40 % sacarosa) utilizando “Gel Green Nucleic Acid Gel Stain” (1000X) como tinción del gel. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 kb plus “DNA Ladder” (NEB). Las electroforesis se realizaron a 90 V durante 45 min. Las muestras se visualizaron mediante un transiluminador de luz azul.

### 2.6 Purificación de ADN desde geles de agarosa

La extracción de ADN desde geles de agarosa se realizó utilizando el kit “E.Z.N.A. Gel Extraction”, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras realizar la electroforesis en gel de agarosa, se cortó el fragmento de interés desde el gel y se insertó en un tubo eppendorf limpio de 1,5 mL al cual se le agregó 600  $\mu$ L de XP2 “binding buffer”, y se incubó a 60°C durante 7 min o hasta que el gel se derritiera completamente. Se mezcló el contenido mediante el vortex cada 2 min. Luego, se transfirieron no más de 700  $\mu$ L de la solución ADN/agarosa a una mini columna de ADN contenida en un tubo colector de 2 mL, para luego centrifugar la columna a 10.000 x g por 1 min y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta transferir toda la muestra a la columna. Luego, se agregó 300  $\mu$ L de XP2 “binding buffer”. Se centrifugó a máxima velocidad por un minuto y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 700  $\mu$ L de “SPW buffer” previamente diluido con etanol 100%, se centrifugó a máxima velocidad por 1 min y se descartó el sobrenadante. Finalmente, la columna se centrifugó a máxima velocidad por 2 min para eliminar trazas de etanol, y posteriormente se transfirió a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL, se añadieron 50  $\mu$ L de agua de grado molecular, dejándola reposar en la columna de ADN 2 min, para luego ser centrifugada a máxima velocidad por 1 min. El ADN extraído está contenido en el sobrenadante, el cual se guarda a -20°C.

### 2.7 Digestión y ligación de ADN

En este trabajo se emplearon las enzimas de restricción *BamHI*, *Sall*, *HindIII* y *NcoI*. Para las primeras dos se utilizó el buffer NEBuffer™ r3.1, y para la siguiente pareja NEBuffer™ r2.1, respectivamente.

Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ L, que contenían, en el caso de las enzimas de restricción *BamHI* y *Sall*: 5  $\mu$ L de 10X NEBuffer™ r3.1, 1  $\mu$ L (10 U) de la enzima *BamHI* y 1  $\mu$ L (10U) de la enzima *Sall*, 1  $\mu$ g de ADN y agua de grado molecular hasta

llegar al volumen final. Las reacciones se llevaron a cabo durante 1 hora en un baño termostático a 37°C. Posteriormente se inactivó la enzima durante 20 min a 65°C en un “termoblock”. Los fragmentos de ADN obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Para las enzimas de restricción *HindIII* y *NcoI*, las reacciones de 50 µL contenían: 5 µL de 10X NEBuffer™ r2.1, 1 µL (10 U) de la enzima *HindIII* y 1 µL (20 U) de la enzima *NcoI*, 1 µg de ADN y agua de grado molecular hasta llegar al volumen final. Las reacciones se llevaron a cabo durante 1 hora en un baño termostático a 37°C. Posteriormente se inactivó la enzima durante 20 min a 80°C en un “termoblock”. Los fragmentos de ADN obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Finalmente, para ligar fragmentos a vectores se ocupó una relación 1:2 o 1:3 de vector-inserto, dependiendo de la diferencia de tamaño de estos, y de la concentración en que se encuentren. Esta relación se utiliza para que haya un exceso del inserto al momento de ligar. Esto evita que el vector se ligue consigo. La reacción contiene: 2 µL de “T4 DNA Ligase Reaction Buffer”, 1 volumen de vector y 2-3 volúmenes de inserto purificado, 1 µL de ligasa T4 y agua de grado molecular hasta llegar al volumen final. Se dejan ligando toda la noche a 4°C para posteriormente ser transformados en la bacteria receptora previamente preparada.

### 2.8 Generación de células competentes de *E. coli* Bw25113

Para generar células competentes se empleó la cepa Bw25113 a partir de una solución stock almacenada en glicerol a -80°C. Se creció durante toda noche en medio LB a 37°C y con agitación orbital constante de 150 rpm.

De este cultivo se tomó una alícuota para inocular en medio LB fresco, el cual se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar la fase exponencial, es decir, una D.O.<sub>600</sub> de 0,5 – 0,7. Una

vez alcanzada la D.O. deseada, el cultivo se centrifugó a 4.000 x g durante 15 min a 4°C. Las células se lavaron 3 veces con glicerol al 10% frío. Luego, el sedimento se resuspendió en 1 mL de glicerol al 10%, y se almacenó en alícuotas de 50 µL a -80°C hasta ser utilizadas.

### 2.9 Transformación de *E. coli* Bw25113

Para transformar *E. coli* Bw25113, se descongelan las células competentes en hielo. Se transfirieron 60 µL de las células y 10-5 µL del producto PCR-plásmido, respectivamente, a cubetas de electroporación de 2 mm previamente enfriadas y se aplicó un pulso de 1800 V, 600 Ohm y 25 µF. Rápidamente las células se recuperaron en medio LB por 1-2 horas. Luego las células se sembraron en placas de primera selección compuestas por medio LB sólido (1,5%) y el antibiótico correspondiente, y se crecieron a 37°C durante 2 días. Se seleccionaron colonias a partir de las placas y se realizó un PCR para chequear la correcta inserción del plásmido o producto PCR. Las colonias positivas se crecen en medio líquido LB-antibiótico a 37°C durante toda la noche, para luego guardadas en el cepario a -80°C.

### 2.10 Construcción del mutante *ygiF*

Para el desarrollo de la cepa mutante nula *ygiF* (*ygiF::cm*) se empleó la técnica desarrollada por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner., 2000). Esta técnica, utiliza la recombinasa Lambda-Red para modificar genes cromosómicos mediante la eliminación de un gen endógeno de interés y la inserción de un fragmento exógeno en su lugar. El fragmento es generado mediante PCR, utilizando partidores que contienen en los extremos de sus secuencias al menos 40 pb de homología con el gen de interés. Estos partidores permiten amplificar el fragmento deseado, generalmente un casete de resistencia a antibióticos, para su posterior inserción mediante electroporación en la cepa objetivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Primeramente, se realizó una reacción de PCR utilizando el vector pKD3 como molde. Este vector comprende un casete de resistencia a cloranfenicol (Fig. S1). Para la amplificación se emplearon partidores “híbridos” (ygiF H1P1 e ygiF H2P2, ver tabla S1), que comprenden al menos 40 pb de identidad con el gen *ygiF* en la región 5' del partidor (región H, o de homología), y 20 pb de identidad con el vector pKD3 en la región 3' (región P1 y P2) que flanquean un casete de resistencia a cloranfenicol.

La reacción de PCR se llevó a cabo mediante 30 ciclos, con una temperatura de “annealing” de 50°C (para más detalles del programa de PCR, ver tabla S2). Como resultado se obtuvo un producto de PCR con al menos 40 pb de identidad respecto al gen *ygiF* que flanquean al casete de resistencia a cloranfenicol. El producto de PCR del tamaño esperado (1 Kb), se purificó a partir del gel de agarosa utilizando el kit “EZNA Gel extraction”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Simultáneamente, la cepa *E. coli* receptora (Bw25113) se transformó con el vector pKD46, que contiene un inhibidor de la exonucleasa V que permite transformar con productos de PCR lineales, y la recombinasa Lambda-Red (Fig. S2). Este vector posee un origen de replicación termosensible, por lo que cuando la bacteria receptora se transforma y selecciona con 100 µg/mL de carbenicilina, el crecimiento debe realizarse a 30°C.

A continuación, el producto PCR purificado obtenido en el paso anterior se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* Bw25113 que portaban el plásmido pKD46. Luego de un periodo de 2 horas de recuperación en medio LB sin antibiótico a 37°C, las células mutantes se seleccionaron en medio sólido con cloranfenicol a 37 °C. A esta temperatura, el vector pKD46 no se replica y se pierde. Las placas se incubaron durante la noche y las colonias se replicaron en nuevas placas de LB-cloranfenicol, las cuales se dejaron crecer toda la noche a 37°C.

Las colonias obtenidas se cultivaron en medio líquido y se verificó su inserción mediante PCR utilizando los partidores externos específicos para el gen *ygiF* (*ygiF* rve e *ygiF* fwe, más detalles en tabla S1). Se esperaba obtener un producto de amplificación correspondiente al tamaño del gen *ygiF* (1300 pb) en la cepa no modificada. Si se produjo la inserción del casete de resistencia a cloranfenicol, se esperaba obtener un amplificado de aproximadamente 1000 pb correspondiente al casete insertado.

Las colonias analizadas que incorporaron el casete de resistencia a cloranfenicol en el gen *ygiF*, generando la mutación (denominadas *ygiF::cm*), se cultivaron en medio líquido LB/cloranfenicol y se conservaron en el cepario a -80°C para su uso posterior en los ensayos de resistencia a cobre.

### 2.11 Clonamiento y expresión de proteínas CHAD

Considerando la naturaleza modular de las proteínas CHAD (dominio CYTH y dominio CHAD), para profundizar en la caracterización del rol que tiene la proteína YgiF en la resistencia a cobre, se clonó el gen *ygiF* de *E. coli*, así como sus dominios individualmente para complementar la cepa *ygiF::cm*, además del gen de la proteína CHAD de la bacteria acidófila *A. ferrooxidans* (*afe\_1874*).

Para los ensayos de expresión de YgiF y sus dominios se utilizó el vector pTrc-His2A, cuyo promotor es Trc, de expresión fuerte e inducible por IPTG (Fig. S3). El vector comprende un gen de resistencia a ampicilina, y un sitio de múltiple clonamiento (MCS), flanqueado por los sitios de corte de las enzimas de restricción *NcoI* e *HindIII*, por lo que los partidores para los clonamientos se diseñaron incluyendo estos sitios de corte. Los partidores utilizados para el clonamiento de *ygiF* y sus dominios, así como *afe\_1874* se muestran en la tabla S1.

Primeramente, se desarrollaron reacciones de PCR utilizando las parejas de partidores de la tabla antes descrita, utilizando como molde ADN genómico de *E. coli*, 35 ciclos, y una temperatura de “annealing” de 50°C. Las reacciones amplificaron la secuencia del gen *ygiF*, *afe\_1874*, *CHAD* y



*CYTH*. Estos productos PCR se purificaron mediante el kit “EZNA Gel Extraction Kit”, digeridos y ligados al vector pTrc-His2A también previamente digerido. Luego, las reacciones de ligación (pTrcHis2A-*ygiF*; pTrcHis2A-*afe\_1874* pTrcHis2A-*CHAD* y pTrcHis2A-*CYTH*) fueron transformadas en la cepa *ygiF::cm*, y seleccionadas en placas LB-carbenicilina. Las colonias transformantes se replicaron en nuevas placas con selección de antibióticos. A estas colonias se les extrajo los plásmidos, y se corrieron en un gel de agarosa al 1% utilizando el vector pTrc-His2A sin inserto como control de tamaño. Los clones analizados que tienen un tamaño mayor al vector sin inserto sugieren que incorporaron el inserto deseado. Para determinar si dicho inserto tiene el tamaño esperado, se digirieron estos vectores con las enzimas *NcoI* y *HindIII*. Al realizar esta digestión, los clones liberaron un fragmento de inserto con el tamaño esperado, que correspondía a 1300, 1500 y 650 pb, respectivamente. Por lo tanto, se crecieron en medio líquido LB-carbenicilina, y guardaron en el cepario a -80°C para su posterior utilización en los ensayos de resistencia a cobre.

### 2.12 Mutación sitio-dirigida

La mutación sitio-dirigida se llevó a cabo mediante PCR. Esta estrategia consiste en introducir una mutación en un segmento de ADN mediante PCR, utilizando un par de partidores que amplifiquen los extremos del fragmento de ADN de interés (par no mutagénico), y otro par de partidores mutagénicos que sean complementarios a una región interna del fragmento de ADN, conteniendo la mutación en su secuencia y siendo perfectamente complementarios entre sí (Ho y col., 1989).

Al combinar un partidador “forward” con uno “reverse” de cada par de partidores (mutagénicos y no mutagénicos), se generan dos fragmentos denominados PCR1 y PCR2, los cuales son complementarios en el extremo generado a partir del partidador mutagénico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los partidores mutagénicos (ygiFH349Afd, ygiFH349Arv, ygiFH345Afd e ygiFH345Arv) se diseñaron conteniendo sitios de cambio de pares de bases entre la secuencia del partidor “forward” del PCR1 y el complemento del sitio de cambio, entre la secuencia del partidor “reverse” del PCR2. Los fragmentos PCR1 y PCR2 se obtuvieron mediante una reacción de PCR de 30 ciclos con una temperatura de “annealing” de 56°C. Posteriormente se purificaron dos desde el gel mediante el “kit EZNA Gel extraction”.

Una vez obtenido los dos fragmentos PCR1 y PCR2, se fusionaron mediante una PCR de solapamiento, aprovechando la región de cambio que comparten los partidores mutagénicos de los amplificadores PCR1 y PCR2. Este PCR generó una reacción de amplificación denominada PCR12. Finalmente, luego de 10 ciclos sin partidores, se desarrolló una nueva reacción de PCR utilizando la reacción PCR12 como molde junto con los partidores externos (ygiF rve e ygiF fwe), para amplificar el constructo que contiene la mutación del gen de la proteína YgiF.

Se utilizó la misma técnica para generar la doble mutante, que contiene ambas histidinas (His345 e His349) mutadas. El fragmento obtenido se purificó desde el gel, digirió con las enzimas de restricción *HindIII* y *NcoI* (al igual que el vector pTrc-His2A) y luego se ligaron al vector.

Las ligaciones: pTrc-ygiF\*H345A, pTrc-ygiF\*H349A y pTrc-ygiF\*H345A,H349A se transformaron en la cepa ygiF::cm. Las colonias transformantes se cultivaron en medio líquido con carbenicilina y posteriormente se analizaron para confirmar la correcta inserción del vector. Se les extrajo el vector a estas colonias para utilizarlo como molde en una reacción de PCR que utiliza la pareja de partidores específicos para amplificar el gen ygiF. Este producto PCR se purificó y envió a secuenciar para confirmar la mutación (Figs. S11 y S12).

### 2.13 Construcción de fusiones con proteínas fluorescentes

Para analizar las interacciones y dinámica celular de la proteína YgiF en *E. coli*, se generaron construcciones moleculares que consisten en fusionar el gen *ygiF* y el gen que codifica para la proteína fluorescente roja (RFP), la variante monomérica DsRed.M1.

Se utilizó el vector pUC-IDT como base para estas construcciones moleculares, el cual contiene el gen codificante para la proteína fluorescente roja. Como se mencionó anteriormente, las proteínas CHAD se asocian a los gránulos de PoliP mediante el dominio CHAD, que se encuentra en la región carboxilo terminal. Por lo tanto, se insertó una región espaciadora (región “linker”) de 15 aminoácidos entre la proteína CHAD y RFP, para permitir un plegamiento independiente entre ambos polipéptidos. El esquema general de la proteína de fusión se esquematiza en la figura 25.

Para generar construcciones moleculares, se desarrollaron 2 reacciones de PCR. En la primera reacción se utilizó el vector pUC-IDT-RFP como molde, utilizando los partidores *rfp\_fwe* y *lk\_rev* para amplificar la región de la proteína fluorescente roja y la región “linker”. Este amplificado se denominó PCR1. En paralelo, se desarrolló la otra reacción de PCR utilizando como molde el ADN genómico de *E. coli*, y los partidores *lk\_fw* e *ygiF\_rev* para amplificar el gen *ygiF* y la región “linker”. Este amplificado se denominó PCR2. Una vez obtenidos los amplificados PCR1 y PCR2, se desarrolló una reacción de PCR de solapamiento de 10 ciclos sin partidores utilizando la polimerasa Pfu, y aprovechando la región compartida de los dos productos PCR (región “linker”). Esto generó un amplificado denominado PCR12. Finalmente, se desarrolló una nueva reacción de PCR utilizando la reacción PCR12 como molde, junto con los partidores externos, es decir, *rfp\_fwe* e *ygiF\_rev* para amplificar el gen completo *RFP-ygiF*.

Aunque *E. coli* tiene la capacidad de acumular PoliP, no genera gránulos visibles por microscopía. Por lo tanto, para el desarrollo de estos experimentos se utilizó una cepa de *E. coli* con una

mutación en el gen *phoU*. Esta mutación permite la acumulación de grandes cantidades de PoliP intracelulares en *E. coli* (Morohoshi y cols., 2002), que se pueden ver fácilmente por microscopía como gránulos.

Los fragmentos y el vector pTrc-His2A se digirieron con las enzimas de restricción *BamHI* y *Sall*. Luego, los fragmentos se ligaron al vector y transformaron en la cepa de *E. coli*  $\Delta phoU$  para su posterior análisis mediante microscopía fluorescente.

### 3. Ensayos de resistencia a cobre

Para determinar si la ausencia de la proteína YgiF tiene un efecto en la resistencia a cobre en *E. coli*, se inició un cultivo líquido de la cepa silvestre de *E. coli* (Bw25113), y de la mutante *ygiF::cm*, y cuando alcanzaron una D.O.<sub>600</sub> de 0,1, se agregó 3 o 3,5 mM de CuSO<sub>4</sub> (MIC<sub>cobre</sub> reportada 3 mM, Franke y cols., 2003). A este punto se le considera el tiempo 0. Se mantuvieron los cultivos líquidos de las cepas a 37°C con agitación, y se midió la D.O.<sub>600</sub> cada 1 hora durante 8 horas posterior a la exposición al metal. Se hizo lo mismo para las cepas mutantes complementadas  $\Delta ygiF$ -*ygiFc*;  $\Delta ygiF$ -*Afec*;  $\Delta ygiF$ -*CHADc* y  $\Delta ygiF$ -*CYTHc*

Para cuantificar los resultados obtenidos se realizaron 3 réplicas biológicas.

### 4. Análisis bioinformáticos

Se analizó el contexto génico de las proteínas CHAD mediante las herramientas bioinformáticas “Cblaster” y “Clinker”, disponibles en la página web “CAGECAT” (“CompArative GEne Cluster Analysis Toolbox <https://cagecat.bioinformatics.nl/>).

Posteriormente se realizó un análisis estructural de los cristales de las proteínas CHAD disponibles en la base de datos PDB, más la proteína CHAD de *A. ferrooxidans* disponible en el portal AlphaFold. De esta manera, los archivos “.pdb” de los cristales de las proteínas CHAD se incorporaron en el programa VMD (Visual Molecular Dynamics).

Luego, para evaluar si es que la proteína YgiF de *E. coli* posee sitios de unión a  $\text{Cu}^{+1}$ , se realizó una búsqueda preliminar de los sitios de unión a cobre en la proteína YgiF de *E. coli*, en el servidor MIB (“Metal Ion-Binding site prediction and docking server”), el cual predice los sitios de unión de metales en proteínas con estructura cristalizada, y permite ver la interacción a nivel estructural y también el modelo teórico en el cual se basa la predicción.

Una vez encontrados los aminoácidos predichos por MIB a los cuales el  $\text{Cu}^{+1}$  se uniría, se realizó un análisis PSI-BLAST utilizando como referencia YgiF de *E. coli* (GenBank: VWQ04226.1), para encontrar homólogos remotos. Las secuencias arrojadas por el PSI-BLAST fueron alineadas con el algoritmo BLAST, el cual permite hacer alineamientos locales múltiples. Estos resultados fueron exportados en un archivo de alineamiento, y analizado utilizando el software Jalview. También se realizó otro análisis PSI-BLAST utilizando como objetivo de búsqueda especies de los géneros *Acidithiobacillus* (taxid:119977), *Sulfobacillus* (taxid:28033), *Thiobacillus* (taxid:919), *Leptospirillum* (taxid:179) y *Acidimicrobium* (taxid:53634), conocidas por formar parte de los consorcios que desarrollan biominería y ser muy resistentes a metales pesados, principalmente cobre y cadmio. Las secuencias se alinearon con el mismo algoritmo y se visualizó el resultado en Jalview. Finalmente, se hizo un alineamiento con las secuencias de las proteínas CHAD cristalizadas disponibles en el portal PDB, correspondientes a *Chlorobium tepidum* (Acceso No:3E0S), *Ricinus communis* (Acceso No: 6QV5), *Streptomyces chartreusis* (Acceso No:6RN5) y *Escherichia coli* (proteína YgiF, Acceso No: 5A60).

### **5. Métodos de extracción y purificación de polifosfato (PoliP)**

#### 5.1 Extracción de PoliP

La extracción de PoliP se realizó como se describe en Soto y col., 2019. Para extraer polifosfatos se cultivaron células hasta fase exponencial tardía/estacionaria temprana, y se recolectaron en alícuotas de 5 mL del cultivo mediante centrifugación durante 15 min a 4.000 x g. Posteriormente

el sedimento (20-30 mg de peso húmedo) se resuspendió en 300  $\mu$ L de buffer de resuspensión (4 M GITC, 50 mM Tris-HCl pH 7,0) y lisaron por calentamiento a 95°C durante 3 min, tras lo cual se añadieron 30  $\mu$ L de SDS al 10% y se calentaron por 2 min más. Se apartó un volumen de 30  $\mu$ L para determinar proteínas por el método de Bradford y al resto se le añadió etanol al 70% y perlas de sílice que adhieren los PoliP a su superficie. Se volvió a calentar a 95°C por 3 min, se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Se lavaron las perlas con buffer “New Wash” (5 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50% Etanol), y luego se trataron por 30 min a 37°C con un buffer que contiene nucleasas (50 mM TrisHCl pH 7,0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ g/mL DNAsa, 5  $\mu$ g/mL RNAsa). Las perlas se lavaron dos veces con buffer “New Wash” y finalmente los PoliP se liberaron en dos rondas agregando 100  $\mu$ L de agua nanopura y calentando 2 min a 95°C.

### 5.2 Cuantificación de PoliP

Se emplearon 30  $\mu$ L de la solución que contiene PoliP, los cuales se sometieron a hidrólisis ácida con 30  $\mu$ L de HCl 1 N durante 30 minutos a 95°C para liberar fosfato inorgánico. Posteriormente, la solución que contiene PoliP se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 60  $\mu$ L de un tampón Tris 1,5 M a cada tubo. La cuantificación se llevó a cabo con el kit “EnzChek Phosphatase Assay”. Este método se basa en la hidrólisis ácida de los PoliP y posterior reacción del Pi liberado con el reactivo 2- amino-6-mercapto-7-metil purina ribósido (MESG), gracias a la acción de la enzima Purin Nucleósido Fosforilasa, para dar 2-amino-6-mercapto-7- metil purina, cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 360 nm. La cantidad de PoliP obtenida se normaliza por la cantidad de proteínas.

## **6. Métodos para el análisis de proteínas**

### 6.1 Cuantificación de proteínas mediante el método colorimétrico Bradford

Las proteínas se cuantifican por el método de Bradford, utilizando el reactivo BCA (Pierce®) midiendo la absorbancia a 595 nm usando una curva estándar de seroalbúmina bovina.

El kit utilizado fue el Kit “Coomassie Plus™ (Bradford) Assay” (Thermo Scientific) con límites de detección (100 – 1500 µL). Para cuantificar proteínas con este kit, en una placa de 96 pocillos se agregaron 250 µL de reactivo de Bradford (“Coomassie dye Binding protein Reagent”) en cada pocillo, y sobre éstos 5 µL de cada estándar, además de las muestras (proteínas). Se mezclan bien por 30 s y se incubó la placa por 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se mide la absorbancia a 595 nm.

### **7. Tinción y montaje de células**

Se tomó una alícuota de 500 µL de un cultivo en fase exponencial tardía, y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% p/v concentración final durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 0,05% p/v durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente, se tomaron 12 µL de las células teñidas y se depositaron en un montaje de agarosa sobre un portaobjetos de 22 x 22 mm.

### **8. Microscopía Confocal Laser**

Se visualizaron las células de *E. coli* y sus gránulos de PoliP en el Microscopio confocal Zeiss LSM 710. Para la adquisición de imágenes se utilizó el láser 405 nm de detección específica de la señal del fluoróforo del DAPI, y un filtro de detección de 410-484 nm. Se distinguen dos interacciones: DAPI-PoliP con una banda de emisión de 490-520 nm y DAPI-ADN con una banda de emisión de 410-430 nm. Para visualizar la proteína fluorescente roja se ocupó el láser 543 nm y se detectó con una longitud de emisión de 550-580 nm.

Todas las micrografías se obtuvieron con un objetivo Plan-Apochromat/63x Oil. El microscopio se operó con el programa Zeiss 2.3 lite (Zeiss®). Las imágenes se procesaron con el software Fiji (ImageJ) (Schindelin y col, 2012). Para facilitar la visualización del canal RFP, todas las imágenes se sometieron al mismo aumento de brillo.

### 9. Análisis estadísticos

Los gráficos y análisis estadísticos se realizaron utilizando el software “GraphPad Prims 6 Prism” (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Para comparar dos o más grupos independientes se utilizó el test de Anova de una o dos vías. Test de Tukey si hay diferencias significativas. La significancia se estableció en ns no significativo,  $p < 0,05$ ; donde \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  y \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



## **RESULTADOS**

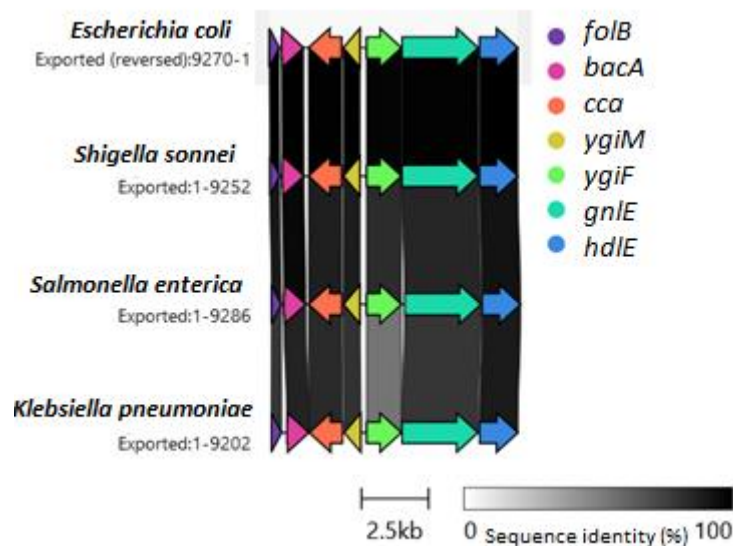
### **1. Identificación del contexto génico de las proteínas CHAD**

Como se mencionó anteriormente, las proteínas CHAD se encuentran en los tres reinos de la vida, predominantemente en bacterias (Lorenzo-Orts y cols., 2019). No obstante, pese a su ubiquidad, su función sigue siendo desconocida, más allá de su unión a los gránulos de PoliP.

A menudo, genes que participan en rutas biológicas se encuentran agrupados en regiones génicas cercanas, cuya comparación puede dar información relevante sobre su función (Gilchrist y Chooi., 2021). Se ha reportado que los genes que codifican para proteínas CHAD suelen formar parte de grupos con genes del metabolismo de los PoliP, por lo que se ha especulado que su función estaría asociada a dicho metabolismo (Moya-Beltran y cols., 2019; Werten y cols., 2019; Iyer-Aravind y cols., 2002). Por lo tanto, se analizó el contexto génico del gen codificante para la proteína CHAD del género *Enterobacterias*.

Para aquello se descargó el genoma completo (número de acceso: NC\_000913) desde la base de datos NCBI, luego se ubicó el gen *ygiF* y se tomaron 4 kb flanqueantes en cada extremo del gen. Este conjunto de genes (10 kb) se descargó y se utilizó como secuencia de consulta en la herramienta de análisis “Cblaster”, para detectar y analizar la conservación de este grupo de genes en diversas especies. Una vez terminado el análisis por la herramienta “Cblaster”, los contextos génicos de cada microorganismo representativo del género *Enterobacteria* se descargaron y utilizaron posteriormente en un análisis “Clinker”, con el cual se alinean los grupos de genes. La

herramienta bioinformática Clinker analiza la similitud de secuencia y grado de conservación. El resultado de estos análisis se muestra en la Fig. 6.

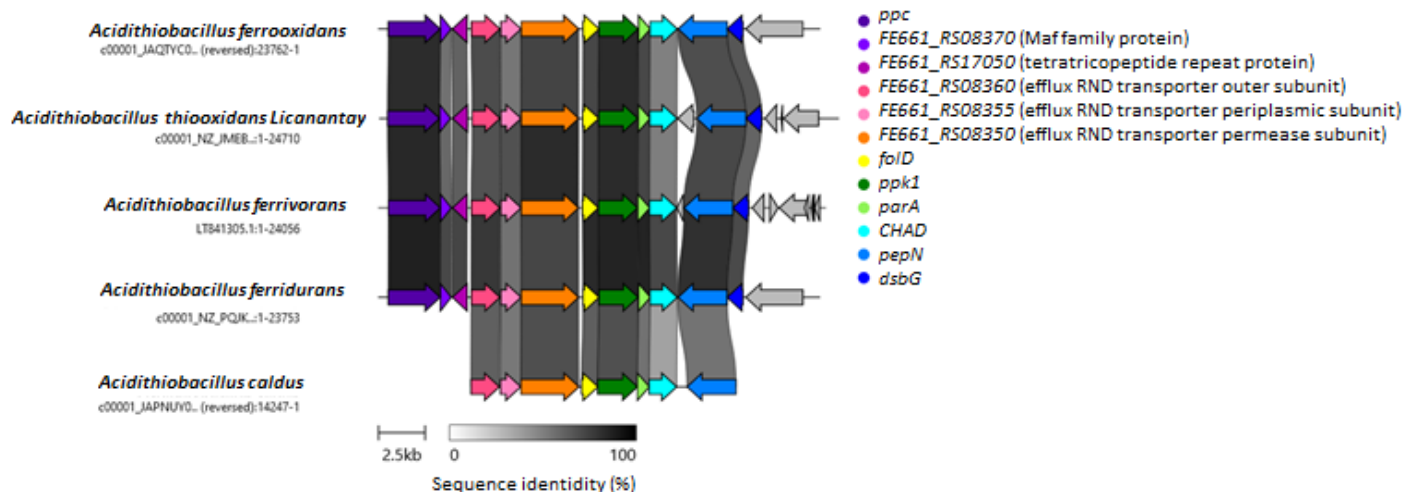


**Figura 6.** Análisis del contexto génico de las proteínas CHAD en algunas *Enterobacterias*.

El contexto génico del gen codificante para la proteína CHAD en todas las especies analizadas dentro del grupo *Enterobacterias* es altamente conservado. El gen *hdlE* está relacionado con la biosíntesis del lipopolisacárido (LPS), *glnE* al metabolismo del nitrógeno, *cca* con la maduración funcional de los tRNA, *bacA* con la síntesis de la pared celular y *folB* con la síntesis de tetrahidrofolato (THF), un cofactor relevante en la biosíntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos.

Si bien el contexto génico de *ygiF* no da señales relevantes sobre alguna posible función, este se encuentra conservado dentro de *Enterobacterias*. De esta manera, cabe preguntarse si dentro de otros grupos también el contexto génico del gen que codifica para las proteínas CHAD se conserva. En base a lo anterior, se analizó también el contexto génico de las proteínas CHAD en

bacterias tolerantes a metales, como las del género *Acidithiobacillus*. El resultado de estos análisis se muestra en Fig. 7.



**Figura 7.** Análisis del contexto génico de las proteínas CHAD en *Acidithiobacillus*.

El contexto génico del gen codificante para la proteína CHAD en todas las especies analizadas dentro del grupo *Acidithiobacillus* es bastante similar. Particularmente está muy conservado el grupo de genes formado por *folD*, *ppk*, *parA* y *CHAD*. El gen *folD* está relacionado al metabolismo de NADP; *ppk* (Polifosfato quinasa) a la formación de PoliP; y *parA* a la partición efectiva de plásmidos en *E. coli*.

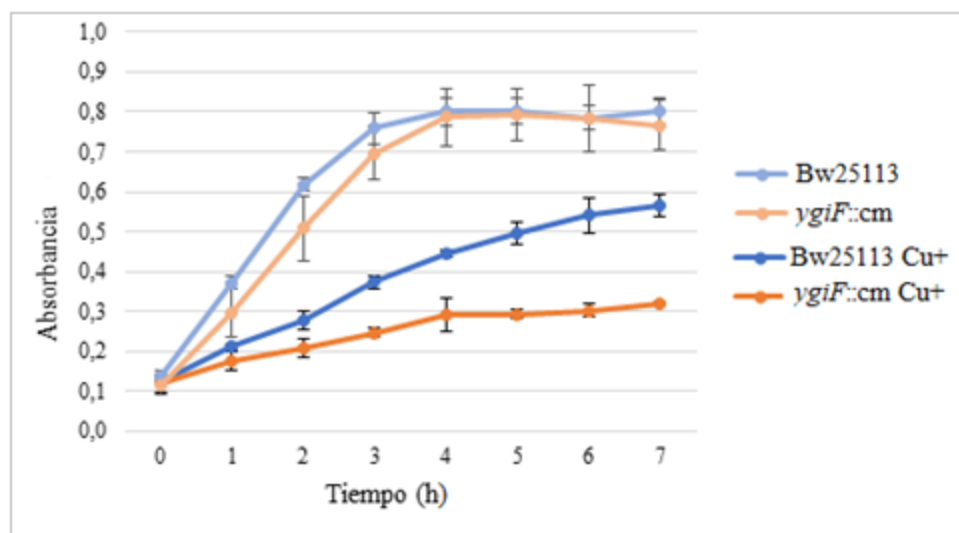
Dado que aparentemente las proteínas CHAD tendrían relación con el metabolismo de los PoliP, los cuales han sido relacionados con la resistencia al cobre (Orell y cols., 2010, Rashid y cols., 2000), y se ha reportado que la proteína CHAD de *S. chartreusis* posee sitios de unión al metal, resulta interesante considerar la posibilidad de que este polipéptido esté involucrado en la resistencia al metal. En base a lo anterior, se evaluó el efecto de la carencia del gen *ygiF* de *E. coli* en su sensibilidad a cobre.

### 1.1 Efecto de la carencia del gen endógeno *ygiF* en la resistencia a cobre en *E. coli*

La caracterización y análisis funcional de las proteínas CHAD se llevaron a cabo en la bacteria modelo *Escherichia coli*. Se generó una cepa mutante que carece de la proteína CHAD endógena, en este caso correspondiente a la trifosfatasa inorgánica YgiF. Para esto se utilizó la técnica de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner., 2000), que permite alterar genes cromosómicos mediante el sistema Red del fago lambda. Esta técnica se describe en detalle en la sección 2.10 de materiales y métodos.

#### Ensayos de resistencia al cobre

Se realizaron ensayos de resistencia al cobre en las cepas *ygiF::cm* para evaluar su sensibilidad al metal. Para ello, se iniciaron cultivos celulares de la cepa silvestre, y la cepa mutante nula *ygiF::cm* en medio LB a 37°C y cuando llegaron a una densidad óptica 0,1 se les añadió 3,5 mM de CuSO<sub>4</sub> al medio de cultivo. El crecimiento de las cepas, con y sin cobre se midió durante 7 horas (Fig. 8).



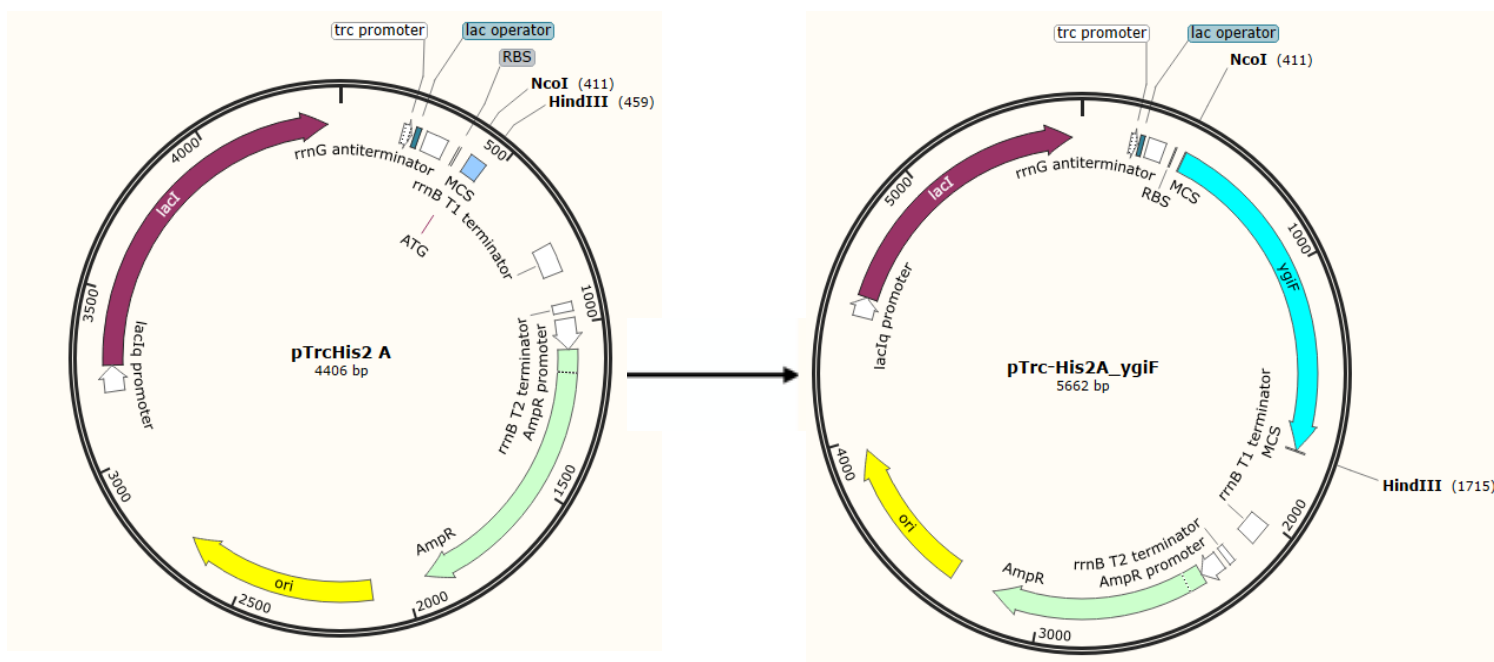
**Figura 8.** Efecto de la proteína YgiF en la resistencia a cobre en la cepa silvestre y mutante nula *ygiF::cm* de *E. coli*. Las mediciones corresponden al promedio de tres réplicas biológicas.

Cuando la cepa *ygiF::cm* se expone a cobre, su crecimiento se ralentiza, lo que demuestra su mayor sensibilidad al cobre respecto a la cepa silvestre. Las diferencias observadas en el crecimiento de ambas cepas son estadísticamente significativas a partir de las 2 horas, y esta diferencia se acentúa a medida que transcurre el tiempo (Fig S4).

Por otro lado, se observa que el crecimiento en condiciones controles (sin cobre) de ambas cepas, es casi el mismo. Esto sugiere que la sensibilidad al cobre observada se debe a la ausencia del gen *ygiF*, y no a defectos inherentes al crecimiento de la cepa *ygiF::cm*.

1.2 Clonamiento y expresión de proteínas CHAD bacterianas y sus dominios individuales

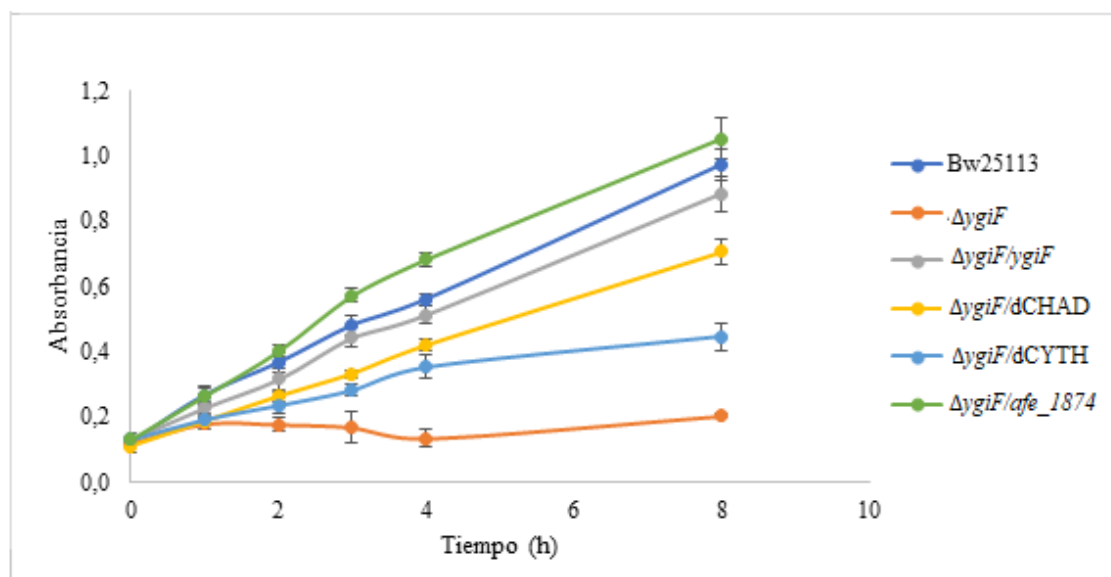
Para confirmar que la ausencia de la proteína YgiF es la responsable del fenotipo más sensible que observa en la cepa *ygiF::cm* se clonaron el gen *ygiF* de *E. coli* y sus dominios individuales con el objetivo de complementar la cepa *ygiF::cm*. Además, se clonó el gen *afe\_1874* de *A. ferrooxidans*, una bacteria extremófila conocida por tolerar altos niveles de cobre y que codifica para una proteína CHAD. Estos genes se clonaron en la cepa *ygiF::cm* utilizando el vector pTrc-His2A, que posee un promotor fuerte e inducible por IPTG. El mapa de la construcción generada se muestra en la figura 9, utilizando el gen *ygiF* como ejemplo.



**Figura 9.** Esquema del clonamiento del gen *ygiF* al vector de expresión pTrc-His2A.

Ensayos de resistencia a cobre de las cepas complementarias

Una vez obtenidas las cepas complementadas, se evaluó su sensibilidad al cobre mediante ensayos de resistencia al metal. Las cepas *ygiF*::cm que comprenden las construcciones se denominaron: *ygiF* (pTrcHis2A-*ygiF*), CHAD (pTrcHis2A-*CHAD*), *CYTH* (pTrcHis2A-*CYTH*) y *Afe* (pTrcHis2A-*afe\_1874*). Los resultados de estos ensayos se muestran a continuación:



**Figura 10.** Resistencia a cobre de diferentes mutantes de *E. coli*. Se determinó el efecto del metal en el crecimiento la cepa silvestre de *E. coli* (**Bw25113**), la mutante *ygiF*::cm ( $\Delta ygiF$ ) y las cepas mutantes complementadas. Las células se crecieron en medio LB suplementado con 1 mM de IPTG, en ausencia de cobre, hasta que alcanzaron una densidad óptica 0,1 y se les añadió  $CuSO_4$  hasta 3 mM. A continuación, los cultivos se incubaron a 37 °C y se midió la densidad óptica de ellos en los tiempos indicados. Las mediciones corresponden al promedio de tres réplicas biológicas.

Las cepas complementadas con los genes *ygiF* y *Afe* logran restaurar el fenotipo silvestre. La cepa complementada *ygiF* no presenta un crecimiento significativamente diferente de la cepa silvestre hasta transcurridas 4 horas después de la exposición a cobre. Esto sugiere que la cepa complementada *ygiF* es capaz de restaurar el fenotipo silvestre. Lo mismo se observa con la cepa

complementada con el gen *Afe\_1874* durante las primeras 2 horas (Fig. S5). En contraste, los dominios individuales muestran diferencias significativas en el crecimiento en comparación con la cepa silvestre en todo momento (Fig. S5), en indicando que, si bien son capaces de restaurar el fenotipo, esto es solamente parcial.

Estos resultados sugieren fuertemente la participación de la proteína YgiF en la respuesta celular de *E. coli* frente a la presencia de cobre, apoyando la idea de que la ausencia de esta proteína provoca una mayor sensibilidad de la cepa *ygiF::cm* a este metal.



## 2. Mutación sitio-dirigida sobre los sitios de unión a cobre de la proteína YgiF mediante cambios de aminoácidos

### 2.1 Análisis estructural de proteínas CHAD

Los antecedentes de que las proteínas CHAD se unen a los PoliP (Tumlirsch y Jendrossek., 2017), que éstos son degradados rápidamente en presencia de cobre (Grillo-Puertas y cols., 2014), y que la proteína CHAD de *S. chartreusis* posee sitios de unión a cobre (Werten y cols., 2019), junto con los resultados anteriores sugieren fuertemente que la proteína YgiF tiene un rol en la resistencia a cobre en *E. coli*.

En base a lo anterior, se quiso profundizar en cómo se lleva a cabo dicha participación, mediante una serie de análisis bioinformáticos similares a los realizados en paralelo por Javier Bustamante en su seminario de título (Bustamante J., 2022). Para ello, primeramente, se realizó un estudio sobre el estado del arte en proteínas que unen cobre y sus interacciones con dicho metal.

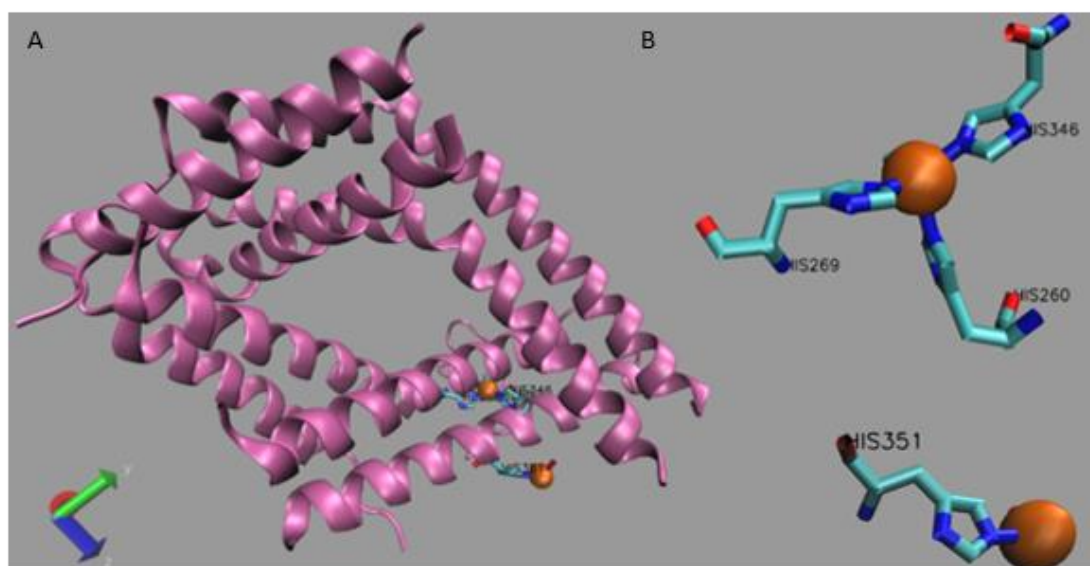
Como se mencionó anteriormente, el cobre desempeña un papel crucial en el desarrollo de la mayoría de las células (Rubino y Franz., 2002). Esto se debe a las propiedades redox del ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), que actúa como cofactor de numerosas enzimas que desempeñan funciones vitales en la célula, tales como las Superóxido dismutasas o Citocromos (Peña y cols., 1999).

El ion cuproso es un ácido de Lewis débil, y el ion cúprico está al límite, por lo que se espera que los sitios de unión a cobre estén predominantemente formados por aminoácidos que contienen cadenas laterales capaces de unir preferentemente ligandos débiles o al límite. Los aminoácidos que contienen átomos donantes de nitrógeno y azufre en sus cadenas laterales, como la histidina, metionina y cisteína, respectivamente, serían los candidatos ideales para formar estos sitios (Rubino y Franz., 2002).

Las proteínas CHAD se caracterizan por tener dominios conservados ricos en alfa hélices con alta presencia de residuos de histidina. Por lo tanto, se especula que estas proteínas tienen la capacidad de unir cationes divalentes como el cobre, utilizando dichos residuos (Iyer y Aravind., 2002). En el citoplasma de *E. coli*, el cobre se encuentra predominantemente reducido en estado de oxidación +1 ( $\text{Cu}^{+1}$ ), por lo que interactúa preferentemente con motivos de tiolato y tioéteres, como los de los aminoácidos cisteína y metionina, respectivamente. Además, se ha descrito que, en la gran mayoría de las proteínas analizadas, residuos de cisteína, metionina e histidina están involucrados en la interacción con  $\text{Cu}^{+1}$ , siendo la combinación y disposición de éstos en el sitio de unión lo que determina la fuerza de esta asociación (Rubino y Franz., 2012).

En la base de datos PDB (<https://www.rcsb.org/>) existen sólo 4 estructuras de proteínas CHAD, correspondientes a un polipéptido obtenido de *Chlorobium tepidum*, *Ricinus communis*, *Streptomyces chartreusis* y *Escherichia coli* (proteína YgiF). Al observar el cristal de la proteína CHAD derivada de *S. chartreusis*, se ve que tiene dos sitios de unión a cobre. Para profundizar en los sitios particulares donde se asocia dicho metal, el archivo “pdb” de esta proteína fue incorporado en el programa VMD (Visual Molecular Dynamics, <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>), para visualizar el lugar preciso donde se asocian los átomos de cobre.

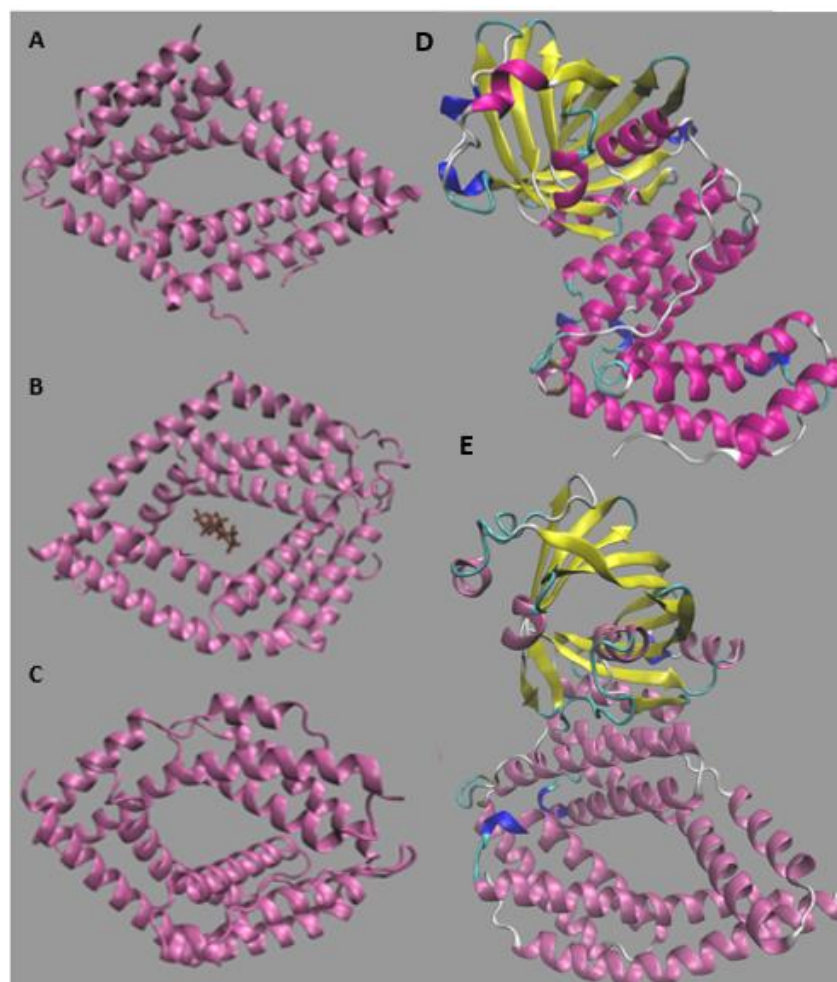
Para identificar los aminoácidos asociados a los átomos de cobre, se generó una nueva representación, donde en la sección “selected Atoms” se escribió “same residue as within 3 of ions”, con lo que se le pidió al programa identificar los aminoácidos cercanos (hasta 3Å) a cada átomo de cobre (Fig. 11).



**Figura 11.** Estructura general y sitios de unión a cobre de la proteína PptA de *S. chartreusis*. **A.** Estructura completa de la proteína PptA de *S. chartreusis* junto con los sitios de unión a cobre. **B.** Ampliación del sitio de unión a  $\text{Cu}^{+2}$  interno de la proteína, compuesto por los residuos HIS260, HIS269 e HIS346 y el sitio de unión definido por el residuo HIS351.

Los aminoácidos que se encuentran a una distancia de 3Å del átomo de cobre presentan sus cadenas laterales orientadas hacia el metal (Fig. 11B). Estos dos parámetros se pueden utilizar como referencia para analizar los posibles sitios de unión a cobre en YgiF de *E. coli*, es decir, se busca verificar que los aminoácidos estén a una distancia razonable del metal (máximo 5Å) y que los aminoácidos involucrados tengan sus cadenas laterales apuntando hacia el metal, de manera que se forme una especie de bolsillo o poro para permitir la unión del cobre.

Por otro lado, al observar los cristales de las proteínas CHAD disponibles en la base de datos PDB, y los generados por inteligencia artificial en el programa AlphaFold, es llamativo que todas comparten una estructura bastante similar, la cual consta de un dominio CHAD rico en hélices alfa y muy conservado a nivel estructural (Fig. 12).

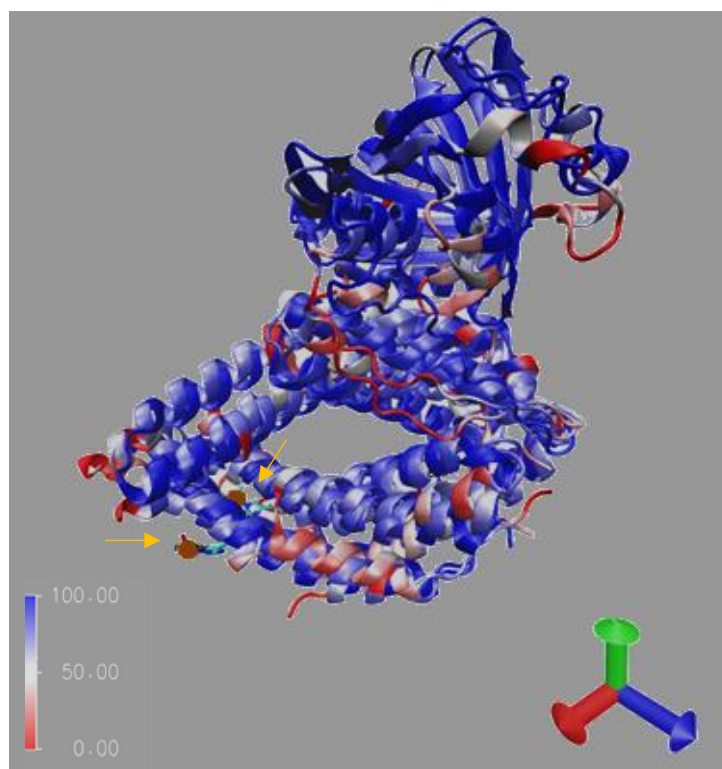


**Figura 12.** Comparación de la estructura general de proteínas CHAD disponibles en PDB y AlphaFold. **A.** *Streptomyces chartreusis*. **B.** *Clorobium tepidum* **C.** *Ricinus communis*. **D.** *Escherichia coli*. **E.** *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

La proteína YgiF de *E. coli*, tiene un dominio CHAD que posee sólo uno, de los dos conjuntos de hélices alfa (señalado en color fucsia). Además, al igual que *A. ferrooxidans* posee también un dominio CYTH, posicionado justo arriba del dominio CHAD, coloreados en amarillo. La proteína

CHAD de *C. tepidum* estaba depositada en combinación con PoliP, el que se observa de manera perpendicular en el orificio central de la proteína (Fig. 11B).

Teniendo en cuenta la similitud estructural de las proteínas CHAD previamente expuestas (Fig. 12), se llevó a cabo un análisis de “multiseq” utilizando el programa VMD para evaluar su conservación. Para facilitar la visualización, se incorporaron los sitios de unión a cobre y los aminoácidos involucrados en la proteína PptA de *S. chartreusis* (Fig. 13).

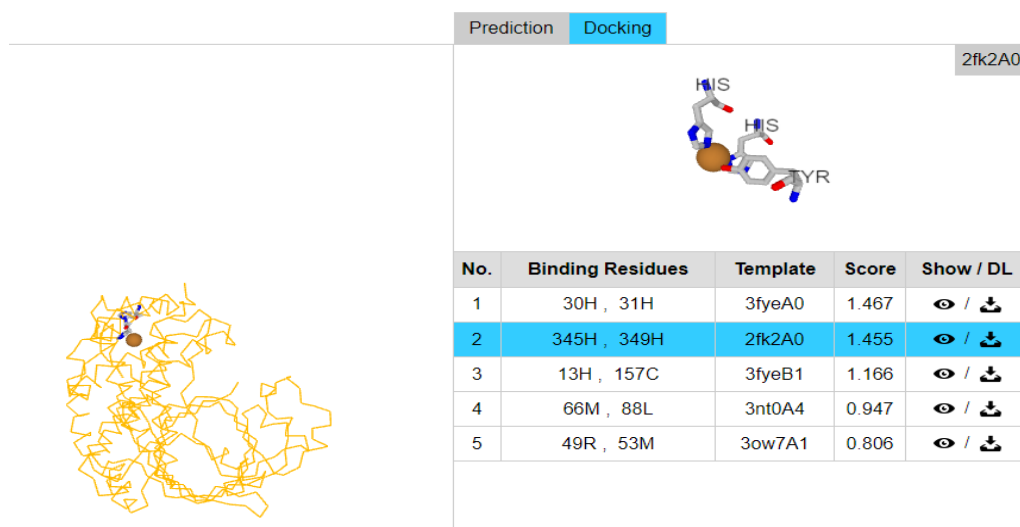


**Figura 13.** Análisis “multiseq” de las proteínas CHAD de *C. tepidum*, *R. communis*, *S. chartreusis*, *E. coli* y *A. ferrooxidans*. Al lado derecho del conjunto de alfa hélices que componen el poro central se muestran los sitios de unión a cobre de *S. chartreusis* (fechas amarillas). En azul se marcan zonas con alto nivel de homología y en rojo zonas con bajos niveles de homología según la coloración RMSD.

Las estructuras de las proteínas CHAD están bastante conservadas, pues comparten un alto nivel de homología a nivel estructural, lo cual se puede apreciar en color azul según la coloración RMSD. Cabe destacar que la zona en donde se encuentran los sitios de unión a cobre de la proteína CHAD de *S. chartreusis* también se encuentra coloreada de azul, lo que sugiere fuertemente que estos sitios podrían estar conservados.

## 2.2 Análisis bioinformáticos

Para evaluar si la proteína CHAD de *E. coli* también es capaz de unir cobre, se realizó una búsqueda preliminar de los posibles sitios de unión a cobre de la proteína mediante análisis bioinformáticos. Este análisis consistió en primer lugar en la búsqueda preliminar de los aminoácidos que formarían el posible sitio utilizando el servidor MIB (“Metal Ion-Binding site prediction and docking server”). Este servidor modela y predice los sitios de unión de metales en proteínas con estructura cristalizada. El resultado de esta búsqueda se muestra en la figura 14.



**Figura 14.** Predicción de sitios de unión a  $\text{Cu}^{+1}$  en la proteína YgiF de *E. coli* en el servidor MIB. El servidor predice cinco sitios de unión a cobre, sin embargo, sólo uno presente en el dominio CHAD de la proteína ygiF (marcado en celeste).

### 2.2.1 Búsqueda de genes codificantes para proteínas con dominio CHAD en genomas de bacterias y bacterias acidófilas.

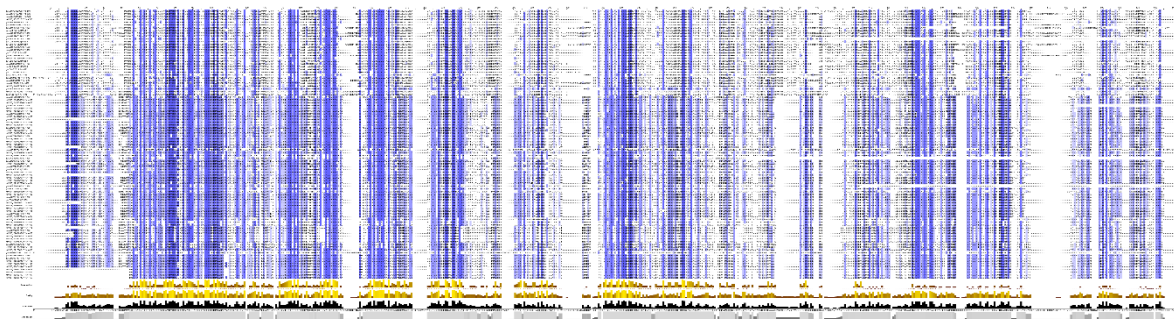
El grupo de Tumlirsch y Jendrossek reportó que sólo el dominio CHAD es responsable de la unión de las proteínas CHAD a los PoliP y que residuos básicos ubicados en dicho dominio son esenciales para esta asociación (Tumlirsch y Jendrossek., 2017). Por esta razón, nos enfocamos en el sitio 2, conformado por las histidinas 345 y 349.

Para encontrar homólogos remotos, se realizó un análisis PSI-BLAST, utilizando como referencia la secuencia de la proteína YgiF *E. coli* (GenBank: VWQ04226.1, ncbi protein). El resultado indicó que las proteínas (mayoritariamente del género *Escherichia*) presentan entre un 98,15%-99,77% de identidad con YgiF, con “scores” entre 830-814, y “e-values” de 0,0. Estos resultados se exportaron y analizaron utilizando el “software” Jalview, en el cual se alinearon mediante el algoritmo ClustalO. Debido al alto porcentaje de identidad de las proteínas YgiF dentro del género *Escherichia*, los aminoácidos candidatos se conservan. Lo mismo se observa al realizar el análisis PSI-BLAST en *Enterobacterias* excluyendo al género *Escherichia* (taxid:561), en donde la mayoría de las secuencias pertenecen a los géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Citrobacter*.

Como se puede deducir, estos alineamientos no proporcionan información relevante, por lo que se realizó un tercer análisis PSI-BLAST utilizando como objetivo de búsqueda especies de los géneros *Acidithiobacillus* (taxid:119977), *Sulfobacillus* (taxid:28033) y *Thiobacillus* (taxid:919). Las especies de estos géneros son conocidas por formar parte de los consorcios que desarrollan biominería y ser altamente resistentes a metales pesados, especialmente a cobre y cadmio (Valenzuela y cols., 2006). El resultado indicó que las proteínas de estos géneros presentan entre un 32%-38,8% de identidad con YgiF, “scores” entre 72-129, y “e-values” en el rango de  $2e^{-29}$  a  $1e^{-12}$ . Estos resultados se exportaron a un archivo de alineamiento, y se visualizaron utilizando el “software” Jalview.

Al alinear las secuencias con el algoritmo BLAST, ninguno de los aminoácidos candidatos se conserva, a pesar de que existe una identidad de 30-40% entre las proteínas. Sin embargo, cuando se añade a la búsqueda bacterias tolerantes a cobre de los géneros *Leptospirillum* (taxid:179), *Acidimicrobium* (taxid:53634), la histidina 349 (His349) se conserva con una identidad del 93%.

A pesar de que sólo uno de todos los aminoácidos predichos por el servidor MIB se conserve dentro del grupo de bacterias tolerantes a metales pesados, es posible ver “bloques” de identidad entre ellas al alinear sus secuencias. Estos bloques están coloreados según el porcentaje de identidad, cuanto más azul, más conservadas están las secuencias. En una primera imagen, y sólo con el ánimo de mostrar la identidad global de las proteínas CHAD, se observa lo siguiente (Fig. 15).



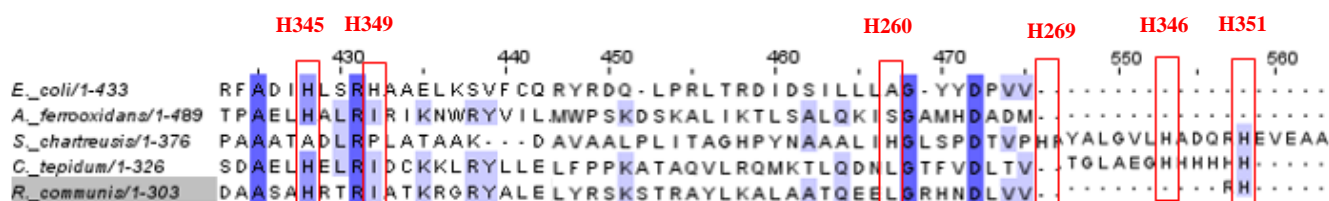
**Figura 15.** Alineamiento local de proteínas CHAD de bacterias acidófilas de los géneros *Acidithiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thiobacillus*, *Leptospirillum*, y *Acidimicrobium*.

Los sitios de unión a cobre de la proteína CHAD de *S. chartreusis* se componen de un sitio de unión a  $\text{Cu}^{+2}$  interno de la proteína, compuesto por los aminoácidos HIS260, HIS269 e HIS346. El otro sitio es de unión intermolecular, ubicado en un eje de simetría cristalográfica entre moléculas adyacentes y definido por el residuo HIS351 (Fig. 11).

Se alineó la secuencia aminoacídica de estos cristales para analizar la conservación de los residuos que conforman los sitios de unión de la proteína CHAD de *S. chartreusis*. Al alinear la secuencia



de YgiF de *E. coli* con *C. tepidum*, *R. communis* y *S. chartreusis* utilizando el programa de alineamiento múltiple Cobalt se observa que la His345 de *E. coli* se conserva en *A. ferrooxidans*, *R. communis* y *C. tepidum*, mientras que la His349 no se conserva. La His351 de *S. chartreusis* se conserva en *R. communis* y *C. tepidum*, la His346 sólo en *C. tepidum*, y los residuos His260 e His269 no se conservan (Fig. 16).



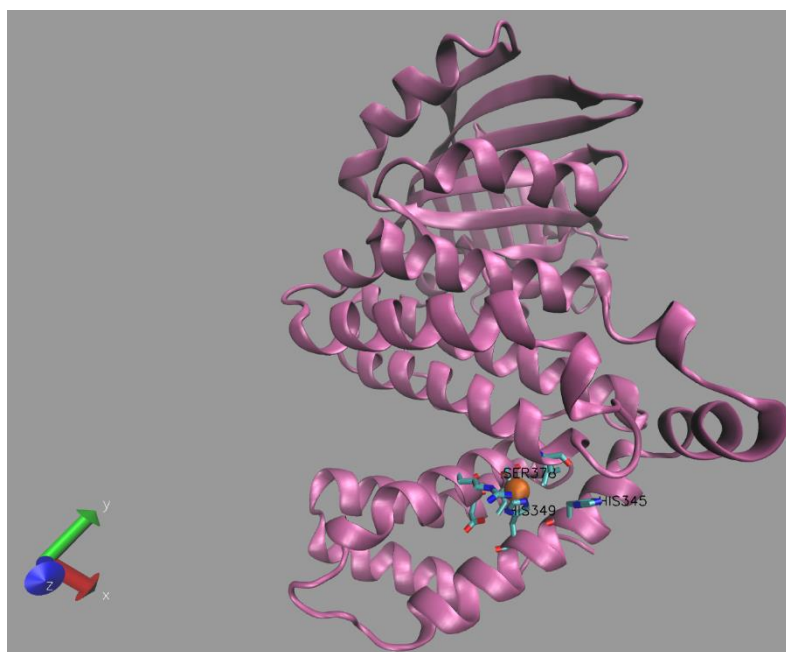
**Figura 16.** Alineamiento múltiple de las secuencias de las proteínas CHAD de *E. coli*, *C. tepidum*, *R. communis* y *S. chartreusis*.

Si bien es esperable que los residuos no se conserven, debido al bajo porcentaje de identidad entre los polipéptidos, es llamativo que la His345 de *E. coli* esté conservada en casi todas las estructuras. No obstante, no está del todo claro aún si los residuos que conforman el posible sitio de unión a cobre de YgiF se conservan.

Si bien el servidor MIB arroja posibles aminoácidos candidatos, los alineamientos de secuencias no proporcionan información relevante sobre estos residuos conforman el sitio de unión a cobre en YgiF, ya que no existe un porcentaje significativo de identidad entre las secuencias. Por lo tanto, no se puede concluir que estén conservadas.

Sin embargo, a nivel estructural, los dominios CHAD conservan su plegamiento de dos conjuntos de alfa-hélices alrededor de un poro central, excepto *E. coli* que tiene sólo un conjunto de alfa-hélices (Fig. 12). En general, la estructura proteica tiende a conservarse más que la secuencia de aminoácidos, ya que la estructura y el plegamiento están directamente relacionados con la función (Tian y Skolnick, 2003; Illergård y cols., 2009; Konaté y cols., 2019).

Como se puede apreciar en la figura 13, las estructuras de las proteínas CHAD están bastante conservadas, a pesar de los bajos niveles de conservación en sus secuencias. Para explorar en mayor detalle el sitio de unión predicho para YgiF, se descargó y visualizó en VMD el “docking” realizado por el servidor MIB. Específicamente se evaluó el sitio conformado por las histidinas 349 y 345 (Fig. 17).



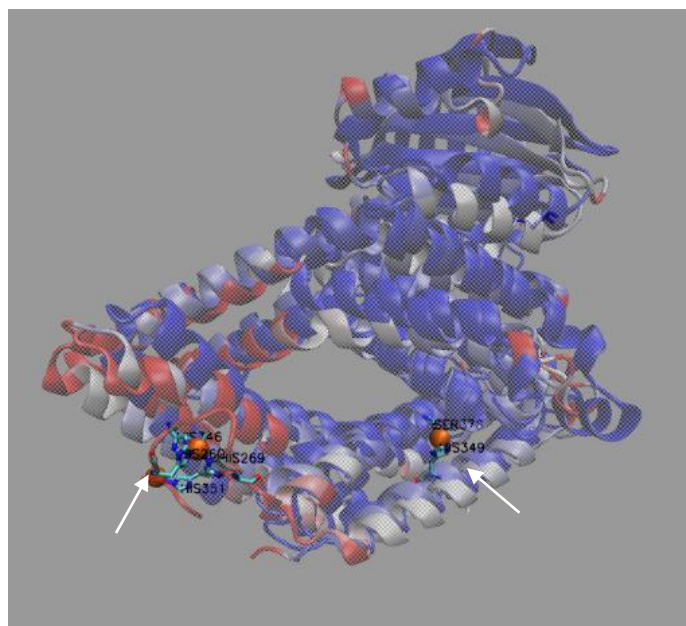
**Figura 17.** “Docking” molecular realizado por el servidor MIB de la proteína YgiF de *E. coli* y Cu<sup>+1</sup>.

El servidor MIB identificó un sitio de unión a ion cuproso en el dominio CHAD de la proteína YgiF con un alto “score”, conformado por los aminoácidos His345 e His349. Sin embargo, al analizarlo en VMD, este identifica también el residuo Ser378 formando parte del sitio. Tal como describe Javier Bustamante en su seminario de título (Bustamante J., 2022) las histidinas se encuentran cercanas entre sí y próximas a sitios de unión a Mg<sup>+2</sup>, que es el ion cofactor en la actividad trifosfatasa de la proteína YgiF (Kohn y cols., 2012).

Los aminoácidos His349 y Ser378 están a una distancia de 3Å del átomo de cobre, y sus cadenas laterales están orientadas hacia éste. Si bien el residuo His345 está un poco más lejos (5Å), y pareciera que no apunta directamente hacia el átomo de cobre, hay que considerar que la cristalización de YgiF no se hizo en presencia del metal, de manera que la estructura de los sitios y la posición de las cadenas laterales pueden variar. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad que este residuo forme parte del sitio.

Este sitio se ubica en una región muy parecida al sitio de unión interno de la proteína PptA de *S. chartreusis*, y aunque este sitio difiere en la presencia de un residuo de serina en vez de una histidina, podría ser un sitio de unión canónico a cobre.

Para analizar si es que este sitio se conserva estructuralmente con el sitio de unión a cobre de *S. chartreusis*, se alinearon nuevamente las estructuras, pero esta vez con el “docking” realizado por el servidor MIB (Fig. 18).



**Figura 18.** Análisis “multiseq” de las proteínas CHAD de *C. tepidum*, *R. communis*, *S. chartreusis*, *A. ferrooxidans* y “docking” realizado por MIB de la proteína YgiF de *E. coli*. En el lado derecho del conjunto de alfa hélices que conforman el poro central, se presentan los sitios de unión a cobre de *S. chartreusis*. Mientras que, en el lado izquierdo, se señalan con flechas blancas los sitios de unión a cobre predichos para *E. coli*.

Aunque el sitio de unión a cobre predicho para YgiF de *E. coli* se encuentra en una región muy similar a la de *S. chartreusis*, en el alineamiento estructural, el dominio CHAD de *E. coli* se posiciona en la porción del dominio opuesta. A pesar de estar en lados opuestos del dominio, estos sitios se encuentran en regiones bastante similares y, más importante aún, conservadas.

Finalmente, la selección de los residuos a mutar se hizo mayoritariamente, en base al antecedente que la proteína CHAD de *S. chartreusis* posee dos sitios de unión a cobre y el posterior análisis de dichos sitios en VMD. También se tomó en cuenta la predicción de los sitios de unión a  $\text{Cu}^{+1}$  en YgiF realizada por el servidor MIB, y el análisis de dicho “docking” en VMD.

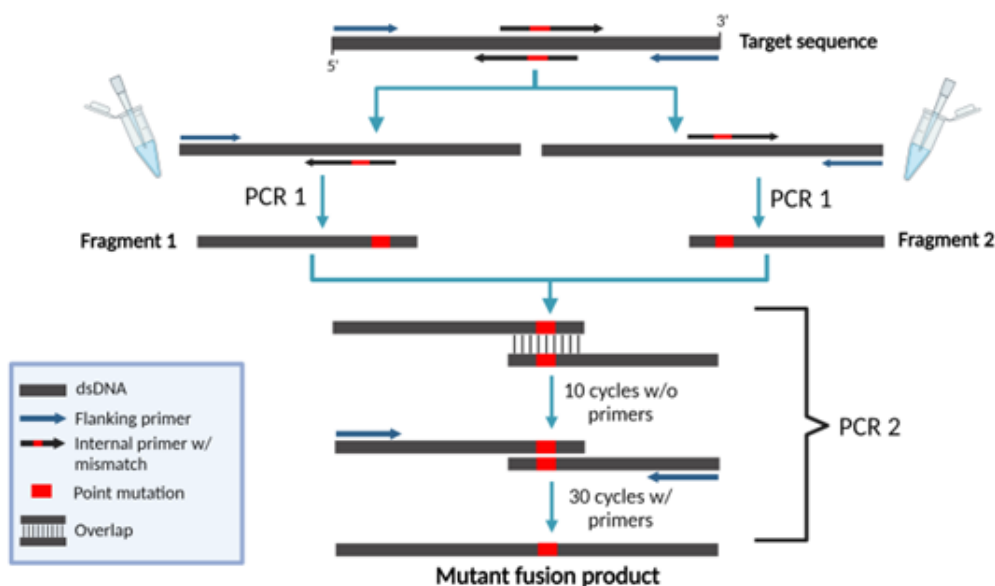
En VMD, se pudo observar que las cadenas laterales de los aminoácidos que conforman el sitio de unión a cobre en YgiF están orientadas hacia el átomo de cobre, formando una especie de

bolsillo donde el átomo podría quedar retenido por estas cadenas (Fig. 17). Además, el alto nivel de homología presente en la estructura tridimensional en las proteínas CHAD sugiere que están altamente conservadas en zonas de relevancia como el sitio de unión a cobre de *S. chartreusis*.

De esta manera, se decidió mutar los residuos His345 e His349. No se consideró el residuo Ser378 ya que se estimó que con mutar dos aminoácidos de tres que conforman el sitio sería suficiente para desarmar el sitio de unión a cobre.

### 2.3 Mutación de sitio-dirigida

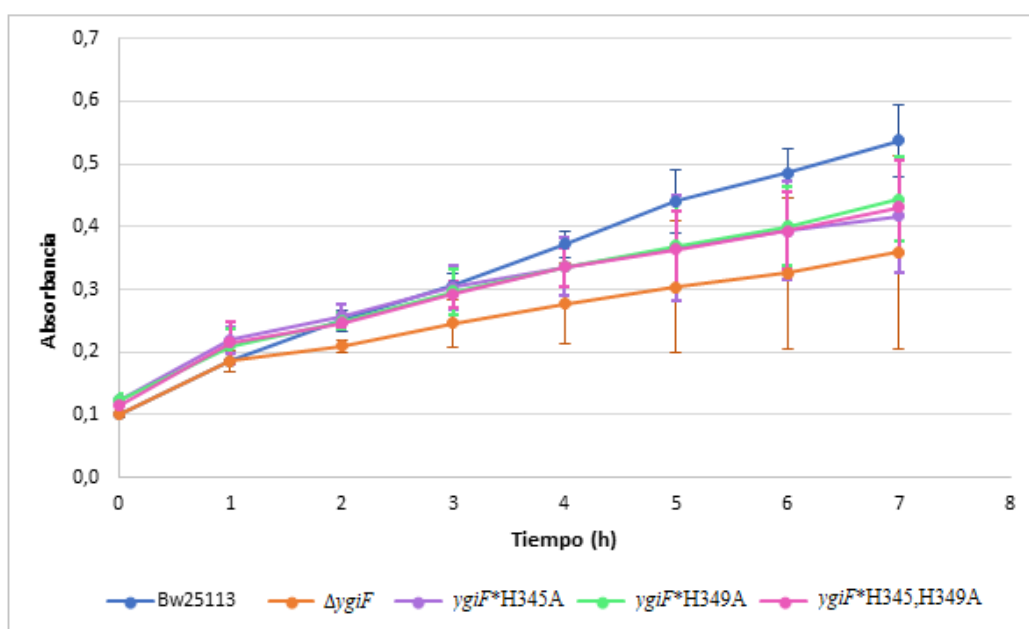
Se diseñaron e implementaron mutaciones en las histidinas 345 y 349 utilizando mutagénesis sitio-dirigida mediante PCR. Las mutaciones implican cambiar la secuencia del codón “CAU”, que codifica para las histidinas, por el codón “GCU, que codifica para alanina, lo que resulta en una pérdida de función. Las versiones mutantes de YgiF (YgiF\*H345A, YgiF\*H349A e YgiF\*H345,349A) se generaron según se ilustra en la Fig. 19.



**Figura 19.** Diagrama esquemático de la mutagénesis sitio-dirigida por PCR.

2.4 Ensayos de resistencia en las cepas mutantes sitio-dirigidas

Las cepas variantes *ygiF*\*H345A, *ygiF*\*H349A e *ygiF*\*H345,349A de *E. coli* se evaluaron en su sensibilidad a cobre mediante ensayos de resistencia al metal. Para ello, se iniciaron cultivos celulares de las cepas: silvestre Bw25113, mutante *ygiF*::cm, y las cepas variantes en medio LB a 37°C. Cuando llegaron a una densidad óptica 0,1, se les añadió CuSO<sub>4</sub> 3,5 mM al medio de cultivo. El crecimiento de las cepas se midió durante 7 horas (Fig. 20).



**Figura 20.** Efecto de la mutación en el posible sitio de unión a cobre de la proteína YgiF. Las mediciones corresponden al promedio de cuatro réplicas biológicas.

Las cepas que poseen el posible sitio de unión a cobre de YgiF mutado ralentizan su crecimiento de manera similar que la cepa mutante *ygiF::cm*. Estos resultados sugieren que la proteína YgiF de *E. coli* posiblemente tenga un sitio de unión a cobre, el cual estaría conformado por los residuos His345, His349 y Ser378. Al mutar dicho sitio, la cepa se vuelve más sensible a la presencia de cobre, en comparación con la condición control.

Si bien las cepas variantes muestran diferencias en el crecimiento en comparación con la cepa silvestre, estas diferencias no son significativas, a diferencia de la cepa  $\Delta ygiF$ , que comienza a mostrar diferencias significativas a partir de las 5 horas (Fig. S7). Esto sugiere que las cepas variantes son menos resistentes al cobre en comparación con la cepa silvestre, pero aún más resistentes que la cepa  $\Delta ygiF$ . Aunque la cepa  $\Delta ygiF$  muestra diferencias significativas sólo a partir de las 5 horas, desde las 2 horas ya se observa una diferencia, al menos de manera apreciable. Por lo tanto, aunque las cepas variantes son más sensibles a cobre, no alcanzan el mismo nivel de sensibilidad al cobre que la cepa *ygiF::cm*. Esto podría indicar que, aunque el sitio tiene un papel en la resistencia a cobre que aporta la proteína YgiF, no está explicado completamente por este, y posiblemente exista otro mecanismo que contribuya a la resistencia a cobre por parte de YgiF.

Las tres cepas construidas muestran una resistencia casi igual frente a cobre, lo que podría indicar que los aminoácidos que conforman el sitio de unión al metal no son sinérgicos. Esto se debe a que al mutar únicamente uno de los tres residuos, se observa una disminución en la sensibilidad que es casi igual a la que se observa cuando se mutan dos de los tres residuos (cepa variante doble).

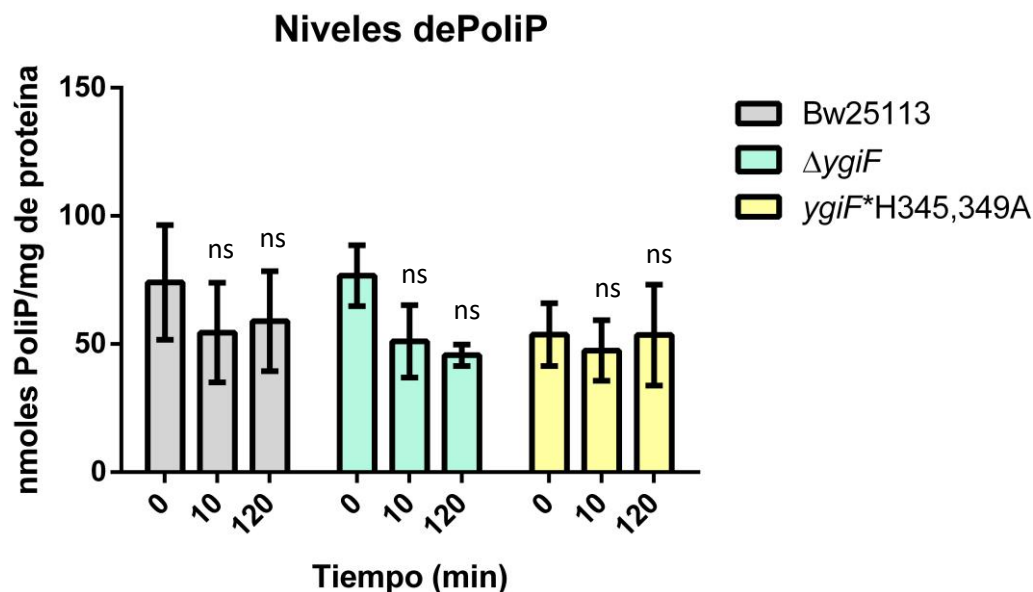
### 2.5 Niveles de PoliP en las mutantes sitio-dirigidas.

Como se mencionó anteriormente, se especula que las proteínas CHAD participan en el metabolismo de fosfatos y nucleótidos (Iyer y Aravind., 2002). Esto en base a que las proteínas que contienen un dominio CHAD a menudo se encuentran en grupos de genes que codifican enzimas que metabolizan PoliP (Fig. 7).

Estos antecedentes, junto con los resultados anteriores sugieren que la ausencia de la proteína YgiF, así como la mutación en el posible sitio de unión a cobre, aumentaría la sensibilidad de la cepa al metal. Por ello, permiten plantear la hipótesis de que las proteínas CHAD, que son proteínas de unión a los gránulos de PoliP (Lorenzo-Orts y cols., 2019), protegerían a los PoliP de la degradación por parte de la enzima PPX. Sin embargo, cuando se produce un estímulo con concentraciones elevadas de cobre, se requiere la degradación de los gránulos de PoliP (Orell y cols., 2012), y la proteína YgiF se disociaría del gránulo, permitiendo su degradación.

Por lo tanto, se midieron los niveles de PoliP en las cepas: variante *ygiF*\*H345,349A, mutante *ygiF*::cm y silvestre Bw25113 (Fig. 21).





**Figura 21.** Niveles de PoliP de las cepas  $ygiF^*H345,349A$ ,  $\Delta ygiF$  y silvestre de *E. coli*. Los niveles de PoliP se midieron en ausencia de cobre (tiempo 0) y a 10 y 120 min luego de añadir 2 mM de  $CuSO_4$ . Las mediciones corresponden al promedio de 3 réplicas biológicas. Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde \*\*\*\* indica  $p \leq 0,0001$ , \*\*\* indica  $p \leq 0,001$ , \*\* indica  $p \leq 0,01$ , \* indica  $p \leq 0,05$  y ns = no significativo

A pesar que los niveles de PoliP en las tres cepas no disminuyen significativamente con la adición de cobre, se observa una tendencia a la baja en la cepa silvestre y  $\Delta ygiF$ . En estas cepas, al adicionar cobre, sus niveles de PoliP disminuyen a partir de los 10 minutos. Esta disminución pareciera continuar en la cepa  $\Delta ygiF$  durante los siguientes 120 minutos, mientras que en la cepa silvestre pareciera que los niveles se mantienen estables. Por otro lado, la cepa variante  $ygiF^*H345,349A$ , que presenta una mutación en el posible sitio de unión a cobre, muestra un comportamiento diferente. En esta cepa, pareciera que el cobre no afecta sus niveles de PoliP, ya que estos se mantienen relativamente constantes.

### **3. Visualización de la dinámica celular de la proteína YgiF mediante microscopía fluorescente en *E. coli*.**

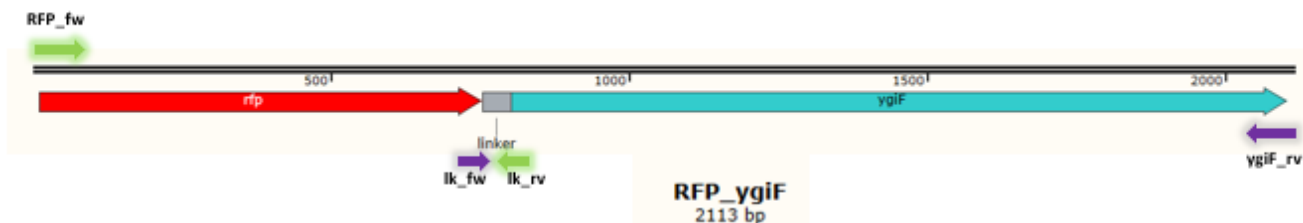
#### 3.1 Generación de las construcciones moleculares

Para analizar las interacciones y dinámica celular de la proteína YgiF en *E. coli*, se generaron construcciones moleculares. Estas construcciones consisten en una fusión de los genes codificantes para la proteína YgiF y la proteína fluorescente roja (RFP).

Como se ha reportado anteriormente, la proteína YgiF se asocia a gránulos de PoliP (Lorenzo-Orts y cols., 2019). Si bien *E. coli* tiene la capacidad de acumular este polímero, no genera gránulos visibles por microscopía. Por esta razón, para el desarrollo de estos experimentos se utilizará una cepa de *E. coli* que comprende una mutación en el gen *phoU*, que codifica para el regulador negativo del operón *pho*. La mutación en *phoU* permite la acumulación de grandes cantidades de PoliP intracelulares (Morohoshi y cols., 2002), que se pueden ver fácilmente por microscopía como gránulos.

La estrategia experimental para el desarrollo de la proteína de fusión consiste esencialmente en ligar el gen codificante para RFP a *ygiF*. Las proteínas CHAD se asocian a los gránulos de PoliP mediante dicho dominio (Lorenzo-Orts y cols., 2019). En YgiF el dominio CHAD se encuentra en la región carboxilo terminal, por lo que se incorporó una región espaciadora de 15 aminoácidos entre la proteína YgiF y RFP. Esto permite un plegamiento individual entre ambas proteínas. Esta región espaciadora se denominó región “linker”.

El esquema general de la proteína de fusión se ilustra en la figura 22, usando como *ejemplo RFP-ygiF*, donde el gen de proteína fluorescente se ubica en la región amino terminal



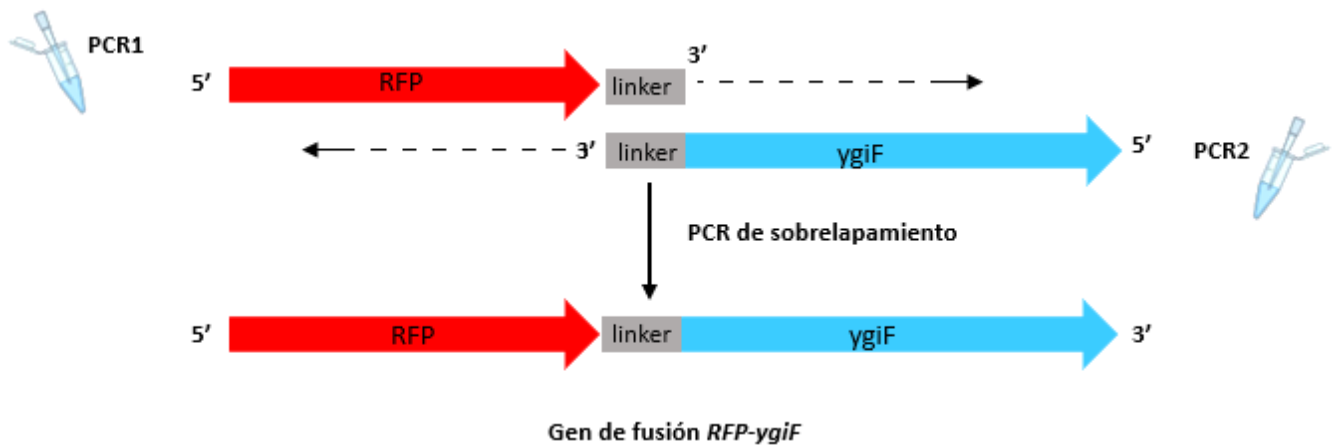
**Figura 22.** Esquema general del gen de fusión *RFP-ygiF*.

Para la generación de este gen de fusión, se desarrollaron dos PCRs. En el primero se empleó el vector pUC-IDT-RFP como molde, utilizando los partidores RFP fw y lk\_rv (Fig. 22). Este amplificado se denominó PCR1.

En paralelo, se llevó a cabo otra reacción de PCR empleando ADN genómico de *E. coli* como molde, y los partidores lk\_fw e ygiF\_rv (Fig. 22). Este amplificado se denominó PCR2.

Ambos amplificados comparten la región “linker”, por lo tanto, una vez purificados los amplificados PCR1 y PCR2, se desarrolló una reacción de PCR de solapamiento. En esta reacción se aprovecha la región compartida de dos productos de PCR, en este caso la región “linker” de los productos PCR1 y PCR2.

Por último, se desarrolla una nueva reacción de PCR utilizando la reacción anterior como molde, junto con los partidores externos, en base a la cual se amplifica el gen completo *RFP-ygiF* (Fig. 23).

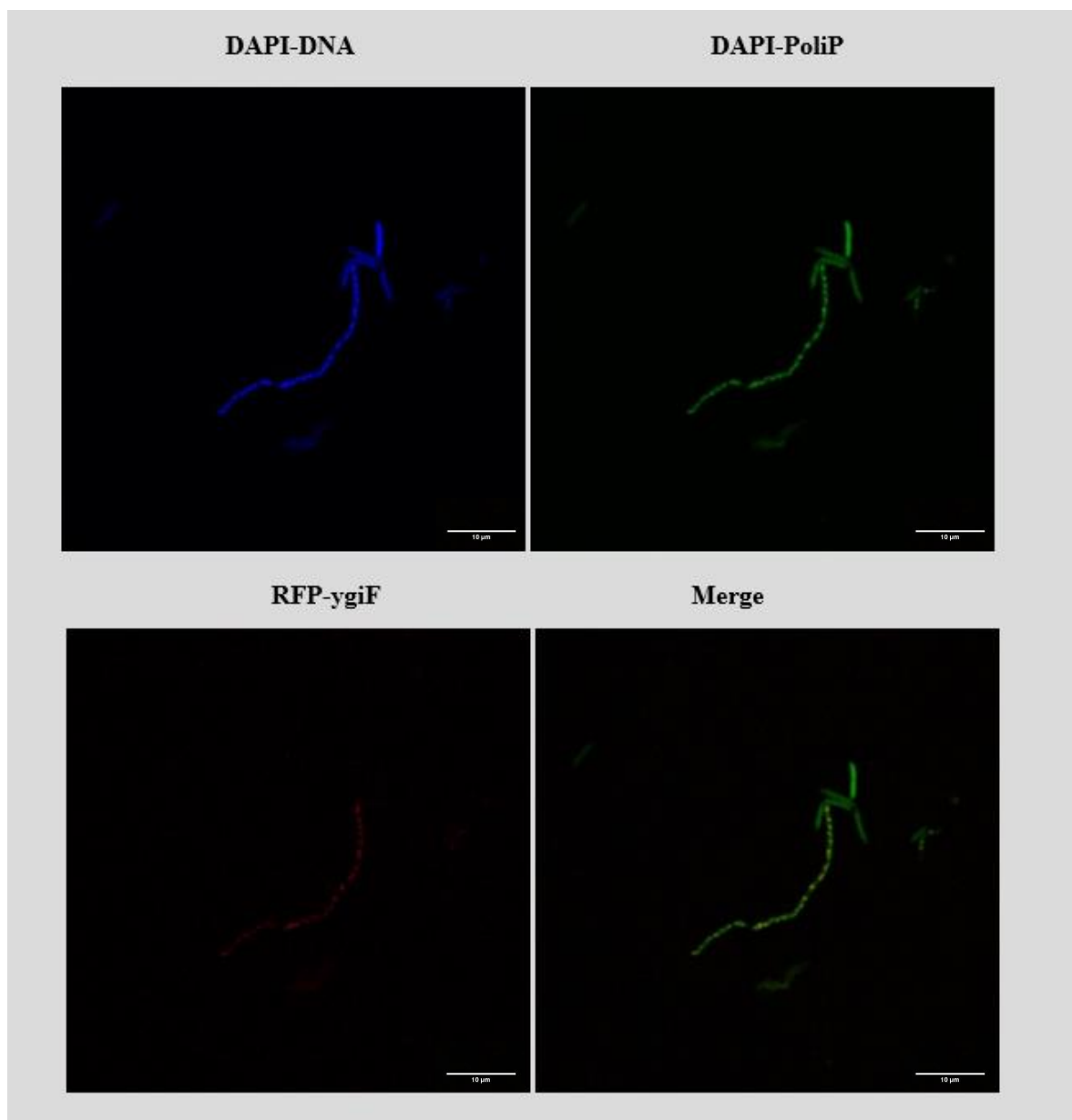


**Figura 23.** Esquema para el ensamblaje de los genes *RFP* e *ygiF*.

El fragmento se purificó, digirió con las enzimas *BamHI* y *SalI* y clonó mediante ligación al vector pTrc-His2A. Finalmente la construcción molecular se transformó en la cepa  $\Delta phoU$  de *E. coli* para su posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia.

### 3.2 Visualización de la dinámica celular de la proteína YgiF

Se inició un cultivo celular de la cepa  $\Delta phoU$ , que contiene la construcción molecular (gen de fusión *RFP-ygiF*), en medio LB con 2 mM del inductor IPTG y 100  $\mu\text{g/mL}$  de carbenicilina, a una temperatura de 37°C y una agitación de 150 rpm. Una vez que los cultivos llegaron a fase exponencial (D.O.<sub>600</sub> 0,7), se añadió al medio de cultivo 5 mM de  $\text{CuSO}_4$ , y se tomaron alícuotas en diferentes tiempos luego del tratamiento. El resultado de las micrografías obtenidas se muestra en la Fig. 24.



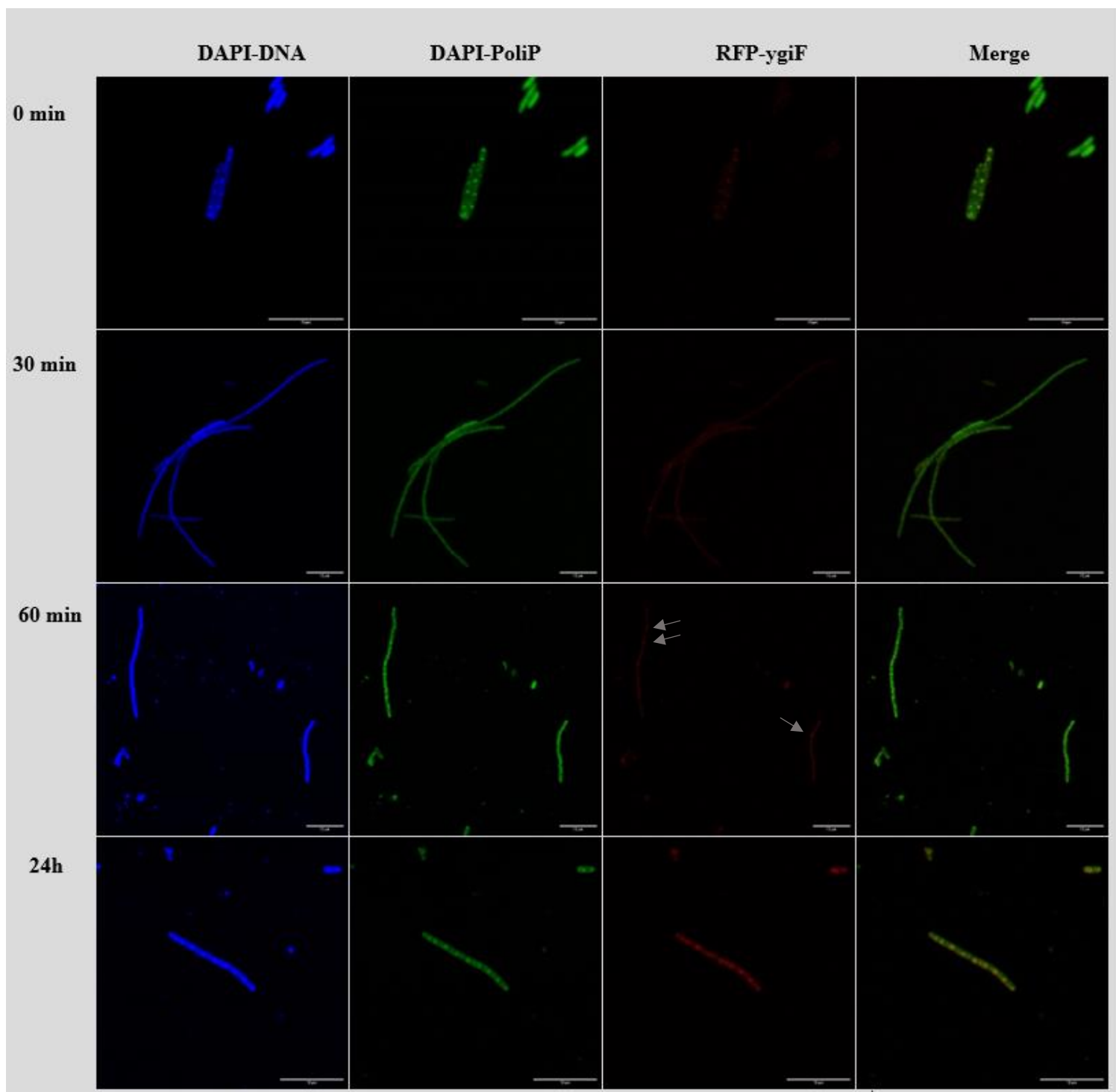
**Figura 24.** Co-localización de la proteína YgiF con los gránulos de PoliP. Micrografías de fluorescencia representativas obtenidas desde cultivos de la cepa  $\Delta phoU$  de *E. coli* en medio LB suplementado con 2 mM de IPTG. Aumento 63X. “Merge” corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP. La barra de magnitud representa 10 µm.

Como se observa en la figura 24, la dinámica de la proteína YgiF frente a los gránulos de PoliP es similar a la reportada en las bacterias *R. eutropha*, *M. gryphiswaldense* y *P. putida* (Tumlirsch y Jendrosseck., 2017). En estas bacterias, como en *E. coli*, se ve que la proteína CHAD tiene una

ubicación celular específica, que coincide con la posición de los gránulos de PoliP, formando un foco fluorescente amarillo (panel inferior derecho Fig. 24).

Como se mencionó anteriormente, se ha relacionado la acumulación de PoliP con la resistencia a cobre en distintos microorganismos (Navarro, y cols., 2009, Orell y cols., 2012). Además, teniendo en cuenta que la cepa *ygiF::cm* de *E. coli* es más sensible a cobre que su contraparte silvestre, es de interés analizar la dinámica de esta proteína respecto a su unión a los gránulos de PoliP en presencia de cobre.

Para aquello, se expresaron las fusiones N-terminales *RFP-ygiF* en la cepa  $\Delta$ *phoU* de *E. coli* durante el crecimiento en medio LB a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial, se añadió 5 mM de CuSO<sub>4</sub> al medio y se tomaron alícuotas a distintos tiempos. Las micrografías obtenidas se ilustran en la figura 25.



**Figura 25.** Evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en presencia de cobre. Aumento 63X. “Merge” corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP. La barra de magnitud representa 10  $\mu\text{m}$ .



Como se puede observar en la figura 25, en el tiempo 0 (sin cobre), la proteína YgiF está unida a los gránulos de PoliP. A los 30 minutos se observa que la proteína YgiF tiene una distribución homogénea dentro de la célula, lo que podría indicar que se disoció del gránulo. Después de 60 minutos de exposición al cobre, se observa que las proteínas YgiF gradualmente vuelven a tener una ubicación subcelular específica (flechas grises), posiblemente en gránulos de PoliP en formación. Finalmente, después de 24 horas de exposición al cobre, las proteínas YgiF vuelven a co-localizarse con los gránulos de PoliP.

Estos resultados, junto con los ensayos de resistencia a cobre realizados en la cepa mutante *ygiF::cm* y en la cepa con el sitio de unión al metal mutado, respaldan la idea de que la proteína CHAD es una proteína de unión a los gránulos de PoliP que está involucrada en el metabolismo de estos, y participaría en la defensa contra el estrés por cobre.

## DISCUSIÓN

### **Efecto de la carencia de YgiF en la resistencia a cobre en *E. coli*.**

Mediante los análisis realizados en las figuras 6 y 7, fue posible observar que el contexto génico de las proteínas CHAD está altamente conservado en el grupo de *Enterobacterias* y *Acidithiobacillus*. Resulta llamativo que, en este último grupo, el contexto génico de CHAD conste de genes relacionados con el metabolismo de PoliP (gen *ppk*). Además, también se ha reportado que en *Geobacter metallireducens*, el gen que codifica para la proteína CHAD está en vecindad génica con PPX (Iyer y Aranvid., 2002).

Estos resultados preliminares apoyan la idea que las proteínas CHAD estarían implicadas con el metabolismo de los PoliP. Es conocido que los niveles de estos biopolímeros tienen relación con la resistencia al cobre (Kornberg y cols., 1999).

Los genes codificantes para proteínas CHAD suelen estar agrupado con genes relacionados con el metabolismo de los PoliP. Además, la proteína CHAD de *S. chartreusis* posee sitios de unión a cobre. Considerando lo anterior, se evaluó el efecto de la carencia del gen codificante para YgiF en *E. coli*.

Mediante el ensayo de resistencia a cobre (Fig. 8), es posible observar que la ausencia de la proteína YgiF resulta en un fenotipo más sensible al metal en comparación con la cepa silvestre. También se puede apreciar en las curvas de crecimiento bajo condiciones control (sin Cu) (Fig. 8), que no existen diferencias en el crecimiento entre ambas cepas, lo que indica que la variación en la resistencia a cobre no se debe a defectos en el crecimiento de la mutante.

Además, cuando la cepa mutante se complementa con el gen *ygiF*, ésta restaura el fenotipo silvestre (Fig. 10).

Al complementar la cepa *ygiF::cm* con los dominios individuales, estos restauran parcialmente el fenotipo silvestre. Se observa una mayor restauración del fenotipo cuando se complementa con el dominio CHAD, en comparación con el dominio CYTH. Esta diferencia podría deberse a que, como se mencionó anteriormente, únicamente el dominio CHAD es el encargado de unirse a los gránulos de PoliP (Tumlirsch y Jendrossek., 2017). No obstante, estos resultados sugieren que ambos dominios serían necesarios para conferir la resistencia a cobre de *E. coli*.

Estos resultados iniciales respaldan la idea que YgiF tiene un rol en la resistencia a cobre en *E. coli*.

#### **Rol del sitio de unión a cobre de YgiF en la resistencia al metal.**

Como se mencionó anteriormente, la proteína CHAD de *S. chartreusis* posee dos sitios de unión a cobre (Werten y col., 2019). Además, el dominio CHAD es rico en residuos de histidina, los cuales son aminoácidos importantes en los sitios de unión al metal. Para confirmar la participación de la proteína YgiF en la resistencia a cobre de *E. coli*, se analizó la secuencia y la estructura tridimensional de la proteína con el fin de identificar posibles sitios de unión al metal.

El servidor MIB predice cinco sitios de unión para el ion cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) en la proteína YgiF (Fig. 14), los cuales en su mayoría están conformados por histidinas. Esto también se observó en los análisis realizados para las proteínas CHAD disponibles en PDB. (a excepción de *C. tepidum*), la gran mayoría de los sitios de unión a cobre predichos (y conocidos, en el caso de *S. chartreusis*) contienen residuos de histidinas (Fig. S6).

De los cinco sitios predichos para YgiF, sólo uno está ubicado en el dominio CHAD, conformado por las His345 e His349. Para analizar la conservación de estos residuos, se realizó una búsqueda de homólogos remotos mediante un análisis PSI-BLAST utilizando la proteína YgiF como referencia. Este análisis identificó aproximadamente 500 proteínas, en su mayoría pertenecientes

a los géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Citrobacter*, con un alto porcentaje de identidad con YgiF (98-99%). Como era de esperar debido al alto nivel de homología entre las secuencias, al alinearlas se observó que todo los residuos que conforman los cinco posibles sitios de unión a cobre de YgiF se conservan casi en su totalidad (>99%). Específicamente, los residuos His345 e His349 se conservan con un porcentaje de identidad del 99.9 y 99.2%, respectivamente.

Al repetir el análisis dentro del grupo de bacterias resistentes a cobre que forman parte de consorcios mineros, como *Acidithiobacillus*, *Sulfobacillus* y *Thiobacillus*, se encontró un porcentaje de identidad con YgiF de 32-40 %. Sin embargo, al alinear estas secuencias, no se conserva ninguno de los residuos predichos por MIB. No obstante, cuando se incluyeron en la búsqueda el grupo de bacterias tolerantes al cobre *Leptospirillum* y *Acidimicrobium*, se observó que la histidina 349 se conserva con una identidad del 93%.

La información obtenida de estos análisis en diferentes microorganismos no es concluyente, ya que no presentan un alto porcentaje de identidad, especialmente en bacterias resistentes al cobre. Por el contrario, el grupo de *Enterobacterias* presentan porcentajes muy altos. Por lo tanto, no se puede determinar con certeza si los residuos se conservan, ya que incluso en el dominio CHAD la secuencia aminoacídica es variable.

Sin embargo, al analizar si los residuos que conforman los sitios de unión a cobre reportados en *S. chartreusis* (Fig.11, panel B) se conservan en *E. coli*, o en alguna de las secuencias de los cristales de proteínas CHAD depositados en PDB, se observa que, a pesar del bajo porcentaje de identidad entre las proteínas, la His351 de *S. chartreusis* se conserva en *R. communis* y *C. tepidum* (Fig. 16). Por el contrario, los residuos His260, His269 e His346 no se conservan. Sorprendentemente, la His345 de *E. coli* se conserva en *A. ferrooxidans*, *R. communis* y *C. tepidum*, (Fig. 16).

A pesar de la variabilidad en la secuencia de las proteínas CHAD analizadas, se observa una similitud a nivel estructural entre ellas. Conservan un plegamiento compuesto por dos conjuntos de 4 alfa-hélices con una pseudo simetría doble interna, lo que resulta en la formación de un poro central (excepto *E. coli* que sólo posee un conjunto). Además, tanto YgiF como la proteína CHAD de *A. ferrooxidans* presentan un dominio CYTH (Fig. 12).

La proteína CHAD de *C. tepidum* se encuentra depositada en forma de cristal, en combinación con PoliP, ubicado perpendicularmente en el orificio central de la proteína (Fig. 12, B). El grupo de Lorenzo-Orts (Lorenzo-orts y cols., 2019) informó que la unión de las proteínas CHAD al PoliP es a través de este poro central, y a lo largo de dos parches básicos en la parte frontal y posterior del dominio.

A partir del análisis “multiseq” de las proteínas CHAD de *C. tepidum*, *R. communis*, *S. chartreusis*, *E. coli* y *A. ferrooxidans* (Fig. 13), se deduce que más allá de los bajos niveles de identidad en sus secuencias, estas comparten un alto nivel de homología estructural.

Al analizar el “docking” del sitio de unión al ion cuproso del dominio CHAD de YgiF obtenido en el servidor MIB, utilizando programa VMD (Fig. 17) se observa que, además de los residuos His345 e His349 identificados por MIB, también se identifica una serina (Ser378) que podría formar parte del sitio.

Los iones metálicos, como el  $\text{Cu}^{+1}$ , tienen la capacidad de formar complejos con residuos de aminoácidos que poseen grupos donantes de electrones, estableciendo enlaces coordinativos. Ejemplos de tales aminoácidos son las histidinas, serinas, cisteínas y metioninas. Si bien, los aminoácidos con átomos donadores de nitrógeno y azufre, como histidina y cisteína, respectivamente, serían preferidos sobre aminoácidos con cadenas laterales que contienen hidroxilo, como la serina, es importante destacar que el grupo hidroxilo (-OH) en la cadena lateral

de la serina también puede actuar como ligando en la coordinación de iones metálicos. Esto se debe a que el oxígeno del grupo hidroxilo comparte características químicas (anfígenos) similares al azufre presente en los grupos tiol y tiolato de los residuos de cisteína y metionina, respectivamente. Los electrones de valencia de estos grupos anfígenos interactúan activamente con el  $\text{Cu}^{+1}$ .

Se ha propuesto que residuos de serinas ubicados en el entorno de coordinación con metales pueden influir de manera indirecta en el reconocimiento de estos últimos. Esto debido a que proporcionan neutralización de carga en el entorno cercano, así como restricciones hidrofóbicas y estéricas que favorecen el reconocimiento selectivo y unión de iones metálicos monovalentes sobre los divalentes en la cavidad de unión a metales. Un ejemplo es la proteína CueR (Ibáñez y cols., 2015).

Los residuos His349 y Ser378 presentan sus cadenas laterales apuntando hacia el ion cuproso, a una distancia de  $3\text{Å}$ , mientras que el residuo His345 está un poco más alejado ( $5\text{Å}$ ) y parece que su cadena lateral no apunta directamente al sitio (Fig.17). Sin embargo, se considera que el residuo His345 también forma parte del sitio, ya que contribuye a la formación de una especie de bolsillo donde el átomo podría quedar retenido por estas cadenas. Es importante destacar que este sitio se ubica en una región muy parecida al sitio de unión interno de la proteína CHAD de *S. chartreusis* (Fig. 11). Aunque el posible sitio difiere en la presencia de un residuo de serina en lugar de una histidina, podría ser considerado un sitio de unión canónico para cobre.

Al alinear las estructuras de las proteínas CHAD de *E. coli* y *S. chartreusis*, se observa que el sitio de unión a ion cuproso predicho para *E. coli* se encuentra en una región del dominio opuesta al sitio de cobre reportado de *S. chartreusis*, como si se tratara de imágenes especulares (Fig. 18). El sitio predicho para *E. coli* se encuentra en una zona conservada del dominio y está ubicado cerca de lo que sería el pseudo poro central para *E. coli*.

Finalmente, en base al cristal de la proteína PptA de *S. chartreusis* que muestra dos sitios de unión a cobre, la predicción realizada por el servidor MIB y el posterior análisis del “docking” en VMD, se decidió mutar los residuos His345 e His349, reemplazándolos por alaninas, lo que resulta en una pérdida de función. Al ensayar estas cepas mutantes a cobre, se observó que estas son más sensible al metal que la cepa silvestre, sin embargo, más resistentes que la cepa  $\Delta ygiF$  (Fig. 20). Esto sugiere que, si bien el sitio de cobre tiene un rol en la resistencia, no es el único factor involucrado, y posiblemente haya otro mecanismo que permite a la cepa hacer frente al estrés causado por el cobre. Estos resultados permiten especular que las proteínas CHAD tienen la capacidad de unir cobre, pero es probable que no actúen exclusivamente como chaperonas quelantes de cobre, al menos no en su totalidad.

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos biolixiviantes acumulan gran cantidad de PoliP en su citoplasma. Sin embargo, cuando son expuestos al cobre, los gránulos se degradan rápidamente, como es el caso de *A. ferrooxidans* (Alvarez y cols., 2004) o la arquea *S. metallicus* (Remonsellez y cols., 2006). No obstante, esta degradación se detiene posteriormente y los niveles de PoliP comienzan a recuperarse. Por lo tanto, se propone que las proteínas CHAD se unen a los gránulos de PoliP en forma específica (Lorenzo-orts y cols., 2019), posiblemente para protegerlos de la degradación por la enzima PPX. No obstante, cuando se produce un estímulo como la presencia de cobre, la proteína CHAD se disociaría del gránulo permitiendo su degradación. En este trabajo se especula que este mecanismo de disociación de las proteínas CHAD del gránulo de PoliP está relacionado con los sitios de unión a cobre. Para probar esta hipótesis, se midieron los niveles de PoliP en las cepas mutantes sitio-dirigidas (Fig. 21).

Las cepas silvestre y  $\Delta ygiF$  muestran un comportamiento similar al reportado previamente en otros microorganismos (Alvarez y cols., 2004). Se observa que, al agregar un estímulo como la presencia de cobre, los niveles de PoliP disminuyen rápidamente. Sin embargo, en la cepa variante

*ygiF*\*H345,349A este comportamiento no se reproduce. Sus niveles de PoliP parecieran no alterarse ante la presencia del cobre. Esto se podría interpretarse de la siguiente manera. Al tener el posible sitio de unión a cobre mutado, la proteína YgiF no se disociaría del granulo de PoliP en respuesta a la presencia del metal, lo que impediría su disponibilidad. Esto resultaría en una mayor sensibilidad, como se observa en la figura 20.

#### **Dinámica celular de la proteína YgiF en presencia de cobre.**

Finalmente, mediante microscopía de fluorescencia, se pudo observar la dinámica celular de la proteína YgiF tanto en presencia como ausencia de cobre (Figs. 24 y 25). Se observó que, como se ha reportado previamente en otras bacterias y arqueas (Tumlirsch y Jendrossek., 2017, Lorenzo-Orts y cols., 2019), la proteína CHAD de *E. coli* se une a los gránulos de PoliP (Fig. 24). Sin embargo, y de acuerdo con la hipótesis planteada, cuando la célula es expuesta a cobre, la proteína se disocia del gránulo de PoliP (Fig. 25, 30 minutos).

Después de aproximadamente una hora de exposición a cobre, se observa gradualmente la reformación del foco PoliP-YgiF, probablemente como un mecanismo para detener la degradación del PoliP y permitir formación de futuros gránulos (flechas grises, Fig. 25). A las 24 horas luego de la exposición del metal se puede observar claramente que la proteína ocupa una posición definida dentro de la célula, co-localizando nuevamente con los gránulos de PoliP.

En procariontes, se encuentran cadenas largas de PoliP en gránulos que se distribuyen a lo largo o cerca de la región nucleóide (Keasling., 1997). En la figura S10, se puede observar que la proteína YgiF no sólo se localiza en los gránulos de PoliP, sino que también en los polos celulares, posiblemente para asegurar la presencia de gránulos de PoliP en las futuras células. Esto ha sido previamente reportado por Tumlirsch (Tumlirsch y Jendrossek., 2017), donde se menciona que la sobreexpresión de la proteína CHAD en *R. eutropha* localizó la proteína en los polos de las células.



Se debe tener en cuenta que esta proteína YgiF se está expresando bajo un inductor de 2 mM de IPTG.

La idea que la proteína YgiF se localiza en los polos celulares para asegurar la futura división del gránulo, se basa en análisis bioinformáticos (Fig.7). En estos análisis se muestra que dentro del contexto genético del género *Acidithiobacillus* se encuentra el gen *parA* relacionado a la partición efectiva de plásmidos en *E. coli*.

En análisis adicionales que se realizaron en nuestro laboratorio, se identificó sólo un promotor aguas arriba del gen *fold*, lo que sugiere fuertemente que los genes *fold-ppk-CHAD-parA* podrían formar una unidad transcripcional.

En base a estos hallazgos, nuestro grupo de trabajo propone que el potencial operón *fold-ppk-CHAD-parA* podría constituir un sistema de síntesis y metabolismo de los PoliP en bacterias. Según esto, los PoliP serían sintetizados inicialmente mediante PPK, protegidos por la proteína CHAD para mantener su integridad y, considerando la cercanía estructural entre los PoliP y el ADN, promoviendo la migración de los gránulos hacia los polos durante la división celular mediante la actividad de ParA.

La proteína YgiF de *E. coli* ha sido reportada como una trifosfatasa inorgánica (Martínez y cols., 2015, Moeder y cols., 2013), función que se le atribuye al dominio catalítico CYTH (nombrada así por encontrarse en enzimas que actúan sobre sustratos trifosforilados). Este dominio es el sitio que cataliza la hidrólisis de sustratos que contienen trifosfato inorgánico (Tunnel Metalloenzyme Catalytic Domain, TTM) (Kohn y cols., 2012).

La función de las proteínas que contienen dominios CYTH aún no está completamente dilucidada. Sin embargo, la evidencia sugiere que la mayoría de ellas son fosfohidrolasas (Bettendorff y Wins., 2013), aunque también se les ha relacionado con adenilil ciclasas (Moya-Beltran y cols.,

2019). Estas enzimas desempeñan diversas funciones, como regulación de la actividad enzimática, metabolismo de nucleótidos, transducción de señales, entre otras.

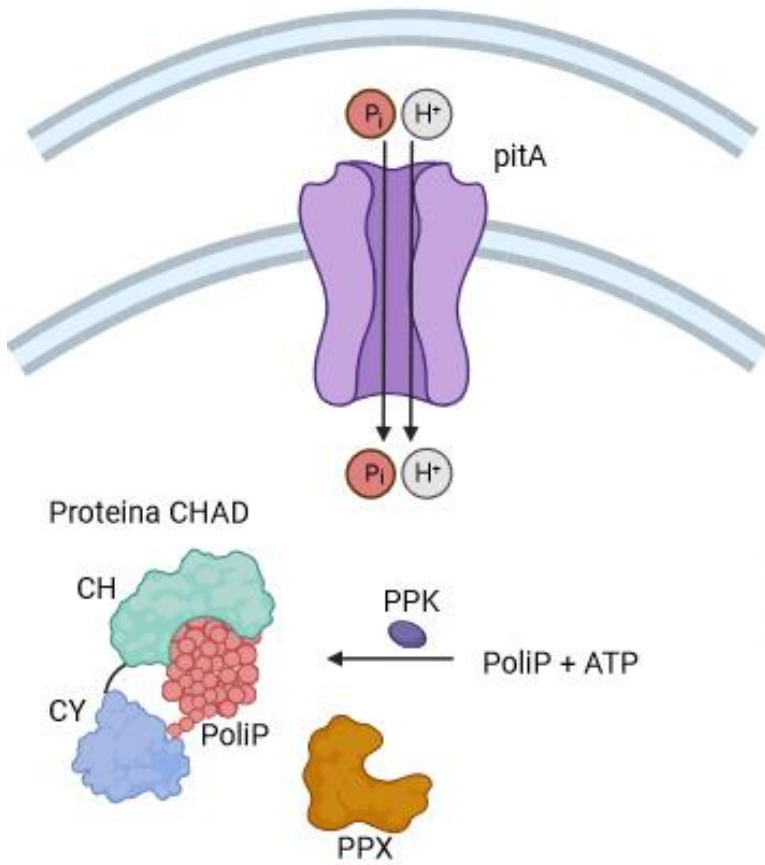
En bacterias, la primera proteína CYTH caracterizada fue CyaB de *A. hydrophila*. Se descubrió que tenía actividad adenilato ciclasa (Sismeiro O y cols., 1998). Basándose en esto, se propuso originalmente que el dominio enzimático CYTH desempeñaría un papel central en la interfaz entre el metabolismo de nucleótidos y fosfatos (Iyer y Aranvid., 2002), incluso relacionando la regulación de la actividad de adenilato ciclasas de las bacterias del género *Acidithiobacillus* con la presencia de PoliP (Moya-Beltran y cols., 2019).

Los gránulos de PoliP se conforman por decenas y hasta cientos de residuos de fosfato. Cuando la proteína YgiF se une al gránulo de PoliP a través del dominio CHAD, es posible que el dominio CYTH se una al extremo del PoliP, bloqueando así su función de señalizador celular y al mismo tiempo bloqueando el acceso de la exopolifosfatasa PPX. Sin embargo, cuando se produce un estímulo como el cobre, que requiere de la degradación de este polímero, la proteína YgiF se disociaría del gránulo, liberando así al dominio CYTH del extremo del PoliP. Esto resultaría en dos eventos: 1. El dominio CYTH quedaría disponible para recibir residuos de trifosfato y desencadenar una respuesta de señalización celular que se traduciría en la producción de más energía, la cual podría ser utilizada, por ejemplo, por la ATPasa CopA. Esto podría explicar por qué, incluso cuando el dominio CYTH está sin el dominio CHAD, la célula es capaz de restaurar parcialmente el fenotipo silvestre, ya que este dominio estaría siempre disponible como señalizador celular, lo que resultaría en niveles elevados de energía en la célula. 2. El acceso al extremo del PoliP quedaría libre, permitiendo la actividad de la exopolifosfatasa (PPX). El  $P_i$  liberado desde los gránulos se uniría al cobre y dicho complejo Cu- $P_i$  sería expulsado del citoplasma mediante el transportador de fosfato PitA. Este mecanismo se podría considerar como un mecanismo de defensa inmediato, que se activaría dentro de los primeros minutos de estrés

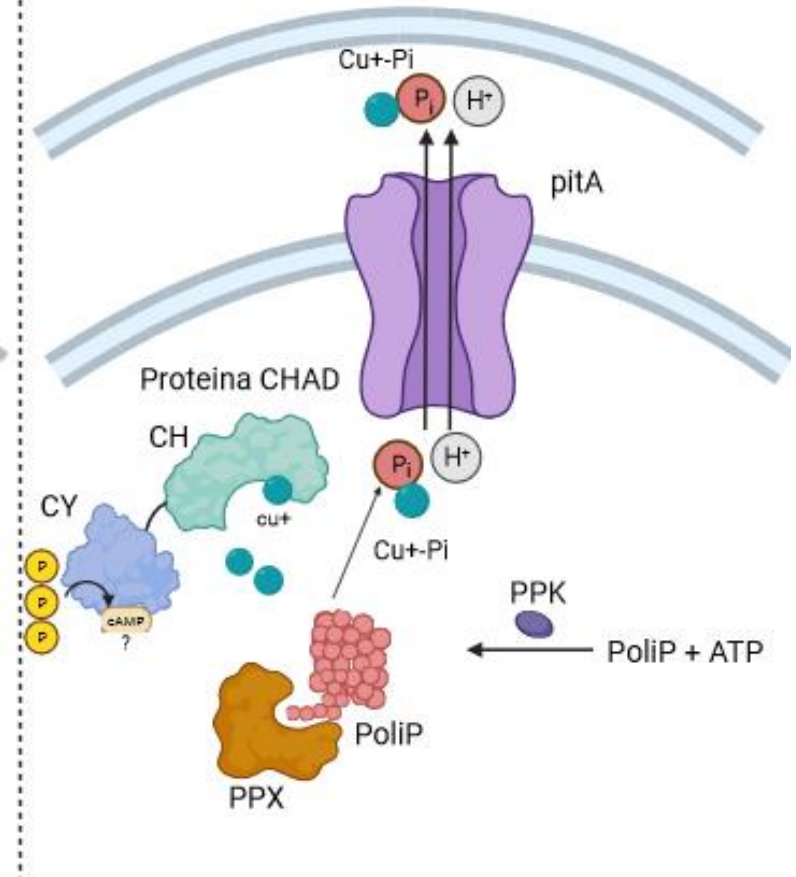
celular. Una vez que se induce la expresión de los determinantes canónicos de resistencia al metal (CopA, sistema CusCFBA, y la multioxidasa CueO), los niveles de cobre en el citoplasma disminuirían y la proteína YgiF volvería a asociarse a los PoliP, deteniendo así su degradación (Fig. 26).

Medio  
extracelular

*E. coli* en ausencia  
de cobre



*E. coli* en presencia  
de cobre



Citosol

**Figura 26.** Modelo hipotético de la actividad de las proteínas CHAD en la dinámica de los polifosfatos. Los PoliP serían sintetizados inicialmente mediante la enzima PPK y protegidos por la proteína CHAD para mantener su integridad. Cuando la proteína CHAD se une al gránulo de PoliP a través del dominio CHAD (CH), es posible que el dominio CYTH (CY) se una al extremo de éste, bloqueando así la señalización celular y la acción de la exopolifosfatasa PPX. Sin embargo, cuando se produce un estímulo como la presencia de cobre que requiere la degradación del polímero, la proteína CHAD se separa del gránulo, liberando el dominio CYTH del extremo del PoliP. Esto tiene dos efectos: 1. El dominio CYTH se vuelve disponible para la señalización celular. 2. El extremo del PoliP se libera, permitiendo la actividad de la exopolifosfatasa. El fosfato liberado se uniría al cobre y sería exportado del citoplasma mediante el transportador de fosfato PitA.

Esta hipótesis se basa también en los reportes del grupo de Rapisarda, donde se muestra que la adición de cobre a células tolerantes de *E. coli* induce la degradación de PoliP a través de la enzima PPX, el eflujo de fosfato mediante el transportador PitA y la polarización de membrana en pocos minutos después de la exposición al metal (Grillo-Puertas y cols., 2014). Aunque el trabajo de Rapisarda no demostró específicamente el eflujo de cobre o la formación de complejos intracelulares  $P_i-Cu^+$ , la alta liberación de  $P_i$  y la elevada polarización de la membrana en las células indican que los altos niveles de PoliP y su degradación inducida por el metal conducirían a la formación de complejos metal-fosfato y su posterior expulsión. Además, el grupo informó que, durante la fase exponencial, tanto CopA como el sistema PoliP-Pit podrían actuar simultáneamente para detoxificar la célula del metal, o uno podría activarse para compensar la inactividad del otro y mantener una homeostasis celular frente al estrés inducido por el cobre.

**Proyecciones sobre el acidófilo *A. ferrooxidans*.**

Como se mencionó anteriormente, se especula que el grupo de genes conservados *folD-ppk-CHAD-parA* podría formar una unidad transcripcional en bacterias del género *Acidithiobacilli*. Además, se ha propuesto una relación entre una bomba de eflujo de la familia RND conservada en la vecindad génica de la adenilato ciclasa de este grupo, posiblemente eliminando complejos de Pi-metal (Moya-Beltran y cols., 2019). Por lo tanto, la organización de la vecindad génica de CHAD sugiere un sistema de síntesis y metabolismo de PoliP en bacterias acidófilas que relaciona los niveles de PoliP, ATP (Actividad ciclasa del dominio CYTH) y la división celular para actuar integralmente.

Esta idea se sustenta con los resultados obtenidos en la Fig. 8, donde se muestra que al eliminar el gen que codifica para YgiF en *E. coli*, esta se vuelve más sensible a cobre. Sin embargo, resulta llamativo que al complementar la cepa *ygiF::cm* con el gen *Afe\_1874*, que codifica para la proteína CHAD de *A. ferrooxidans*, ésta presenta un aumento en la resistencia a cobre, incluso mejor que la cepa silvestre, superando el crecimiento de esta última (Fig. 10).

Esto podría explicarse debido a la estructura de la proteína CHAD de *A. ferrooxidans*, la cual consta de dos conjuntos de alfa hélices, formando un poro central, a diferencia de *E. coli* que sólo posee un conjunto. Por lo tanto, *A. ferrooxidans* posiblemente podría unir PoliP de manera más eficiente que *E. coli*, la cual no formaría el poro completo.

Sería interesante analizar la participación de este dominio CHAD con el poro completo de *A. ferrooxidans* mediante el análisis de una proteína quimérica que conste del dominio CYTH de *E. coli*, pero el dominio CHAD de *A. ferrooxidans*.

Basándose en los resultados obtenidos en esta tesis, se propone que estos hallazgos se pueden extrapolar a otros microorganismos, en particular a aquellos que participan en procesos de

biominería, como *A. ferrooxidans*. En este microorganismo es probable que la contribución de la proteína CHAD tenga un mayor peso que en *E. coli*, ya que *A. ferrooxidans* es un microorganismo hiperacumulador de PoliP. Esto se podría reflejar en los niveles de PoliP al adicionar cobre. Aunque en la cepa mutante *ygiF::cm* de *E. coli* se observa una disminución de PoliP, esta no es significativa (Fig. 21), a diferencia de lo que podría ocurrir en *A. ferrooxidans*.

Además, esta extrapolación podría aplicarse también a la detoxificación de otros metales pesados, como el cadmio, ya que la resistencia a este metal en bacterias ha sido relacionada con los niveles de PoliP en investigaciones previas (Aiking, H y cols., 1984).

## CONCLUSIONES

La ausencia de la proteína YgiF resultó en una cepa con mayor sensibilidad al cobre en comparación con la cepa silvestre. Además, cuando se mutó el posible sitio de unión al ion cuproso de la proteína, esta cepa también fue más sensible, lo que sugiere la participación de YgiF en la respuesta celular de *E. coli* frente a la presencia de cobre. Esta es la primera evidencia de la participación de las proteínas CHAD en la resistencia a cobre.

Mediante la microscopía de fluorescencia fue posible observar que, aunque la proteína YgiF se une a los gránulos de PoliP, en presencia de cobre se disocia del gránulo. Sin embargo, esta disociación dura solamente unas horas, ya que a medida que pasa el tiempo, la proteína vuelve a asociarse a los gránulos.

Basándose en los resultados obtenidos, se propone que las proteínas CHAD son proteínas de unión a los gránulos de PoliP, cuyo papel estaría involucrado en el metabolismo de los PoliP, protegiéndolos y manteniendo su integridad. Sin embargo, frente a estímulos como la presencia de cobre, la proteína se disocia de los gránulos para permitir su degradación mediante la enzima PPX. Este sería un mecanismo de defensa inmediato importante para hacer frente al estrés por cobre.

El desarrollo de un “time lapse”, a través de la captura de imágenes en células vivas utilizando el microscopio automático LIONHEART FX podría esclarecer en un futuro aún más la dinámica exacta de las proteínas CHAD en relación con los gránulos de PoliP, permitiendo al mismo tiempo realizar un seguimiento de un sólo conjunto de células.

La generación de cepas mutantes múltiples en las proteínas que participan en la resistencia a cobre mediada por los polifosfatos, podrían ayudar a determinar el modo exacto en que las proteínas



CHAD participan en la resistencia al metal. Una mejor comprensión de este mecanismo podría ser relevante para potenciar las adaptaciones microbianas a su entorno.

Los resultados presentados en esta tesis permiten ampliar el conocimiento de los mecanismos de resistencia al cobre en la bacteria modelo *Escherichia coli* y pueden abrir nuevas vías de investigación para desarrollar estrategias biotecnológicas destinadas a diseñar organismos con capacidades mejoradas en la tolerancia a metales pesados. Es de especial interés analizar si estos hallazgos pueden extrapolarse a microorganismos tolerantes a cobre, especialmente a aquellos utilizados en procesos de biolixiviación.

### **FINANCIAMIENTO**

La tesis forma parte del Proyecto FONDECYT 1191554 otorgado al Dr. Carlos A. Jerez, titulado “Polyphosphate associated proteins and role of the polymer as an inorganic chaperone and in defense against stress in bacteria and archaea”.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Aiking H, A Stijnman, C van Garderen, H van Heerikhuizen, and J van't Riet (1984). Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:374–377.
- Ahn K, y Kornberg A (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J Biol Chem* 265: 11734–11739.
- Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. (1993). An exoPolyPhosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a PolyPhosphate operon. *J Biol Chem.* 268: 633-639.
- Alvarez S, y Jerez CA (2004). Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* 70, 5177-5182.
- Banu B. S, Ishaq M, Danadevi K, Padmavathi P, y Ahuja Y. R. (2004). DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. *Food and chemical toxicology*, 42(12), 1931-1936.
- Bettendorff L, y Wins P (2013). Thiamine triphosphatase and the CYTH superfamily of proteins. *The FEBS journal*, 280(24), 6443-6455.
- Bustamante Correa, J. N. (2022). Estudio del rol de la proteína con dominio CHAD de *Escherichia coli* (trifosfatasa inorgánica YgiF) en su sensibilidad a cobre (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Brown MRW, y Kornberg A (2004). Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16085–16087. doi:10.1073/pnas.0406909101.
- Bruins M. R, Kapil S, y Oehme F. W (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207.
- Datsenko K.A, y Wanner B.L (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6640- 6645.
- Dopson M y Johnson D. B (2012). Biodiversity, metabolism and applications of acidophilic sulfur-metabolizing microorganisms. *Environmental Microbiology*, 14(10), 2620-2631.
- Franke S, Grass G, Rensing C, Nies D (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 185(13): 3804-3812.
- Grillo-Puertas M, Schurig-Briccio L. A, Rodríguez-Montelongo L, Rintoul M. R., y Rapisarda V. A. (2014). Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *BMC microbiology*, 14(1), 1-10.
- Ho S. N, Hunt H. D, Horton R. M, Pullen J. K, y Pease L. R (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51-59.
- Ibáñez M. M, Checa S. K, y Soncini F. C. (2015). A single serine residue determines selectivity to monovalent metal ions in metalloregulators of the MerR family. *Journal of bacteriology*, 197(9), 1606-1613.

Illergård K, Ardell D. H, y Elofsson A. (2009). Structure is three to ten times more conserved than sequence--a study of structural response in protein cores. *Proteins*, 77(3), 499–508. <https://doi.org/10.1002/PROT.22458>.

Iyer L. M, y Aravind L (2002). The catalytic domains of thiamine triphosphatase and CyaB-like adenyl cyclase define a novel superfamily of domains that bind organic phosphates. *BMC genomics*, 3, 1-11.

Keasling JD (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann New York Acad Sci.* 829, 242-249.

Konaté M. M, Plata G, Park J, Usmanova D. R, Wang H, y Vitkup D. (2019). Molecular function limits divergent protein evolution on planetary timescales. *ELife*, 8, e39705. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.39705>.

Kornberg SR (1957). Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 26: 294–300. doi:10.1016/0006-3002(57)90008-2.

Kornberg A, Rao N. N y Ault-riché D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 89–125.

Krumschnabel G, Manzl C, Berger C y Hofer B (2005). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 209(1), 62-73.

Kulaev S, y Kulakovskaya T (2000). PolyPhosphate and phosphate pump. *Ann Rev Microbiol.* 54: 709-734.

Linder M. C (1991). Introduction and overview of copper as an element essential for life. *Biochemistry of copper*, 1-13.

Lorenzo-Orts L, Hohmann U, Zhu J, Hothorn M (2019). Molecular characterization of CHAD domains as inorganic PolyPhosphate-binding modules. *Life Sci Alliance* 2(3): e201900385. DOI: 10.26508/lsa.201900385.

Martinez J, Truffault V, y Hothorn, M. (2015). Structural determinants for substrate binding and catalysis in triphosphate tunnel metalloenzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 290(38), 23348-23360.

Magnani D, y Solioz M (2007). How bacteria handle copper. In *Molecular microbiology of heavy metals* (pp. 259-285). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Moeder W, Garcia-Petit C, Ung H, Fucile G, Samuel M. A, Christendat D, y Yoshioka K (2013). Crystal structure and biochemical analyses reveal that the *A. rabidopsis* triphosphate tunnel metalloenzyme At TTM3 is a tripolyphosphatase involved in root development. *The Plant Journal*, 76(4), 615-626.

Martínez-Bussenius C, Navarro CA, Jerez CA (2017). Microbial copper resistance: importance in biohydrometallurgy. *Microbial Biotechnol.* 10, 279-295.

Morales J. M. L, y Jiménez G. S (2012). El daño por oxidación causado por cobre y la respuesta antioxidante de las plantas. *Interciencia*, 37(11), 805-811.

- Morohoshi T, Maruo T, Shirai Y, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kuroda A (2002). Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis sp.* strain PCC6803. *Appl Environ Microbiol* 68(8): 4107-10.
- Moya-Beltrán A, Rojas-Villalobos C, Díaz M, Guiliani N, Quatrini R, y Castro M. (2019). Nucleotide second messenger-based signaling in extreme acidophiles of the *Acidithiobacillus* species complex: Partition between the core and variable gene complements. *Frontiers in Microbiology*, 10, 381.
- Navarro CA, Orellana LH, Mauriaca C, Jerez CA (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, and Jerez, C. A. (2013). Heavy metal resistance strategies of acidophilic bacteria and their acquisition: importance for biomining and bioremediation. *Biol. Res.* 46, 363–371. doi: 10.4067/S0716-97602013000400008.
- Orell A, Navarro CA, Arancibia R, Mobarec J. C, y Jerez, C. A (2010). Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnology advances*, 28(6), 839-848.
- Orell A, Navarro CA, Rivero M, Aguilar JS, Jerez CA (2012). Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. *Extremophiles.* 2012; 16, 573-583. DOI. 1007/s00792-012-0457-9.
- Outten F, Outten C, Hale J, O'Halloran T (2000). Transcriptional activation of an *E. coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, CueR. *J. Biol. Chem.* 275:31024-31029.
- Peña MO, Lee J, Thiele D (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 129: 1-1260.
- Rangarajan E.S, Nadeau O, Li Y, Wagner J, Hung M.N, Schrag J.D, Cygier M, Matte A (2006). The structure of the exoPolyPhosphatase (PPX) from *Escherichia coli* 0157:H7 suggest a binding mode for long polyphosphate chains. *J Mol Biol.* 359: 1249-1260.
- Rao N. N, Liu S, y Kornberg A (1998). Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *Journal of bacteriology*, 180(8), 2186-2193.
- Rao NN, Gómez-García MR, Kornberg A (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu Rev Biochem.* 78, 35.1-35.43.
- Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, Kornberg (2000). A Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 97(17): 9636-9641.
- Remonsellez F, Orell A, Jerez CA (2006). Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology.* 152, 59-66.
- Rensing C, Fan B, Sharma R., Mitra B, y Rosen B. P (2000). CopA: an *Escherichia coli* Cu (I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 652-656.

Rensing C, y Grass G. (2002). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 197-213.

Rubino J. T, y Franz K. J (2012). Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of inorganic biochemistry*, 107(1), 129-143.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White D.J, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, y Cardona A (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676-682.

Silver S, y Phung L. T (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual review of microbiology*, 50(1), 753-789.

Singh S, Grass G, Rensing C, Montfort W (2004). Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186:7815-17.

Sismeyro O, Trotot P, Biville F, Vivares C, y Danchin A (1998). *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *Journal of Bacteriology*, 180(13), 3339-3344.

Soto D.F, Recalde A, Orell A, Albers S.V, Paradela A, Navarro C. A, y Jerez, C. A (2019). Global effect of the lack of inorganic polyphosphate in the extremophilic archaeon *Sulfolobus Solfataricus*: A proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 191, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.024>.

Teitzel G. M, Geddie A, De Long S. K, Kirisits M. J, Whiteley M, y Parsek M. R (2006). Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 188(20), 7242-7256.

Tian W y Skolnick J (2003). How well is enzyme function conserved as a function of pairwise sequence identity? *Journal of Molecular Biology*, 333(4), 863–882. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2003.08.057>.

Tumlirsch T, y Jendrossek D (2017). Proteins with CHADs (Conserved Histidine Alpha-helical Domains) are attached to PolyPhosphate granules *in vivo* and constitute a novel family of PolyPhosphate-associated proteins (Phosins). *Appl Environ Microbiol.* 83, 1-14.

Ulloa, G, Quezada, C. P, Araneda, M, Escobar, B, Fuentes, E, Álvarez, S. A, Castro, M, Bruna, N, Espinoza-Gonzalez R, Bravo, D, Perez-Donoso, J (2018). Phosphate favors the biosynthesis of CdS Quantum Dots in *Acidithiobacillus thiooxidans* ATCC 19703 by improving metal uptake and tolerance. *Front. Microbiol.* 9:234. doi: 10.3389/fmicb.2018.00234.

Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanowitz J, Hunt D.F, y Jerez C. A (2006). Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnology advances*, 24(2), 197-211.

Werten S, Rustmeier N. H, Gemmer M., Virolle M. J, y Hinrichs W (2019). Structural and biochemical analysis of a phosin from *Streptomyces chartreusis* reveals a combined polyphosphate-and metal-binding fold. *FEBS letters*, 593(15), 2019-2029.

**MATERIAL SUPLEMENTARIO****Tabla S1.** Partidores utilizados y sus usos.

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Uso</b>
ygiF H1P1	AAGTTTATTGTTAATCACAGTGCCGTTGAGGCGTTG CGTG ACCATCTCAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Generación cepa mutante <i>ygiF::cm</i>
ygiF H2P1	AGAACGGTTCCTGATTGTTTGCTCATTACGGAAAT GTTC AATTCGATGATGGGAATTAGCCATGGTCC	Generación cepa mutante <i>ygiF::cm</i>
ygiF fwe	CCATGGCTCAGGAAATCGAATTAAG	Análisis mutación gen <i>ygiF</i> Clonamiento gen <i>ygiF</i> completo
ygiF rve	AAGCTTACGTTTTCCGCTGTGC	Análisis mutación gen <i>ygiF</i> y Clonamiento gen <i>ygiF</i> completo
ygiF_CH fw	CCATGGGTAAAGCCGATGTGGAACAG	Clonamiento dominio CHAD de YgiF
ygiF_CH rv	AAGCTTTTAACGTTTTCCGCTGTGCA	Clonamiento dominio CHAD de YgiF
ygiF_CY fw	CCATGGCTCAGGAAATCGAATT	Clonamiento dominio CYTH de YgiF
ygiF_CY rv	AAGCTTTTAATTGCCCTGCGCCAGAT	Clonamiento dominio CYTH de YgiF
1874_fwNc	CCATGGAACAGGAGCTTAAACTG	Clonamiento gen <i>afe_1874</i> completo
1874_rvHd	AAGCTTGTTCCACGGACGGGGG	Clonamiento gen <i>afe_1874</i> completo
ygiF_rveHd	CCCAGTAAGCTTTTAACGTTTTCCGCTGTGCA	Generación gen mutante <i>ygiF</i>
ygiF_fwNc	TGGCATCCATGGCTCAGGAAATCGAATTAAG	Generación gen mutante <i>ygiF</i>
ygFH345Arv	GGCATGGCGGGAAAGAGCGATATCTGCAAAGCGTTT GAAGG	Generación cepa mutante <i>ygiF*H345A</i>
ygFH345Afd	ACGCTTTGCAGATATCGCTCTTCCCGCCATGCC	Generación cepa mutante <i>ygiF*H345A</i>
ygFH349Arv	CTTTTCAGTTCAGCAGCAGCGGGAAAGATGGATAT CGGC	Generación cepa mutante <i>ygiF*H349A</i>
ygFH349Afd	GCCGATATCCATCTTCCCGCGCTGCTGCTGAACTGA AAAGC	Generación cepa mutante <i>ygiF*H349A</i>
ygF*H349rv	GCTTTTCAGTTCAGCAGCAGCGGGAAAGAGC GATATCTGC	Generación cepa doble mutante <i>ygiF*H345,349A</i>
ygF*H349fd	GCAGATATCGCTCTTCCCGCGCTGCTGCTGAAC TGAAAAGC	Generación cepa doble mutante <i>ygiF*H345,349A</i>
rfp fwBH 2.0	ATGGATCCCACTATGATCACCCCATCTCTGC	Generación gen fusión <i>RFP-</i> <i>ygiF</i>
ygiF rvSI	ATTGTCGACTTAACGTTTTCCGCTGTGCA	Generación gen fusión <i>RFP-</i> <i>ygiF</i>
linker_rv	CCCAGAGTTGTTGTTATTGTTATTGTTGTTGTTG	Generación fragmento 1 gen fusión <i>RFP-ygiF</i>

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

linker fw	AGCTCGAACACAACAACAATAACAATAACAACAA	Generación fragmento 2 gen fusión <i>RFP-ygiF</i>
-----------	------------------------------------	--

El diseño de los partidores se realizó utilizando el programa SnapGene versión 5.3.1. Las propiedades termodinámicas de partidores, tales como la formación de horquillas, interacciones partidador/partidor y sitios de autoalineamiento, se analizaron utilizando el programa “OligoAnalyzer” versión 3.1 ([www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/](http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/)).

**Tabla S2.** Detalle del programa PCR utilizado para generar la cepa de *E. coli* mutante *ygiF::Cm*, las cepas complementadas *ygiF*, *CHAD*, *CYTH* y *Afe*.

Las etapas de la reacción de PCR corresponden a: 1) Desnaturalización, 2) Alineamiento, 3) Extensión.

	Etapas	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
PCR 1 <sup>a</sup>	1	1	94	2:00
	2	35	94	0:15
			50	0:15
			68	1:30
3	1	68	5:00	
PCR 1.2 <sup>b</sup>	1	1	94	5:00
	2	35	94	0:20
			50	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	
PCR 2 <sup>c</sup>	1	1	95	2:00
	2	35	95	0:20
			50	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	

<sup>a</sup> PCR 1: amplificación del fragmento Wanner que comprende un casete de resistencia a cloranfenicol flanqueado por homología al gen *ygiF*.

<sup>b</sup> PCR 1.2: confirmación de la mutación en el gen *ygiF*.

<sup>c</sup> PCR 2: amplificación genes *ygiF*, dominio CHAD (YgiF), dominio CYTH (YgiF) y *Afe*.



**Tabla S3.** Detalle del programa PCR utilizado para generar el gen mutante *ygiF*\*H345A, *ygiF*\*H349A e *ygiF*\*H345,349A de *E. coli*.

Las etapas de la reacción de PCR corresponden a: 1) Desnaturalización, 2) Alineamiento, 3) Extensión.

	Etapa	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
PCR 1 <sup>a</sup>	1	1	95	2:00
	2	35	95	0:20
			56	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	
PCR 2 <sup>b</sup>	1	1	95	2:00
	2	10	95	0:20
			62	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	
PCR 2.1 <sup>c</sup>	1	1	95	2:00
	2	35	95	0:20
			57	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	

<sup>a</sup> amplificación fragmentos 1 y 2 de las cepas variantes *ygiF*\*H345A, *ygiF*\*H349A e *ygiF*\*H345,349A

<sup>b</sup> PCR “overlap”: fusión de los fragmentos 1 y 2

<sup>c</sup> PCR “overlap”: amplificación fragmento mutante final

**Tabla S4.** Detalle del programa PCR utilizado para generar la construcción molecular RFP-YgiF e YgiF-RFP.

Las etapas de la reacción de PCR corresponden a: 1) Desnaturalización, 2) Alineamiento, 3) Extensión.

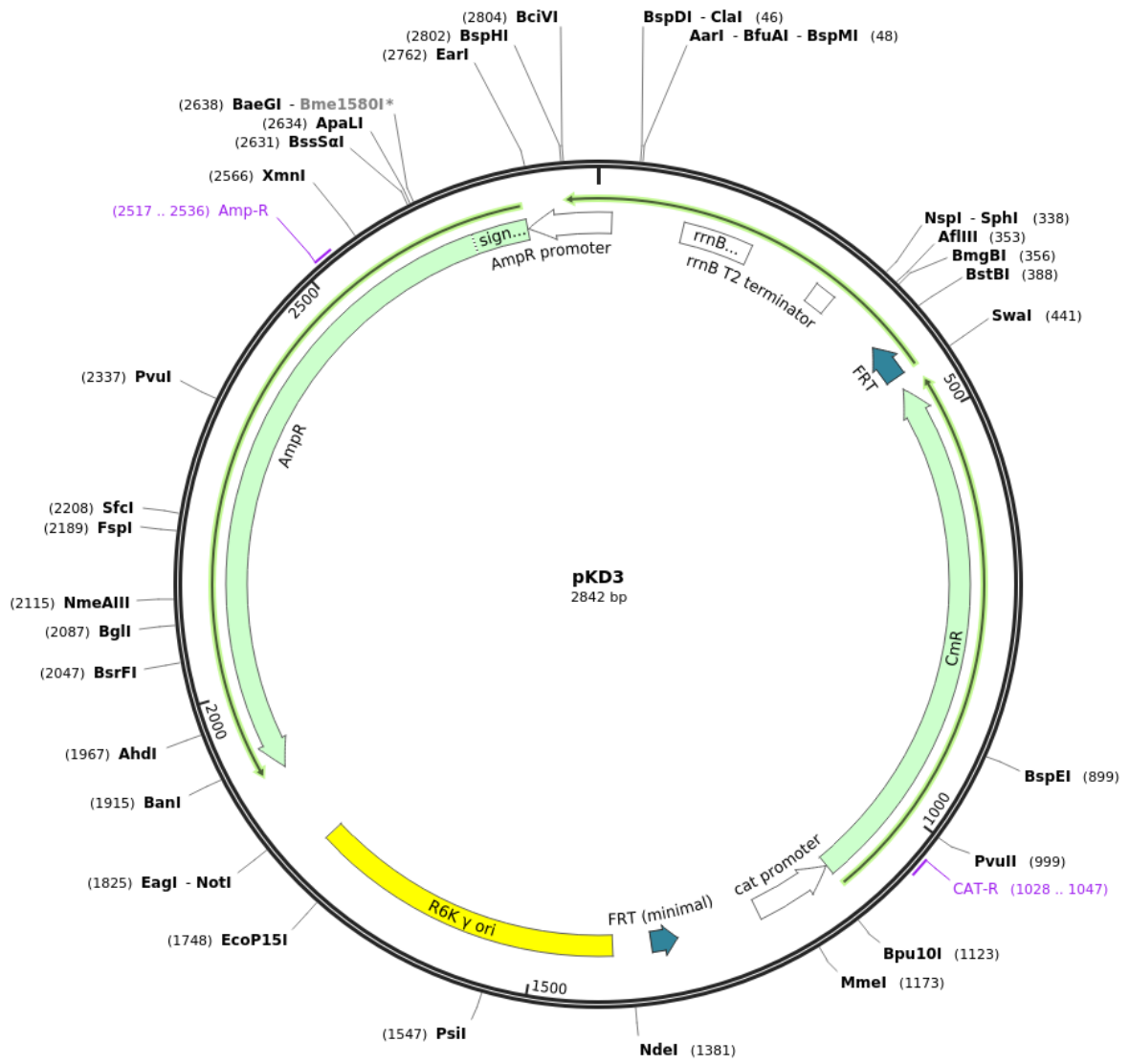
	Etapa	Nº Ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min)
PCR 1 <sup>a</sup>	1	1	95	2:00
	2	35	95	0:20
			51	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	
PCR 2 <sup>b</sup>	1	1	95	2:00
	2	10	95	0:20
			60	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	
PCR 2.1 <sup>c</sup>	1	1	95	2:00
	2	35	95	0:20
			57	0:20
			72	1:30
3	1	72	5:00	

<sup>a</sup> amplificación fragmentos 1 y 2 gen fusión *RFP-ygiF*.

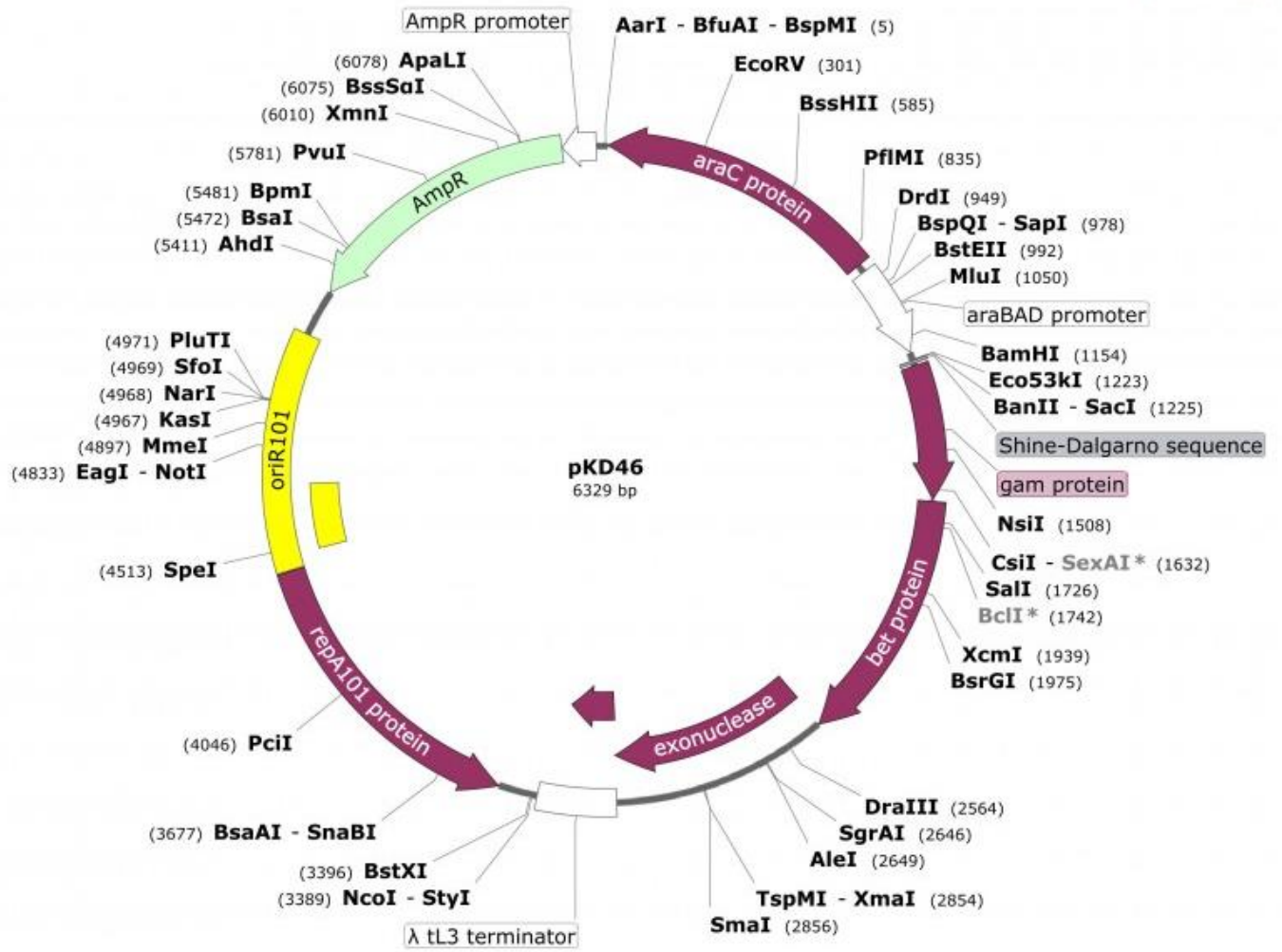
<sup>b</sup> PCR “overlap”: fusión de los fragmentos 1 y 2.

<sup>c</sup> PCR “overlap”: amplificación gen de fusión *RFP-ygiF*.

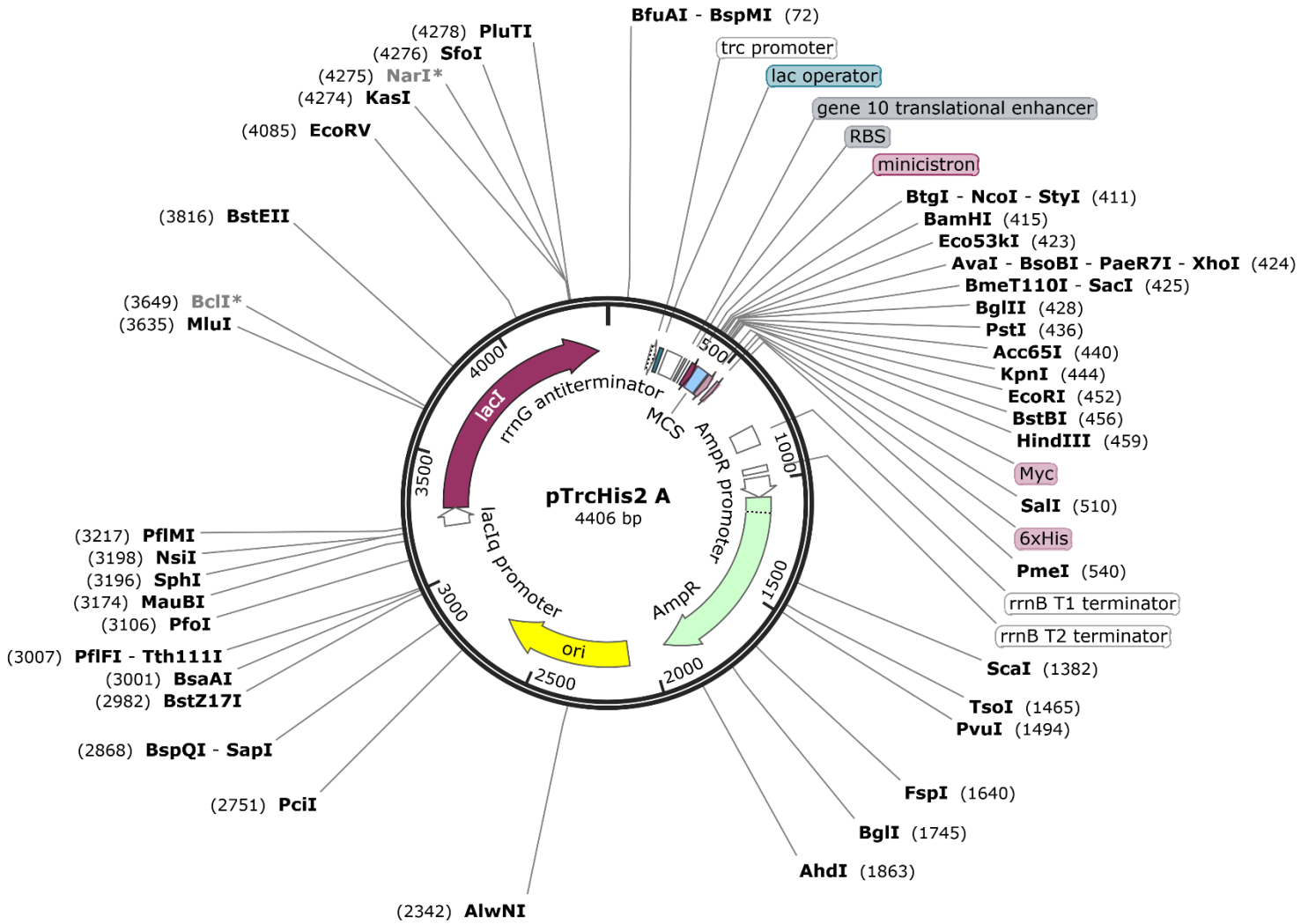
Created with SnapGene®



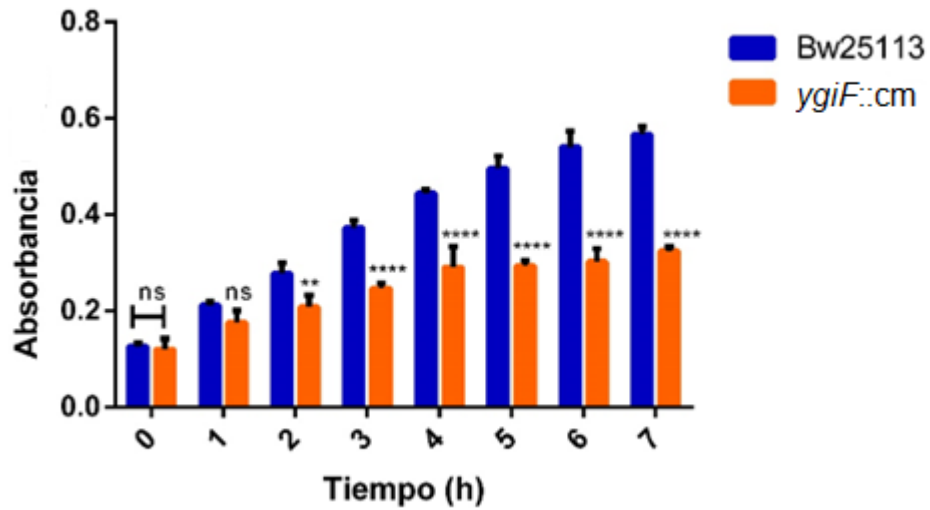
**Figura S1.** Mapa del vector pKD3



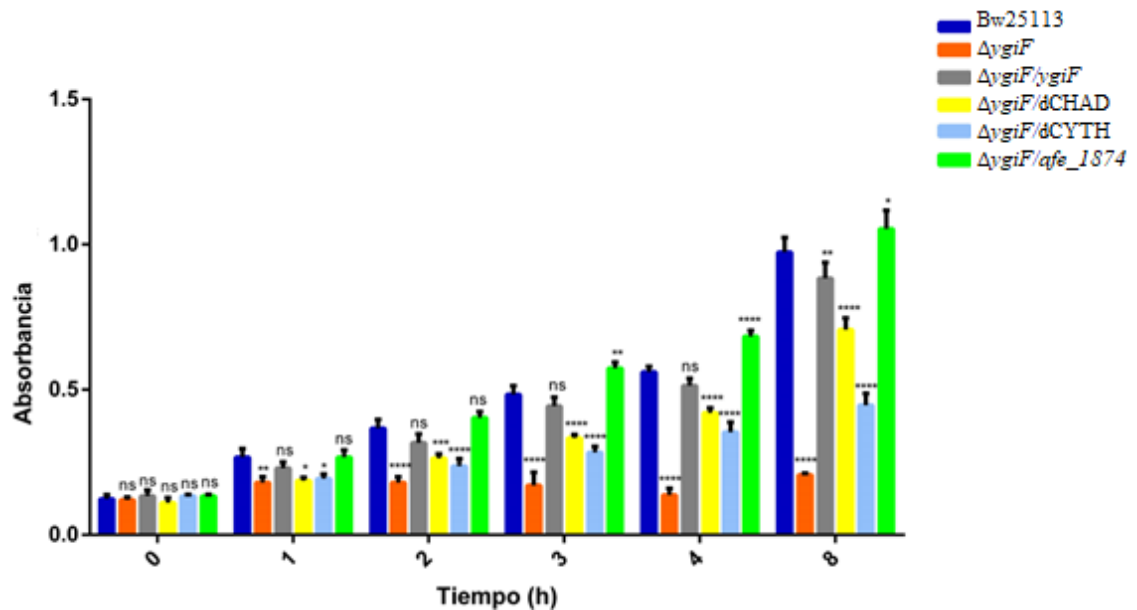
**Figura S2.** Mapa vector pKD46



**Figura S3.** Mapa vector pTrc-His2A



**Figura S4.** Análisis estadístico de la resistencia a cobre en la cepa silvestre e *ygiF::cm* de *E. coli*. El análisis estadístico corresponde al test ANOVA de doble vía, en donde \*\*\*\* indica  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$  y ns no significativo.



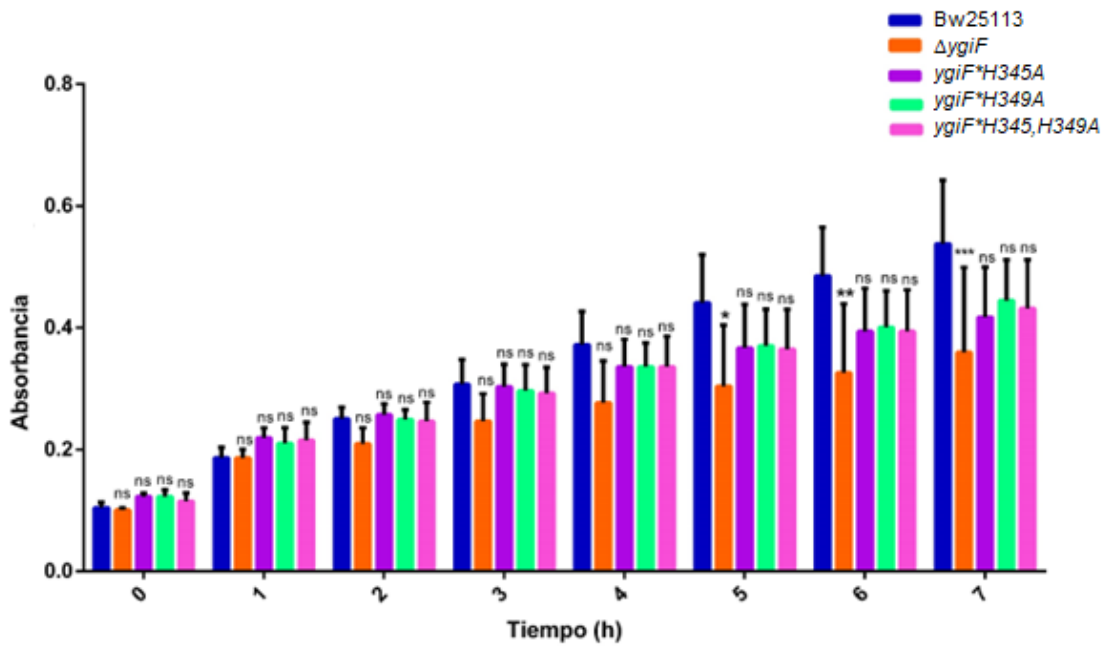
**Figura S5.** Análisis estadístico de la resistencia al cobre de diferentes mutantes de *E. coli*. El análisis estadístico corresponde al test ANOVA de doble vía, en donde \*\*\*\* indica  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$  y ns no significativo.

<i>Chlorobium tepidum</i>				
A	No.	Binding Residues	Template	Score
	1	298S , 299D	1tho_0	1.468
	2	325S , 326D	1tho_0	1.400
	3	329A , 330D	1tho_0	1.009
	4	403S , 404D	1tho_0	0.912
	5	444Q , 445D	1tho_0	0.888
	6	246D , 335H , 339C	1m56B0	0.878
	7	248D , 249S	1ukuA0	0.828
	8	377G , 378D	1tho_0	0.776
	9	475S , 476E	1tho_0	0.775
	10	507S , 508N	1tho_0	0.760
	11	245K , 246D	1tho_0	0.755
	12	364P , 365D	1tho_0	0.706
	13	296R , 297D	1tho_0	0.696
	14	499H , 500E	1m56A0	0.687
	15	394H , 405A , 408H , 409E	1gskA3	0.673
B	No.	Binding Residues	Template	Score
	1	325S , 326D	1tho_0	1.481
	2	331K , 334H , 335H	1opmA0	1.094
	3	276E , 277K	1ukuA0	1.063
	4	329A , 330D	1tho_0	0.974
	5	249S , 250E	1tho_0	0.911
	6	246D , 335H , 339C	1m56B0	0.878
	7	403S , 404D	1tho_0	0.847
	8	245K , 246D	1tho_0	0.826
	9	507S , 508N	1tho_0	0.762
	10	364P , 365D	1tho_0	0.752

<i>Ricinus communis</i>				
No.	Binding Residues	Template	Score	
1	49G , 50H	1a8vB0	1.488	
2	200H , 242H	1bugA0	1.158	
3	243N , 244D	1tho_0	1.059	
4	20A , 21D	1tho_0	1.012	
5	192Q , 193D	1tho_0	0.878	
6	170A , 171H	1a8vB0	0.867	
7	199A , 200H	1a8vB0	0.862	
8	32L , 35C , 64R	1gy2A0	0.862	
9	271G , 272Y	1a8vB0	0.833	
10	196A , 200H , 242H	1iniA0	0.828	
11	194D , 195D	1tho_0	0.827	
12	25S , 26E	1tho_0	0.818	
13	50H , 136H	1and_0	0.815	
14	50H , 132Q , 136H	1hcyA1	0.813	
15	50H , 136H	1bugA0	0.788	
16	175Q , 179H	1hcyA1	0.759	
17	171H , 175Q	1bugA1	0.757	
18	50H , 132Q , 136H	1hcyA0	0.754	
19	132Q , 136H	1bugA1	0.753	
20	50H , 51D	1tho_0	0.747	
21	50H , 136H	1hcyA1	0.743	
22	33G , 34N	1a8vB0	0.740	

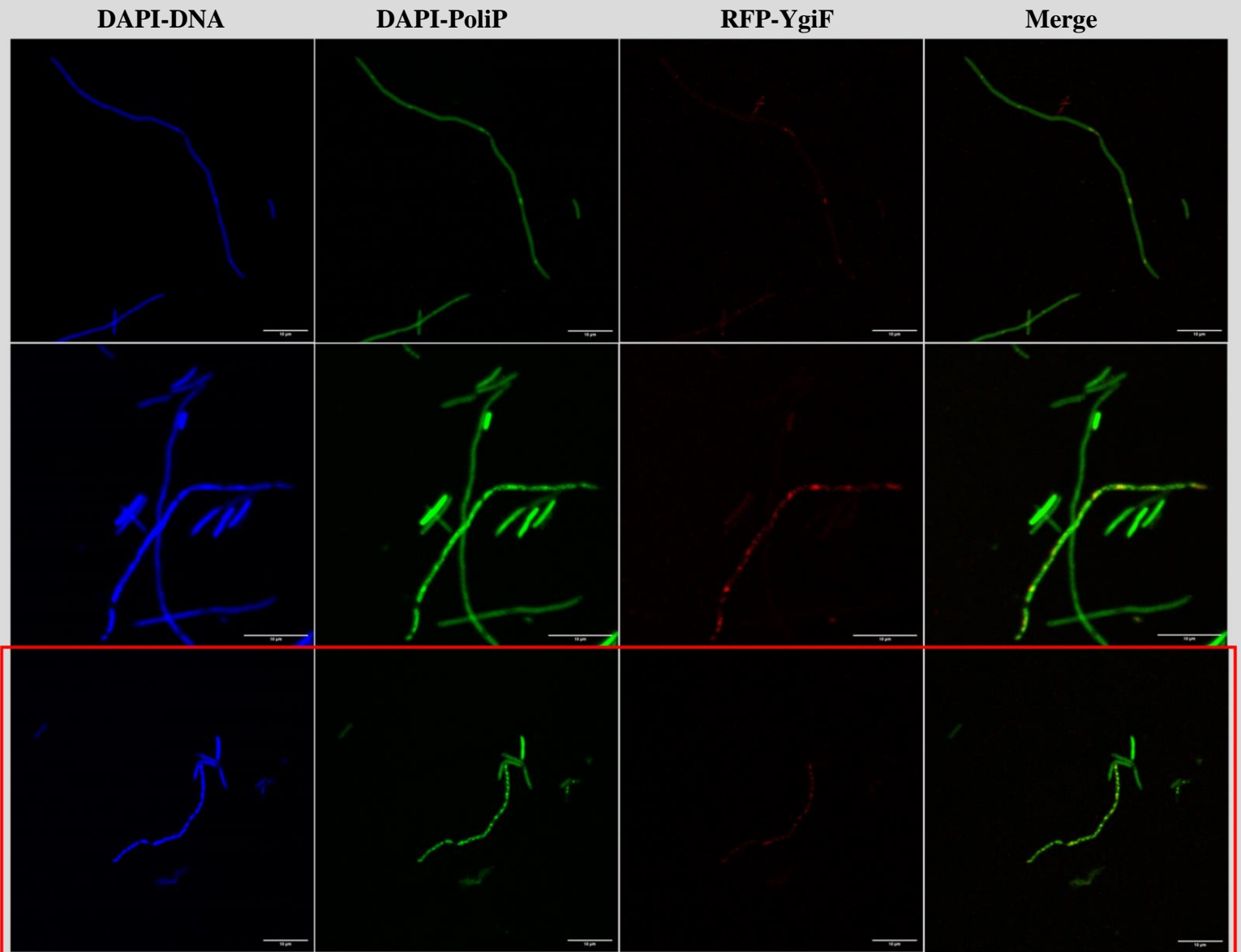
<i>Streptomyces chartreusis</i>				
No.	Binding Residues	Template	Score	
1	101H , 185R , 189H	1noI_1	1.114	
2	260H , 262L , 269H	1a65A0	1.102	
3	80T , 81D	1tho_0	1.052	
4	101H , 185R , 189H	1bugA1	1.039	
5	101H , 185R , 189H	1hcyA1	1.007	
6	205A , 206D	1tho_0	0.995	
7	260H , 269H	1gw0A0	0.971	
8	269H , 351H	1aozA3	0.937	
9	234K , 235D	1tho_0	0.922	
10	347A , 348D	1tho_0	0.911	
11	271Q , 272D	1tho_0	0.872	
12	24G , 25Y	1a8vB0	0.845	
13	260H , 269H	1kcw_0	0.836	
14	38R , 40H , 202H	1a65A1	0.833	
15	269H , 351H	1gw0A2	0.831	
16	188A , 189H	1a8vB0	0.829	
17	55E , 101H , 189H	1a65A1	0.760	
18	269H , 271Q , 315H	1n68A1	0.755	
19	40H , 97L , 101H , 189H	1a65A1	0.747	
20	20D , 22L , 223T , 225D	1n68A2	0.732	
21	269H , 315H , 354E	1n68A1	0.729	

**Figura S6.** Predicción de sitios de unión a Cu<sup>+1</sup> en las proteínas CHAD de: *Chlorobium tepidum* (cadena A y B), *Ricinus communis* y *Streptomyces chartreusis* en el servidor MIB.

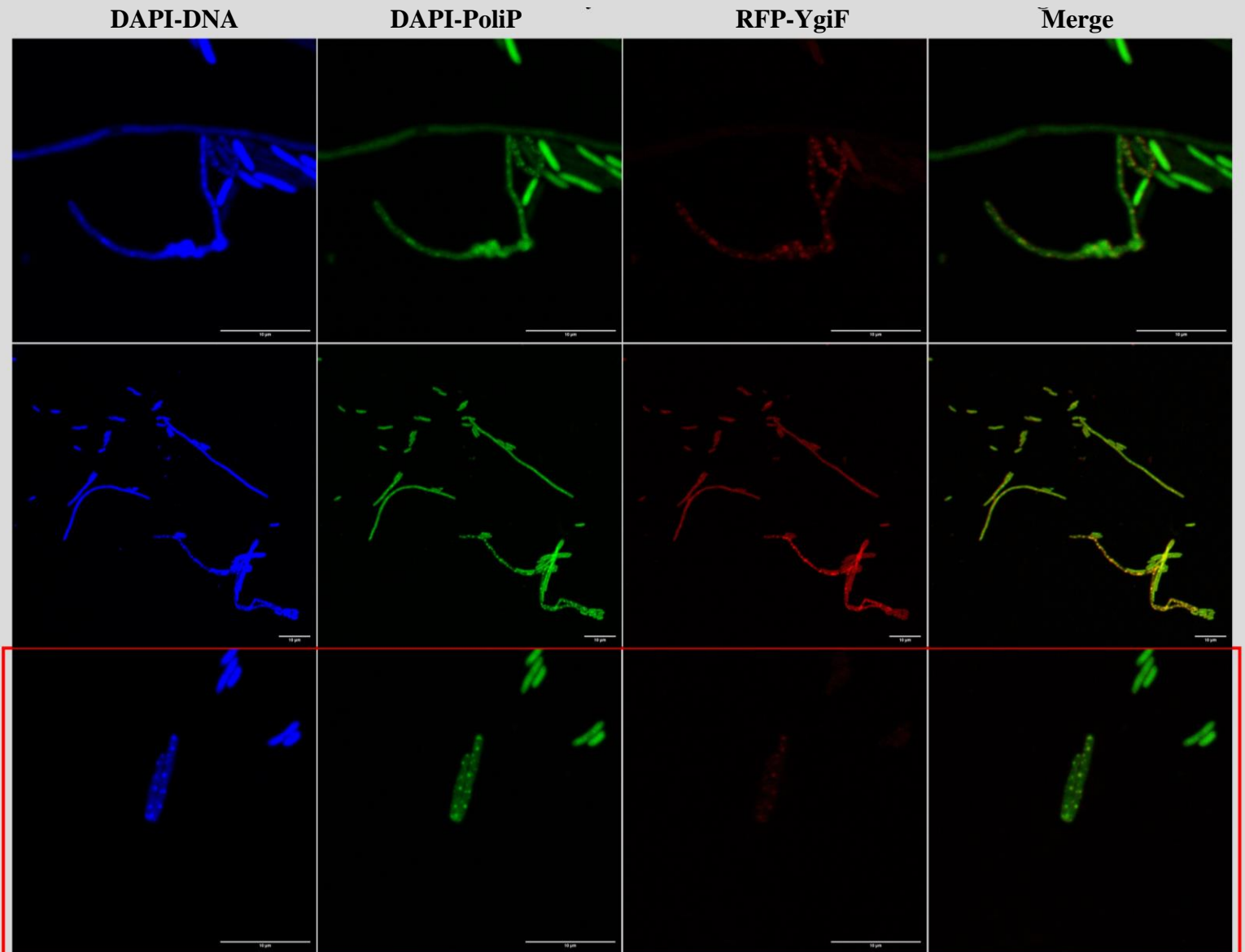


**Figura S7.** Análisis estadístico de la resistencia al cobre de las cepas variantes,  $\Delta ygiF$  y cepa silvestre de *E. coli*. El análisis estadístico corresponde al test ANOVA de doble vía, en donde \*\*\*\* indica  $p \leq 0,0001$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*  $p \leq 0,05$  y ns no significativo.

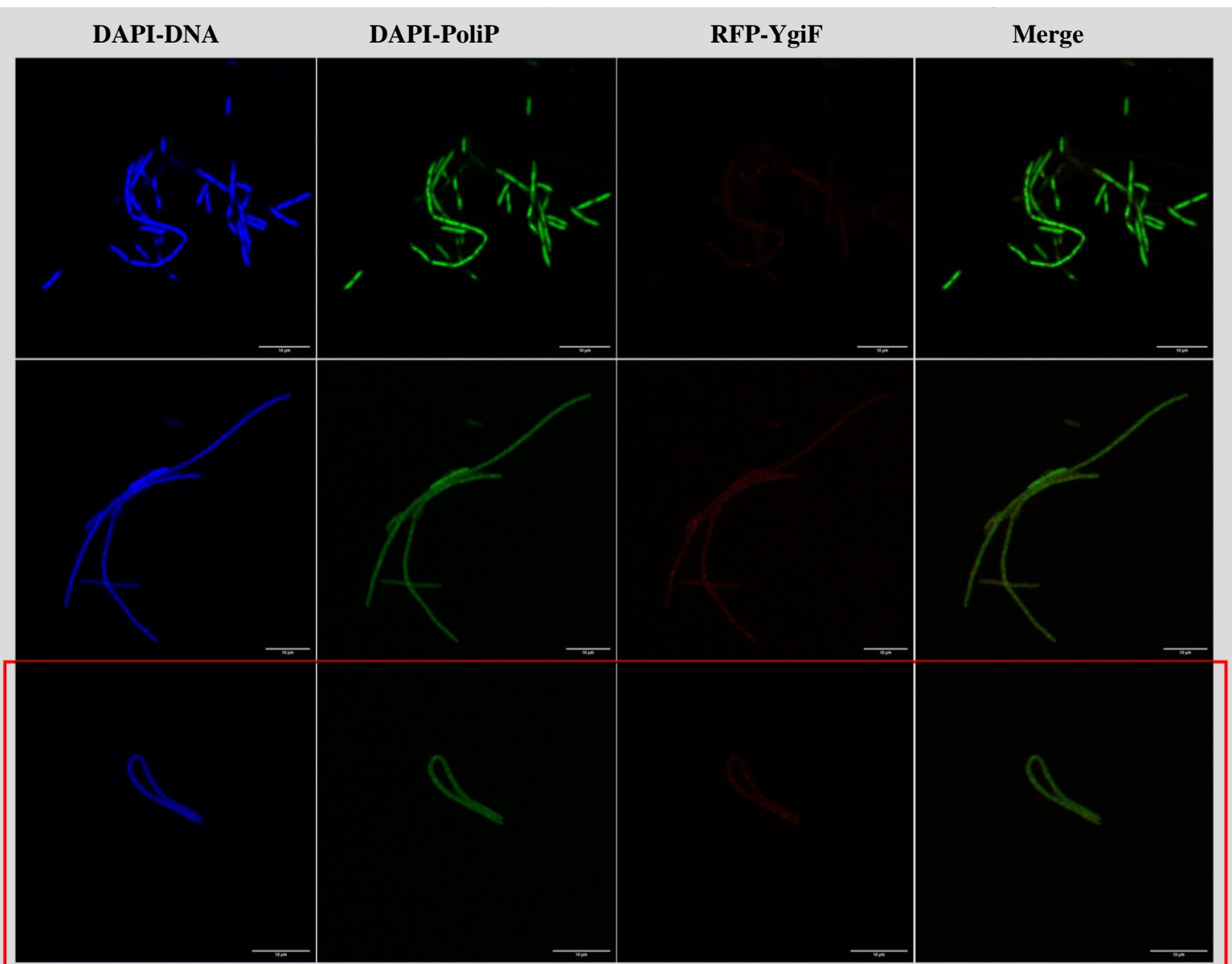




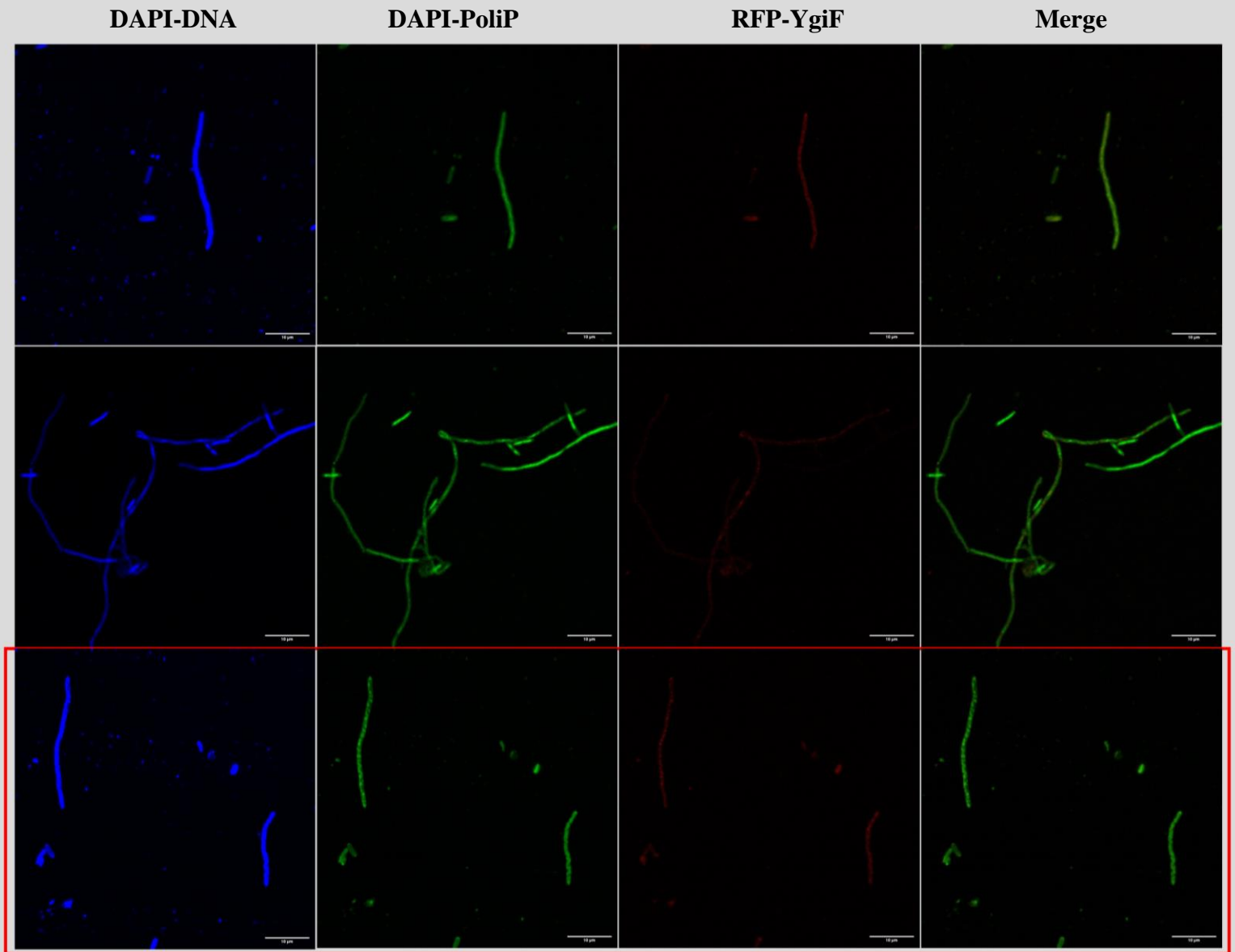
**Figura S8.** Réplicas de micrografías de fluorescencia obtenidas desde cultivos de la cepa  $\Delta phoU$  de *E. coli*. Las micrografías utilizadas para las figuras del manuscrito se indican en rectángulos rojos. Merge corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP.



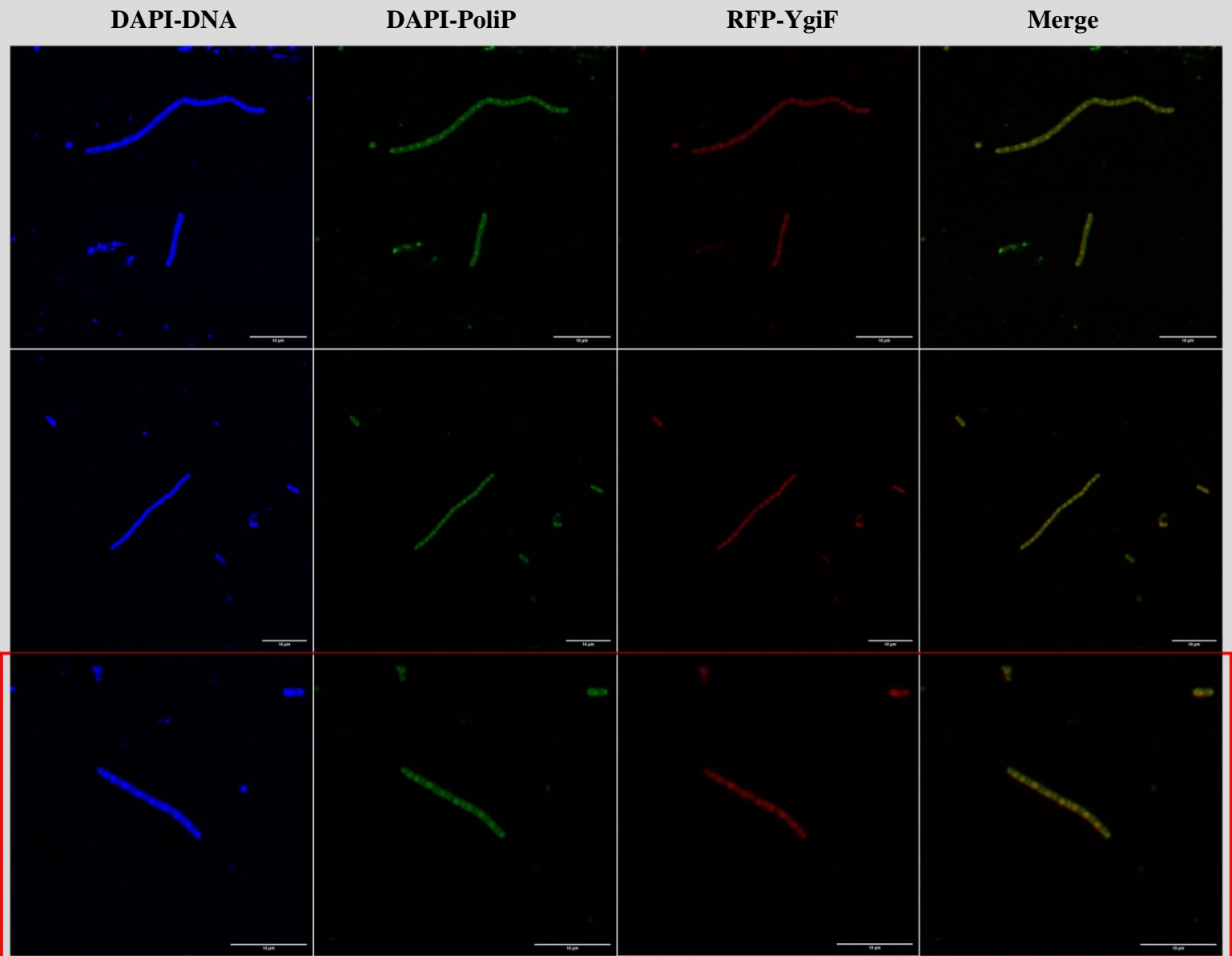
**Figura S9.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en medio LB. **Tiempo 0 minutos (sin cobre).** Las micrografías utilizadas para las figuras del manuscrito se indican en rectángulos rojos. Merge corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP.



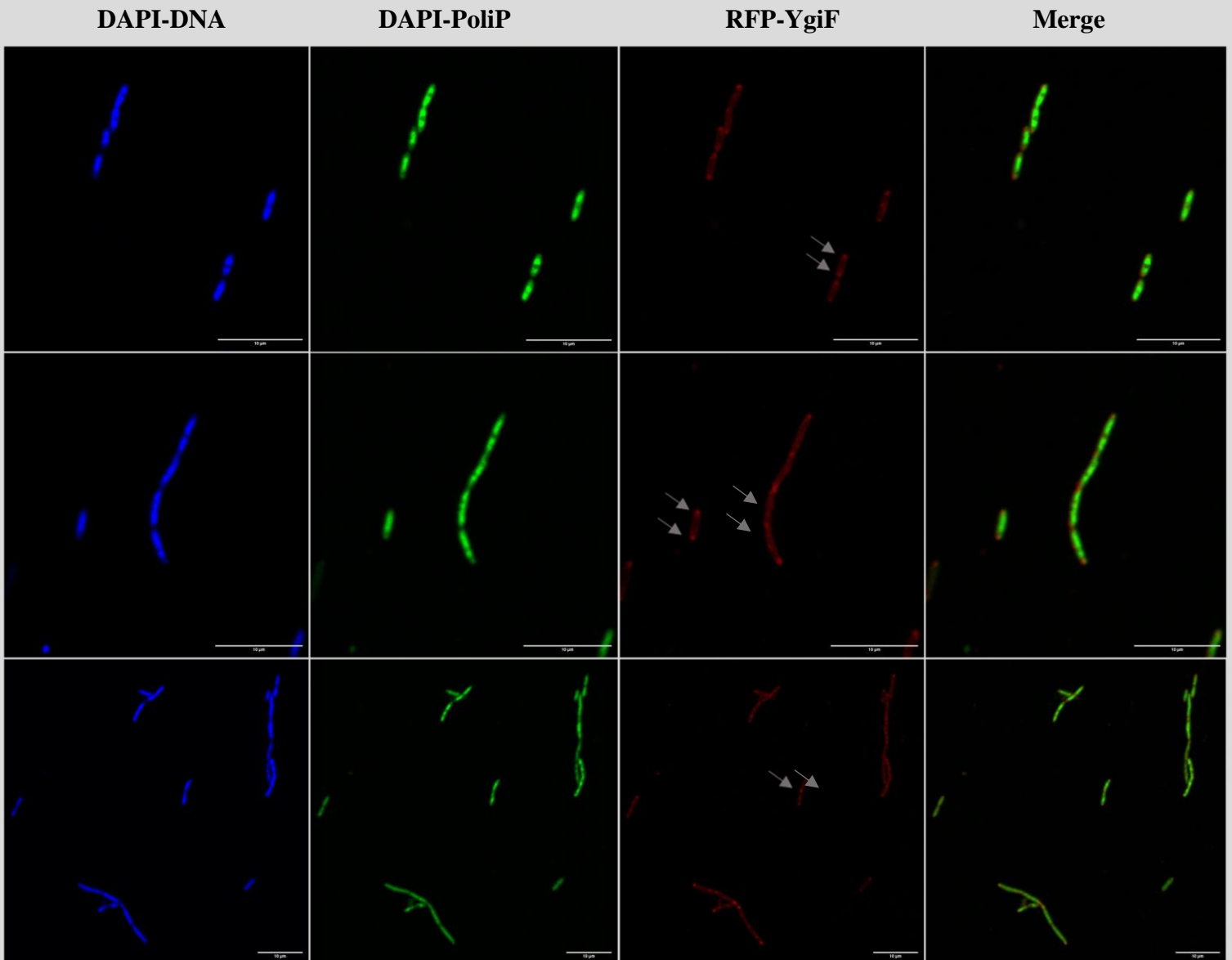
**Figura S10.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en medio LB suplementado con 5 mM de  $\text{CuSO}_4$ . **Tiempo 30 minutos post exposición.** Las micrografías utilizadas para las figuras del manuscrito se indican en rectángulos rojos. Merge corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP.



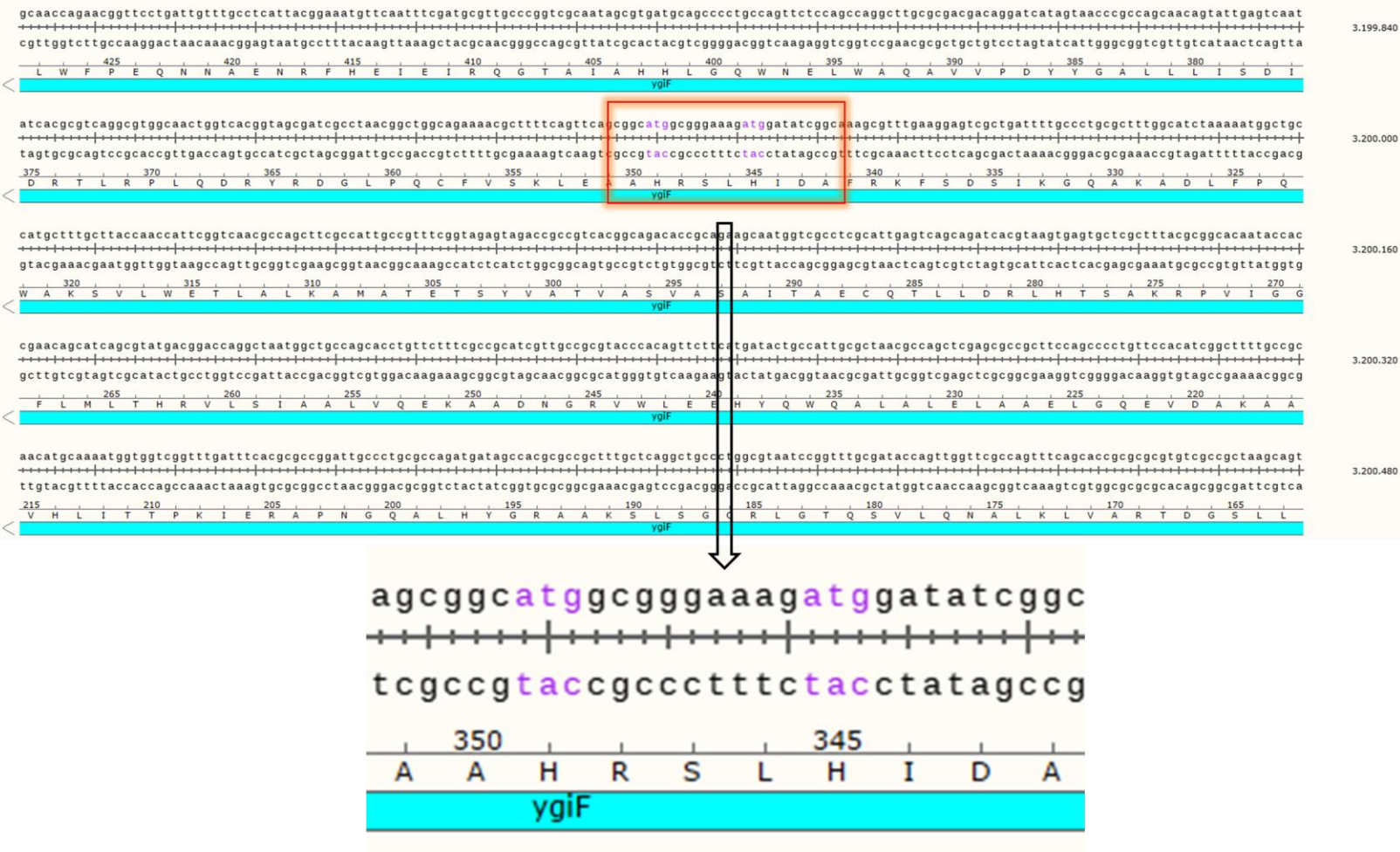
**Figura S11.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en medio LB suplementado con 5 mM de  $\text{CuSO}_4$ . **Tiempo 1 hora post exposición.** Las micrografías utilizadas para las figuras del manuscrito se indican en rectángulos rojos. Merge corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP.



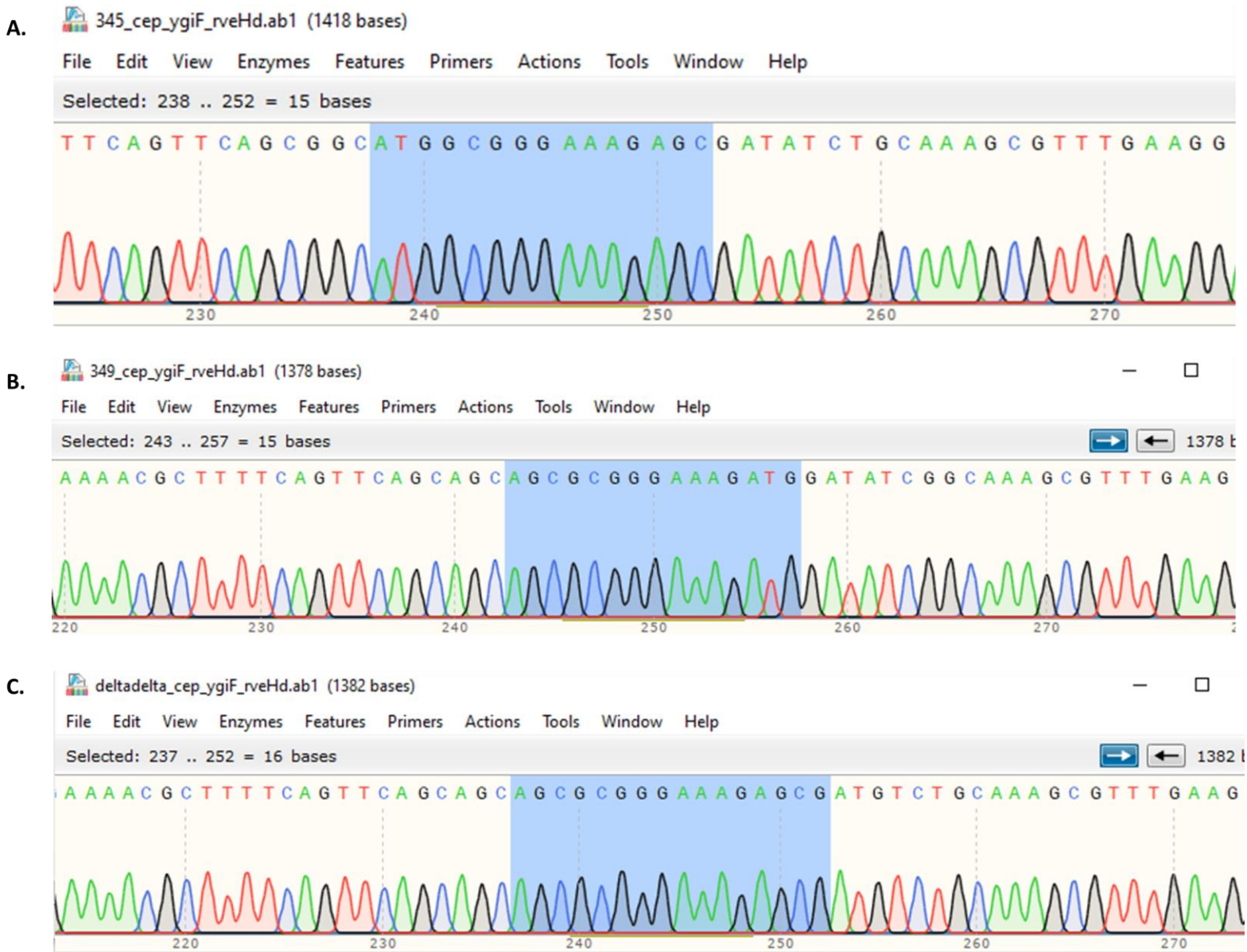
**Figura S12.** Réplicas de la evolución temporal de la localización de proteínas de fusión RFP-YgiF en medio LB suplementado con 5 mM de  $\text{CuSO}_4$ . **Tiempo 24 horas post exposición.** Las micrografías utilizadas para las figuras del manuscrito se indican en rectángulos rojos. Merge corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP.



**Figura S13.** Visualización de la localización de la proteína YgiF en los polos celulares de la cepa  $\Delta phoU$  de *E. coli*. Las micrografías se obtuvieron 24 horas post exposición a 5 mM de cobre. Note que la proteína de fusión YgiF-RFP se ubica en los polos celulares (flechas). Merge corresponde a la fusión entre los canales DAPI-PoliP y RFP.



**Figura S14.** Secuencia del gen *ygiF* silvestre de *E. coli*. En morado se señalan las histidinas 349 e His345.



**Figura S15.** Secuencia del gen *ygiF* mutado de las cepas: **A.** *ygiF*\*H345A, **B.** *ygiF*\*H349A y **C.** *ygiF*\*H345,349A de *E. coli*. El rectángulo azul indica la región de interés: *HRLSH*. Note que la secuencia “ATG” que codifica para una histidina fue reemplazada por “AGC” que codifica para una alanina.