

UCH-FC
MAG-Microbiología
M453
C.1

**“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS
POLIFOSFATOS INORGÁNICOS EN LA RESISTENCIA
AL COBRE MEDIANTE MUTACIONES 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 con Mención en Microbiología

Facultad De Ciencias

Por

Cecilia Raquel Mauriaca Flores



Enero, 2011

Director de Tesis Dr. Carlos A. Jerez Guevara

Co-Director de Tesis Dr. Francisco P. Chávez Espinosa

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

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

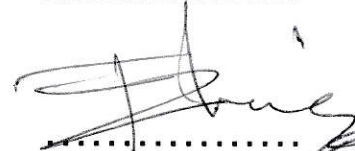
Cecilia Raquel Mauriaca Flores

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día...05 de Octubre 2010.....

Director de Tesis:
Dr. Carlos A. Jerez



Co-Director de Tesis
Dr. Francisco P. Chávez Espinoza

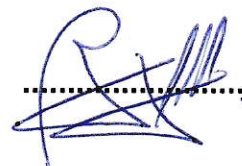


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosa Alba Lagos Mónica



Dr. Marcelo Baeza Cancino





Piensa, cree, sueña y atrévete.

Walt Disney



Agradecimientos

Quisiera partir agradeciendo a quienes me permitieron desarrollar esta tesis, a mis tutores Dr. Carlos Jerez y Dr. Francisco Chávez. A ambos agradezco la preocupación cuando las cosas no andaban, y especialmente la confianza tanto en el ámbito científico como en el personal, para desarrollar tareas más allá de las pipetas.

A quienes me ayudaron a progresar con la tesis con la técnica de mutación descrita por Datsenko y Wanner: al Dr. Sergio Álvarez por enseñarme y facilitarme los plasmidios; a la Dra. Inés Contreras, por permitirme aprender la técnica de mutación en su laboratorio; a Javier Caro, por el tiempo invertido en enseñarme paso a paso; a la Dra. Mercedes Zaldívar por ayudarme a solucionar el problema con el LB.

También quiero agradecer a los alumnos del laboratorio de la Dra. Margarita Carú por ayudarme con la técnica de geles de poliacrilamida para DNA. En especial a Catalina Zúñiga que me ayudó con todas las adaptaciones de los protocolos y me enseñó a montar la técnica. También a la Dra. Julieta Orlando por la ayuda en las modificaciones del protocolo de corrida. Por supuesto también a la Dra. Margarita Carú por permitirme aprender la técnica en su laboratorio.

A mis compañeros de Magíster, juntos sufrimos las incertidumbres de los plazos, de los seminarios, defensas, etc. Especialmente a mis compañeros microbiólogos, Jorge Flores y Mario Leiva. Quiero destacar al Kuri, compañero de magíster, de ayudantías y de carrera.

A mis amigos que no son científicos, que no entienden mucho de lo que hago, pero lo aprecian. Especialmente a mis queridas Tábata y Andrea.

A mis amigos biotecs, por los momentos de discusión científica y también de distensión. Especialmente a Pauli e Inelia.

Por supuesto a mis compañeros de laboratorio: Daniela, Juan Sebastián, Camilo, Maca, Rodrigo, Josefina, Claudio, Andrés, Coto, Cristóbal, y JP. A mis otros compañeros: Vale, Matías, Sigde, y Mauricio. A los que fueron compañeros: Lissette, Simón, Fernando, Álvaro O., Mauricio, Mario, Rafaela, Felipe, Andrés L., Luis; Coté, Álvaro B., Lina, y Álex. De todos Uds me llevo algo, gracias por las críticas, consejos, protocolos, por los momentos no lab, las comidas, y por aguantar mis "holis" en estrellas amarillas. Por supuesto también a Don Juan, porque con él la vida era más fácil. Quiero destacar a quienes además de compañeros han sido amigos, cómplices y soporte estos últimos años: Vale Coté, Andrés y Coto.

Finalmente a mi familia, a mis papás y mis hermanos con la confianza ciega ante todo. Por el apoyo, consejos, charlas, y todo. Quisiera nombrar también a mi prima Coté, por la preocupación permanente. También a Elana, por compartir el gusto de la ciencia, desde otra perspectiva. A mi tío Carlos, por el cariño, y el interés. A mis abuelos, tíos, y primos, gracias por seguir mis pasos siempre con interés y orgullo.



Índice de materias

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. EL FOSFATO Y SU TRANSPORTE EN <i>E. COLI</i>..... | 1 |
| 1.1.1. El sistema <i>Pst</i>..... | 2 |
| 1.1.2. Los sistemas <i>UhpT</i> y <i>GlpT</i>..... | 3 |
| 1.1.3. Los sistemas <i>Pit</i>..... | 4 |
| 1.2. EL POLIFOSFATO (POLIP)..... | 5 |
| 1.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA AL COBRE DE <i>E. COLI</i>..... | 8 |
| 1.4. EL MODELO DE KEASLING Y SU APLICABILIDAD AL COBRE..... | 10 |
| 1.5. LA PROPUESTA..... | 13 |
| 1.6. HIPÓTESIS..... | 15 |
| 1.7. OBJETIVO GENERAL..... | 15 |
| 1.8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 15 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 16 |
| 2.1. MATERIALES..... | 16 |
| 2.1.1. Cepas Bacterianas..... | 16 |
| 2.1.2. Plásmidos..... | 17 |
| 2.1.3. Medios de cultivo..... | 18 |
| 2.2. MÉTODOS..... | 19 |
| 2.2.1. Métodos de biología molecular..... | 19 |
| 2.2.1.1. Extracción de DNA plasmidial..... | 19 |
| 2.2.1.2. Extracción del DNA genómico..... | 19 |
| 2.2.1.3. Chequeo del DNA plasmidial..... | 20 |
| 2.2.1.4. Electroforesis del DNA en geles de agarosa..... | 20 |
| 2.2.1.5. Electroforesis del DNA en geles de poliacrilamida..... | 20 |
| 2.2.1.6. Purificación del DNA desde geles de agarosa..... | 21 |
| 2.2.1.7. Precipitación y diálisis del DNA..... | 21 |
| 2.2.1.8. Partidores y reacciones de PCR..... | 22 |
| 2.2.1.9. Secuenciación del DNA..... | 24 |
| 2.2.1.10. Clonación en pBAD-TOPO..... | 24 |
| 2.2.1.11. Transformación de <i>E. coli</i>..... | 25 |
| 2.2.1.12. Determinación de los transformantes..... | 26 |
| 2.2.1.13. Mutación por recombinación homóloga con productos de PCR..... | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2. <i>Técnicas de Microscopía</i> | 27 |
| 2.2.2.1. Microscopía electrónica de transmisión | 27 |
| 2.2.3. <i>Métodos de análisis de las proteínas</i> | 28 |
| 2.2.3.1. Preparación de las muestras para los análisis de western blot | 28 |
| 2.2.3.2. Electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida SDS | 29 |
| 2.2.3.3. Tinción de los geles de poliacrilamida | 29 |
| 2.2.3.4. Detección de las proteínas por Western blot..... | 30 |
| 2.2.4. <i>Técnicas de Microbiología</i> | 31 |
| 2.2.4.1. Curvas de crecimiento..... | 31 |
| 2.2.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) | 31 |
| 3. RESULTADOS | 32 |
| 3.1. GENERACIÓN DE CEPAS MUTANTES | 32 |
| 3.2. OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO..... | 37 |
| 3.3. ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS..... | 37 |
| 3.4. CLONACIÓN DEL OPERÓN <i>PPK1-PPX</i> | 38 |
| 3.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS | 40 |
| 3.6. DETERMINACIÓN DE LA MIC | 41 |
| 4. DISCUSIÓN | 44 |
| 4.1. GENERACIÓN DE LAS CEPAS MUTANTES Y RECOMBINANTES..... | 44 |
| 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS CONSTRUIDAS | 47 |
| 4.3. EL MODELO DE KEASLING PARA LA RESISTENCIA AL CU | 48 |
| 5. CONCLUSIÓN | 52 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 53 |





Índice de tablas

| | |
|---|----|
| TABLA 1: CEPAS MUTANTES Y RECOMBINANTES DE <i>E. COLI</i> | 16 |
| TABLA 2: PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN <i>E. COLI</i> | 17 |
| TABLA 3. PARTIDORES DE 60 NUCLEÓTIDOS | 23 |
| TABLA 4. PARTIDORES DE 20 NUCLEÓTIDOS | 23 |



Índice de figuras

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. ESQUEMA DE LOS TRANSPORTADORES DE FOSFATO DE <i>E. COLI</i> | 3 |
| FIGURA 2. ESQUEMA DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA AL CU..... | 10 |
| FIGURA 3. MODELO CON LAS DOS PROPUESTAS DE PARTICIPACIÓN DEL METABOLISMO DE LOS POLIPs EN LA RESISTENCIA AL CU EN <i>E. COLI</i> | 14 |
| FIGURA 4. ESQUEMA DE LA MUTACIÓN POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA UTILIZANDO PRODUCTOS DE PCR | 28 |
| FIGURA 5 OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PKD3, PKD4, PKD46 Y PCP20 | 33 |
| FIGURA 6. PCR CON LOS PLÁSMIDOS PKD3 Y PKD4 COMO MOLDE | 34 |
| FIGURA 7. PCR DE CICATRICES GENÓMICAS LUEGO DE ESCINDIR LOS GENES..... | 35 |
| FIGURA 8. ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA PARA DETERMINAR MUTANTES Δ PIT A Y Δ PIT B | 36 |
| FIGURA 9. VISUALIZACIÓN DE LAS CEPAS K12 Y Δ POLIP AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN..... | 37 |
| FIGURA 10. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO EN MEDIO LB. | 38 |
| FIGURA 11. AMPLIFICACIÓN DEL OPERÓN <i>PPK1-PPX</i> POR PCR..... | 39 |
| FIGURA 12. PROCEDIMIENTO DE CLONACIÓN DEL OPERÓN <i>PPK1-PPX</i> | 40 |
| FIGURA 13. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS CLONES pBADPOLIP | 41 |
| FIGURA 14. VALORES DE LA MIC DE LAS CEPAS MUTANTES | 42 |
| FIGURA 15. VALORES DE LA MIC EN CEPAS COMPLEMENTADAS CON EL OPERÓN <i>PPK1-PPX</i> | 42 |
| FIGURA 16. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL PLÁSMIDO pBADPOLIP EN CULTIVOS CON CU... | 43 |

Resumen

Los polifosfatos (poliP) son biopolímeros lineales que se han encontrado en todos los seres vivos y están formados por residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido. Los poliPs se sintetizan a partir de ATP por la polifosfato kinasa (PPK1) y se degradan por la acción de la exopolifosfatasa (PPX) a fosfato inorgánico (Pi). Los genes *ppk1* y *ppx* en *E. coli* se encuentran formando un operón.

En muchos microorganismos se ha visto que la presencia de poliP en la célula aporta a la resistencia de metales pesados, sin embargo el mecanismo no ha sido dilucidado. Dos hipótesis son las más apoyadas. La primera la planteó Keasling en 1997, y propone que el Pi liberado por la hidrólisis del poliP se asocia a un átomo (catión) del metal y ambos son expulsados del citoplasma por un transportador de fosfato inorgánico (Pit).

La segunda hipótesis plantea que los poliPs aportarían energía a los mecanismos de transporte activo que sacan el metal de la célula. CopA es la única proteína conocida en *E. coli* que está involucrada en la resistencia a Cu y que utiliza ATP para su función. Por ello esta proteína fue considerada en este estudio para evaluar la posibilidad que el poliP participe en la resistencia al Cu generando ATP o como un análogo del ATP para el funcionamiento de esta proteína.

En este trabajo se realizaron mutaciones por escisión de los genes *pitA*, *pitB*, *copA*, y del operón *ppk1-ppx* en *E. coli*. Sobre la cepa $\Delta ppk1-ppx$ (Δ poliP) se realizaron mutaciones adicionales de los genes ya mencionados de manera de estudiar las dos propuestas mencionadas arriba. Para analizar el efecto de los poliPs en la resistencia al Cu en las diferentes cepas, se clonó el operón *ppk1-ppx* en un plásmido altamente regulado, y las cepas carentes del operón *ppk1-ppx* se transformaron con este plásmido.

A todas las cepas se les midió la concentración mínima inhibitoria del Cu. Las cepas $\Delta copA$ y $\Delta poliP\Delta copA$ fueron las que presentaron una mayor disminución de la resistencia al Cu. La cepa $\Delta poliP\Delta pitA\Delta pitB$ también presentó una reducción importante en la resistencia al Cu. Al transformar todas las cepas que contienen la mutación $\Delta poliP$ con un plásmido que expresa el operón *ppk1-ppx* se encontró que sólo la cepa $\Delta poliP\Delta pitA\Delta pitB$ no aumentó su resistencia al Cu.

Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de los poliPs requiere de al menos uno de los transportadores Pit. Los resultados de esta tesis apoyan el modelo planteado por Keasling como el mecanismo por el cual los poliPs actúan en *E. coli* para la resistencia del Cu.

Abstract

Polyphosphates (polyP) are linear biopolymers found in all living organisms. They are made of orthophosphate residues connected by phosphoanhydride bonds. In *Escherichia coli* polyP is mainly synthesized from ATP by polyphosphate kinase (PPK1) and is degraded to inorganic phosphate (Pi) by exopolyphosphatase (PPX). Both *ppk1* and *ppx* genes constitute an operon in *E. coli*.

In many microorganisms the presence of polyP in the cell contributes to the resistance to heavy metals, but the actual mechanism has not been elucidated. So far two hypotheses have been proposed. The first one (Keasling model) suggests that the Pi released by hydrolysis of polyP is associated to a cation of metal and the Pi-metal complex is expelled from the cytoplasm by an inorganic phosphate transporter (Pit).

The second hypothesis suggests that polyP could provide energy for the active transport mechanisms taking the metal out of the cell. CopA is the only known protein in *E. coli* involved in Cu resistance that uses ATP for its function. Therefore, this protein was included in this study to assess the possibility that polyP may participate in Cu resistance by generating ATP, or as an ATP analogue for the proper functioning of CopA.

Excision mutants of *E. coli* genes *pitA*, *pitB*, *copA*, and *ppk1-ppx* operon were made in this work. The $\Delta ppk1-ppx$ strain (Δ polyP) was used to obtain additional mutations in the genes mentioned above in order to study the two proposals already described. To analyze the effect of polyP in the Cu resistance of these strains, *ppk1-ppx* operon was cloned in a highly regulated plasmid. The strains lacking *ppk1-ppx* operon were transformed to complement them with this plasmid as well. The minimum inhibitory concentration of Cu was measured in all strains. $\Delta copA$ and $\Delta polyP\Delta copA$ strains were those showing a higher decrease in Cu resistance. $\Delta polyP\Delta pitA\Delta pitB$ strain also presented a significant reduction in Cu resistance. These strains were transformed with

a plasmid expressing the *ppk1-ppx* operon and only the Δ polyP Δ pitA Δ pitB mutant did not increase its resistance to Cu when the plasmid was expressed.

These results suggest that the mechanism of action of polyP requires at least one of the Pit transporters. Moreover, the results of this study support the model suggested by Keasling and the mechanism by which polyP participates in *E. coli* resistance to Cu.

1. Introducción

1.1. El Fosfato y su transporte en *E. coli*

El fósforo es parte integral del metabolismo celular bacteriano y es indispensable para la biosíntesis del DNA, el RNA, las proteínas y los fosfolípidos. Por ello resulta necesario mantener un nivel estable de fosfato inorgánico (Pi) o de los nutrientes que contienen fósforo en la célula. Es por esto que los microorganismos deben ser capaces de captar el Pi y los nutrientes que contienen fósforo desde el ambiente donde se encuentren. El transporte del fosfato está bien documentado en varios microorganismos, especialmente en la enterobacteria *Escherichia coli*. Este microorganismo es una bacteria modelo debido a su rápido crecimiento, y facilidad de manipulación genética. Su genoma se encuentra secuenciado, anotado y disponible, además ha sido ampliamente estudiado, lo que lo ha convertido en uno de los modelos biológicos que más datos ha generado a nivel global (genómica, proteómica y bioinformática).

Debido a la necesidad de mantener los niveles estables de fosfato en la célula es que existe una compleja regulación de los sistemas que permiten su captación, la que es llevada a cabo por el regulón *pho*. Este regulón se encuentra en numerosos organismos, y consiste en un conjunto de genes, que cambian su expresión frente a la carencia del fosfato (Wanner, 1993). Esta activación ocurre mediante el sistema de dos componentes codificado por *phoR-phoB*, que es una forma común de expresión de los genes regulados por el fosfato, tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas (van Veen, 1997). La proteína PhoR es una quinasa que fosforila el regulador transcripcional PhoB, que se une a la caja *pho* (secuencia consenso que se ubica en el promotor de los genes regulados por el regulón) (Harris y col., 2001). Las células responden a la carencia de fosfato activando el regulón *pho*, que activa la expresión y

secreción de la fosfatasa alcalina al periplasma, que libera los residuos de ortofosfatos desde organofosfatos (Sharfstein y col., 1996), además de regular otros genes de captación del Pi.

Para la captación del fosfato desde el medio extracelular existen proteínas, que reconocen distintas formas de esta molécula. En *E. coli* existen 4 sistemas de transporte de fosfato. Los sistemas Pst (del inglés phosphate specific transport) y Pit (del inglés inorganic phosphate transport) son específicos para el Pi y responsables del movimiento neto del Pi. Los otros dos sistemas, GlpT y UhpT, median el intercambio aniónico, en el cual el Pi es aceptado como análogo del glicerol-3-fosfato o glucosa-6-fosfato, respectivamente. Pit, GlpT y UhpT son transportadores quimiosmóticos, y parecen consistir en una única proteína de membrana, a diferencia del Pst (van Veen y col., 1994). A continuación se explica brevemente en qué consiste cada sistema.

1.1.1. El sistema Pst.

El sistema Pst es el que tiene mayor afinidad al sustrato, y transporta los iones HPO_4^{-2} y H_2PO_4^- (van Veen, 1997). Está compuesto por una proteína periplasmática de unión al sustrato (PstS) y 3 proteínas unidas a la membrana (PstA, PstB y PstC). Pertenece a la familia de los transportadores ABC debido a que ocupa la energía del ATP (Rosenberg y col., 1979) (Figura 1). Junto a los genes que forman parte del sistema Pst se encuentra *phoU*, gen que codifica una proteína accesoria que no participa en el transporte del fosfato, sino que participaría en la regulación del regulón *pho* (Hoffer y Tommassen, 2001). Los genes del sistema Pst junto con *phoU* se encuentran formando un operón, cuya expresión está fuertemente regulada por el PhoB-PhoR. En *E. coli* la expresión de este sistema se induce cuando la concentración de Pi externa es menor que el rango milimolar (Harris y col., 2001).

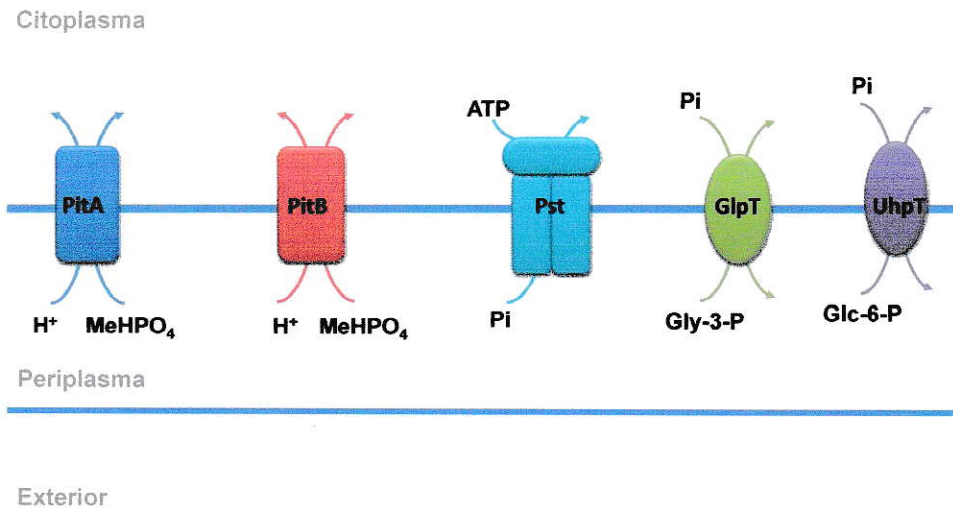


Figura 1. Esquema de los transportadores de fosfato de *E. coli*. Los transportadores Pit transportan en la misma dirección un fosfato metálico (MeHPO_4) y un protón; Pst utiliza una molécula de ATP para ingresar una molécula de fosfato inorgánico (Pi); GlpT ingresa glicerol-3-fosfato (Gly-3-P) y saca Pi; UhpT ingresa glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) y saca Pi.

1.1.2. Los sistemas UhpT y GlpT.

Los transportadores GlpT de glicerol-3-fosfato (Hayashi y col., 1964) y UhpT de glucosa-6-fosfato (Winkler 1966) ingresan éstos organofosfatos a la célula a la vez que sacan Pi hacia el periplasma (Figura 1). La producción de los transportadores GlpT y UhpT no está regulada por la concentración del Pi, sino que es inducida por la presencia de glucosa-6-fosfato (o 2-deoxiglucosa-6-fosfato) y glicerol-3-fosfato, respectivamente. La expresión de UhpT depende del operón *uhpABC*, donde UhpA y UhpB forman parte de un sistema de dos componentes (van Veen, 1997); mientras que la expresión de GlpT depende del regulón *glp*, que basalmente se encuentra reprimido por GlpR (Larson y col., 1987). Aunque estos dos sistemas son capaces de transportar el Pi, en ausencia de los transportadores Pit y Pst no son capaces de permitir el crecimiento en un medio donde la única fuente de fosfato está como Pi (Harris y col., 2001).

1.1.3. Los sistemas Pit.

Inicialmente se llamó sistema Pit a la proteína PitA, sin embargo en el genoma de *E. coli* se encuentra otro gen (*pitB*) capaz de llevar a cabo un transporte de Pi de igual manera. Se caracterizaron como transportadores de baja afinidad, cuyas constantes (K_m de Pi es 25 μM) son 100 veces menores que la K_m de Pst (van Veen, 1997). El gen *pitB* es un parólogo de *pitA* y en *E. coli* tienen un 75 % de identidad nucleotídica (Harris y col., 2001) y un 81 % de identidad en la secuencia aminoacídica (Hoffer y col., 2001). El mecanismo de transporte de las dos proteínas es equivalente y de hecho la K_m aparente para el transporte del Pi es similar (Hoffer y col., 2001), aunque la dinámica de expresión es diferente. Cada sistema Pit es capaz de funcionar independientemente del otro (Harris y col., 2001).

El gen *pitA* fue descrito inicialmente por Willsky y colaboradores (1973) y se expresa constitutivamente. Por otro lado, *pitB* fue caracterizado más tardíamente debido a que está regulado negativamente por el regulón *pho*, el cual se encuentra siempre activo en la cepa *E. coli* K10 (cepa utilizada para el estudio del transporte de fosfato) (Harris y col., 2001). Ambos transportan de manera simultánea un fosfato metálico (MeHPO_4) y un protón, utilizando la fuerza protón motriz (van Veen y col., 1994) (Figura 1). Sin embargo se ha visto que pueden invertirse y sacar el fosfato metálico hacia afuera de la célula en ciertas condiciones (van Veen, 1997). La captación del Pi se inhibe fuertemente cuando el pH interno de la célula es bajo, por lo tanto es importante mantener activos otros mecanismos de alcalinización del citoplasma (van Veen y col., 1994).

1.2. El polifosfato (poliP)

Una forma de almacenar Pi dentro de la célula es mediante el polifosfato inorgánico (poliP). El poliP es un polímero lineal formado por centenas de residuos de ortofosfato que se encuentran unidos mediante los enlaces fosfoanhídrido y que en *E. coli* llegan a 750 unidades de Pi (Kornberg, 1995). Este polímero se ha encontrado en todos los tipos celulares, desde arqueas hasta eucariontes superiores (Kornberg y col., 1999).

Entre las funciones que se le han adjudicado a este polímero en los microorganismos estudiados están: 1) fuente de energía para la síntesis del ATP; 2) sustituto del ATP en la fosforilación de la glucosa y algunas proteínas; 3) reserva de Pi; 4) quelante de los cationes divalentes; 5) amortiguador intracelular frente al álcali; 6) regulador del desarrollo celular, y finalmente 7) regulador de los ajustes celulares ante condiciones de carencia y estrés (Kornberg, 1995; Kornberg y col., 1999). Numerosas enzimas son capaces de utilizar directamente los poliP, lo que contribuye a su participación en los diversos procesos celulares. Entre ellas están: la polifosfato despolimerasa, la NAD quinasa dependiente de poliP, la polifosfato fructoquinasa, la polifosfato monoquinasa y la polifosfato glucoquinasa (Nesmeyanova, 2000).

Adicionalmente, se ha visto que existe una conexión entre el transporte de Pi y el metabolismo del poliP. La tasa de captación del Pi por PitA se reduce en el mutante *ppk1-ppx*, y además el triple mutante *pitA pst ppk1* no es viable (Rao y col., 2009).

El poliP alcanza altos niveles en algunos organismos, especialmente en las levaduras, organismo donde alcanza hasta un 10-20 % del peso seco celular (Kornberg y col., 1999). En *E. coli* los niveles de poliP no llegan a ser tan altos con respecto a otras bacterias, sin embargo son sumamente fluctuantes (Kuroda y Ohtake, 2000).

El metabolismo del poliP en las células es dinámico, y su nivel celular está determinado principalmente por la acción de dos enzimas: la polifosfato quinasa (PPK1) y la exopolifosfatasa (PPX). Los genes de estas dos enzimas, se han estudiado

por su influencia en el metabolismo de los poliP, y en *E. coli* se encuentran formando un operón (Akiyama y col., 1993).

La enzima PPK1 cataliza la polimerización del poliP, mediante la transferencia del fosfato terminal del ATP al poliP. Esta reacción es reversible, dando lugar a la síntesis de ATP desde ADP y poliP, lo que sólo ocurre ante un exceso de ADP (Ahn y Kornberg, 1990). En algunas bacterias existe una segunda polifosfato quinasa (PPK2), la que en condiciones normales cumple funciones esencialmente distintas. Esta enzima se encontró en mutantes nulos del gen *ppk1* en *Pseudomonas aeruginosa*, y es la responsable del 20 % del poliP que se encuentra en dichos mutantes que no poseen la PPK1 (Zhang y col., 2002). La cinética de la PPK2 favorece 75 veces la reacción de síntesis del GTP a partir de los poliP; y para la síntesis de los poliP puede utilizar tanto ATP como GTP, a diferencia de la PPK1 que sólo utiliza ATP en la dirección de síntesis (Zhang y col., 2002). En eucariontes sólo se ha encontrado un ortólogo de las polifosfato quinasa bacterianas, la DdPPK1 de *Dictyostelium discoideum* (Rao y col., 2009), que comparte un 30 % de identidad y 51 % de similaridad con la PPK1 de *E. coli*. Aún se desconoce qué enzima sintetiza el poliP en los otros organismos eucariontes.

Por otro lado, la PPX hidroliza los extremos de las cadenas de poliP, liberando Pi (Kornberg y col., 1999). También es posible encontrar otra proteína con actividad exopolifosfatasa: la guanosina pentafofosfatasa fosfohidrolasa (GPP) (Reizer y col., 1993), que es la enzima encargada de hidrolizar el pppGpp a ppGpp (Keasling y col., 1993). La GPP, a diferencia de la PPX, es procesiva sólo hasta que las cadenas de poliP alcancen un largo de 40 residuos (Keasling y col., 1993). De estas dos, la más importante respecto de la influencia que ejerce sobre los niveles de poliP es la PPX (Akiyama y col., 1993).

Los niveles del poliP pueden ser manipulados genéticamente a través de mutantes y recombinantes en las enzimas involucradas en el metabolismo de dicho polímero (Kornberg y col., 1999; Chavez y col., 2009). Los mutantes que carecen del gen *ppk1* en *E. coli* retienen sólo un 2 % de la actividad PPK1, comparados con la cepa silvestre. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *ppk1*, mediante un plásmido de alto número de copias resulta en un aumento de los niveles de los poliP de hasta 100 veces (Kornberg y col., 1999). Adicionalmente es posible disminuir los niveles de los poliPs en la célula mediante la sobreexpresión de la PPX. Esta estrategia es especialmente útil cuando la bacteria posee más de un gen que expresa una PPK en su genoma (como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*), o cuando el gen que expresa la proteína con la actividad polifosfatoquinasa no se conoce, por lo tanto no es posible construir mutantes (Chávez y col., 2009).

Los niveles de los poliP fluctúan enormemente según el estado celular, el medio de cultivo utilizado y la fase del crecimiento (Kornberg y col., 1999). Esto generalmente se condice con los cambios en la actividad de las respectivas enzimas que lo producen y lo consumen. Por ejemplo, en *E. coli* los niveles más altos de actividad PPK1 se alcanzan cuando las células están en el inicio de la fase estacionaria, momento en el cual la actividad PPX es menor (Kornberg y col., 1999). Adicionalmente a las variaciones mencionadas arriba, existe una variación intrínseca del nivel estacionario del poliP (concentración estable de poliP dentro de la célula) que en *E. coli* llega ser de un 20 % en idénticas condiciones de crecimiento (Van Dien y col., 1997).

Estudios han demostrado que la presencia de los poliP en la célula ayuda a resistir las altas concentraciones de los metales pesados (Keasling y Hupf, 1996; Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006; Navarro y col., 2009). Adicionalmente en mi Seminario de Título, se comprobó que la cepa de *Pseudomonas sp.* B4 con niveles

deficientes de los poliPs es más sensible al Cd, al Fe y al Cu que la cepa con fenotipo silvestre.

1.3. Mecanismos de resistencia al cobre de *E. coli*

Muchos metales pesados son considerados esenciales, pero en altas concentraciones son muy tóxicos para la célula. Es por esto que existen mecanismos celulares compuestos de familias de proteínas que controlan su actividad y ayudan a confinarlos a sus funciones vitales. Entre ellas, hay transportadores integrales de membrana, sensores metalorreguladores y proteínas chaperonas citoplasmáticas difusibles que protegen y guían el metal a su blanco (Finney y O'Halloran, 2003). La toxicidad de los metales como Cu, Cd, Cr, Hg, Va, y Fe se debe a que producen especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que lleva a un daño en el DNA, la peroxidación de los lípidos, la disminución de sulfhidrilos, entre otros efectos (Valko y col., 2005). Esto desencadena un estado de estrés oxidativo en la célula que puede llevar a la muerte celular. Por ello, el control celular de los metales, así como tener mecanismos apropiados para evitar grandes daños, es muy importante. La detoxificación de los metales pesados y la regulación de los cationes intracelulares se llevan a cabo por diferentes mecanismos celulares como la exclusión, la precipitación, la reducción y el transporte activo (Keasling, 1997), los cuales son principalmente mecanismos activos (Keasling y Hupf, 1996), es decir, que requieren energía para su actividad.

La bacteria *E. coli* está equipada con múltiples sistemas para asegurar un manejo seguro de los metales en variadas condiciones ambientales. En particular, cuenta con **determinantes de resistencia al Cu** (genes cuyos productos participan en la capacidad de tolerar cobre), que son los sistemas Cue y Cus (Rensing y Grass, 2003).

El sistema Cue (del inglés Cu efflux) se compone de 3 proteínas: CueR, CopA y CueO (Rensing y Grass, 2003). La primera es una proteína metaloreguladora de respuesta al cobre que regula positivamente a los genes *copA* y *cueO* (Outten y col., 2001). CopA es una ATPasa tipo P que transporta el Cu desde el citoplasma hacia el periplasma, y que se ubica en la membrana interna (Rensing y col., 1999) (Figura 2). CueO es una multicobre oxidasa, proteína que acopla la oxidación de un electrón del sustrato a la completa reducción de un oxígeno molecular a agua, cuya función celular es oxidar en el periplasma el Cu^+ a Cu^{+2} , su forma menos tóxica (Grass y Rensing, 2001b) (Figura 2). La proteína CopA es el componente central de la homeostasis del cobre en *E. coli* (Outten y col., 2001; Grass y Rensing, 2001a), por lo que es un blanco interesante para obtener cepas más sensibles al metal, así como para analizar el requerimiento energético de la resistencia al Cu.

Por otro lado, el sistema Cus (del inglés Cu sensing) está formado por 4 proteínas: CusA, una proteína de membrana interna de la familia de proteínas RND que transportan un H^+ en sentido contrario al sustrato (Cu); CusB, una proteína periplásmica que une a CusA con CusC; CusC, componente de la membrana externa de la bacteria; y CusF, una chaperona de Cu que se ubica en el periplasma de esta bacteria (Rensing y Grass, 2003) (Figura 2). Las proteínas CusCBA se asocian formando una estructura que atraviesa desde el citoplasma hasta la membrana externa, permitiendo la salida del Cu desde el citoplasma hacia el espacio extracelular. Adicionalmente la proteína CusF aporta átomos de Cu al sistema desde el periplasma, para que sean retirados de la célula (Loftin y col., 2005). Este sistema está regulado por un sistema de dos componentes codificado por *cusR* y *cusS*, que activan la expresión del operón *cusCFBA* en respuesta a los altos niveles de Cu (Outten y col., 2001). Este sistema ocupa la fuerza protón motriz como fuente de energía (Outten y col., 2001).

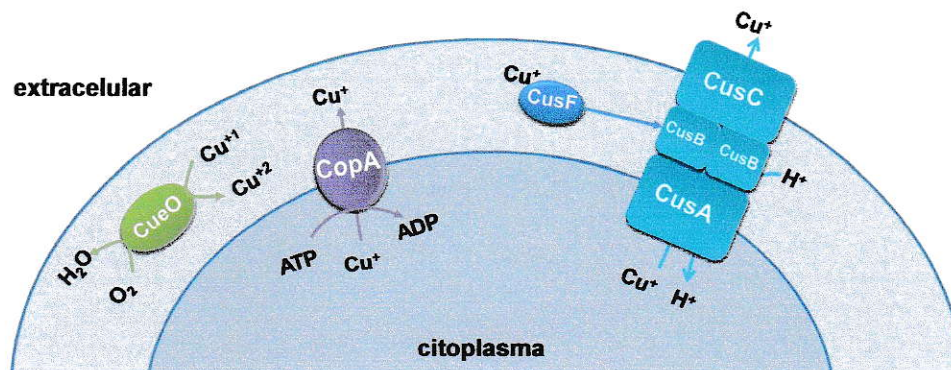


Figura 2. Esquema de los determinantes de resistencia al Cu. La proteína CueO oxida el Cu^{+1} a Cu^{+2} acoplado con la reducción del oxígeno molecular a agua. CopA transporta el cobre desde el citoplasma hacia el periplasma con gasto de una molécula de ATP. El complejo CusCBA transporta el cobre desde el citoplasma al espacio extracelular acoplado con el ingreso un protón desde el periplasma. La proteína CusF entrega átomos de cobre al complejo CusCBA, para ser retirados hacia el espacio extracelular.

El sistema Cue tiene una expresión basal más alta que el Cus, lo que sugiere que sería el sistema primario a concentraciones moderadas de Cu (Outten y col., 2001). Debido a que el sistema Cus se activa a concentraciones más bajas de Cu en anaerobiosis, se ha propuesto que sería el sistema principal en esta condición (Outten y col., 2001). Adicionalmente, el sistema Cus es sólo importante en condiciones aeróbicas cuando el sistema Cue no puede ser activado, o se encuentra sobrepasado (Outten y col., 2001). El factor que gatilla el aumento de la expresión del sistema Cus sería el aumento citoplasmático de Cu^{+} , que sería sentido por CusS (Outten y col., 2001). Teniendo en cuenta estos antecedentes es que un buen candidato a mutar para obtener una cepa sensible al Cu en condiciones aeróbicas es el gen *copA*.

1.4. El Modelo de Keasling y su aplicabilidad al Cobre

Si bien se han encontrado algunos metales pesados asociados a los gránulos de poliP en ciertos microorganismos, existe vasta evidencia de que el poliP es consumido durante el proceso de detoxificación. Un ejemplo de ello es la bacteria *Klebsiella*

aerogenes que puede acumular grandes cantidades de poliP, los que desaparecen luego de exponerla al Cd (Aiking y col., 1984). En esta misma dirección, la cianobacteria *Anacystis nidulans* es más resistente al Cd cuando tiene mayores niveles de poliP (Keyhani y col., 1996). Estas observaciones, más otras evidencias experimentales llevaron a Keasling en 1997 a proponer un modelo que intenta explicar el mecanismo por el cual participaría el poliP en la resistencia al Cd. Este modelo se planteó para Cd, debido a que se contaba con evidencias experimentales con ese metal, pero en principio podría aplicarse a otros metales pesados. En este modelo el poliP es hidrolizado en presencia de metales, liberando Pi que se uniría al metal formando un complejo metal-fosfato que sale de la célula mediante un transportador Pit (Keasling, 1997). Las evidencias del modelo de Keasling se presentan y se explican a continuación:

1) La concentración intracelular de los cationes regula la actividad PPX. La actividad PPX *in vitro* es dependiente de la concentración de cationes como K^+ y Ca^{+2} (Keasling y col., 1993), por lo que se propuso que su actividad en la célula también podría ser modulada por otros cationes.

2) El fosfato liberado del poliP sale de la célula. Cuando *E. coli* se enfrenta a una carencia de fosfato en el medio los niveles de poliP disminuyen, debido a un aumento en la actividad PPX (Sharfstein y col., 1996). Esta hidrólisis del poliP produce la regulación negativa de la respuesta a la carencia de fosfato por el regulón *pho*, que es posible medirlo por la actividad de la fosfatasa alcalina (Sharfstein y col., 1996).

3) El fosfato es capaz de salir de la célula por un transportador Pit y lo hace acompañado por los cationes, que podrían ser metales pesados. Los transportadores de Pi, PitA y PitB, captan el fosfato metálico ($MeHPO_4$), y junto

con ello en la misma dirección se transporta un protón. Mientras ocurre la captación del MeHPO_4 la energía electroquímica del gradiente de protones se convierte en energía del gradiente químico del MeHPO_4 , mientras que durante la salida del MeHPO_4 la energía del gradiente químico se convierte nuevamente en energía electroquímica del gradiente de protones (van Veen y col., 1994). Este mecanismo permitió que *E. coli* soportara mejor la anaerobiosis, ya que la salida de MePO_4 con un protón mantiene el gradiente protón motriz y permite que se genere ATP (van Veen y col., 1994).

4) Se requiere de la hidrólisis del poliP a Pi para que actúe protegiendo a la célula de la toxicidad causada por el Cd. La capacidad de hidrolizar el poliP es más importante que la de acumular grandes cantidades del polímero (Keasling y Hupf, 1996). Al someter distintas cepas de *E. coli* carentes de los genes del metabolismo del poliP al Cd y sobreexpresar los genes *ppk1* o *ppk1-ppx* se determinó que la cepa que tiene más poliPs no es la más resistente al metal, sino que lo es la cepa que tiene la capacidad de metabolizar (sintetizar e hidrolizar) los poliPs (Keasling y Hupf, 1996).

Si bien este modelo se desarrolló en base a la evidencia experimental principalmente con el Cd, también existe evidencia que hace pensar que este mismo fenómeno podría ocurrir con otros metales como el Cu.

El grupo de Hashemi y colaboradores logró aislar una cepa del alga *Anabaena variabilis* resistente al Cu, que forma más gránulos de poliP que la silvestre, y la resistencia al Cu de esta cepa aumenta si se crece en medios con alto fosfato (Hashemi y col., 1994). Se determinó la localización del Cu en la célula, y no se encontró Cu en los gránulos de poliP, lo que descartó que la acción de los poliP fuera simplemente por la quelación del metal (Hashemi y col., 1994).

Adicionalmente, nuestro grupo determinó que los gránulos de poliP de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* se reducen cuando al medio se le agrega Cu (Alvarez y Jerez, 2004). Además, en presencia del Cu aumentó la actividad PPX, y con ello el eflujo de Pi (Alvarez y Jerez, 2004). Resultados equivalentes se encontraron en el arqueón *Sulfolobus metallicus*, que al igual que *A. ferrooxidans*, es capaz de resistir altas concentraciones de Cu (Remonsellez y col., 2006). En estos microorganismos no se ha encontrado un transportador tipo Pit, aunque existe un gen que codificaría una proteína similar al transportador Pho84 de *S. cerevisiae* (Alvarez y Jerez, 2004), que podría suplir la actividad de los transportadores Pit.

1.5. La propuesta

Tal como ya se mencionó, se ha visto que la presencia de los poliP ayuda a la resistencia al Cu. Sin embargo, el mecanismo por el cual el poliP participa en esta resistencia no ha sido dilucidado. Existen 2 propuestas que han sido más aceptadas: que el poliP puede ser una fuente energética (específicamente para la formación de ATP) para los determinantes de resistencia específicos del Cu (como lo es CopA), o que podría ser una fuente de fosfato que permita la quelación del metal, y una posterior salida de la célula (Figura 3). En esta tesis se abordó esta interrogante, utilizando la bacteria modelo *E. coli*. Para esto se realizaron varias mutaciones y clonamientos de distintos genes para estudiar si las 2 propuestas son factibles en esta bacteria. Si el poliP tiene una función energética sobre los determinantes de resistencia canónicos de la bacteria, un aumento en el metabolismo de los poliPs en una cepa que carece de CopA no debería aumentar la resistencia al metal. Por otro lado, si el mecanismo de acción es por la formación de MeHPO_4 y la posterior salida de la célula por un transportador Pit, en mutantes carentes de Pit deberíamos esperar que un aumento de los poliP no incremente la resistencia al Cu.

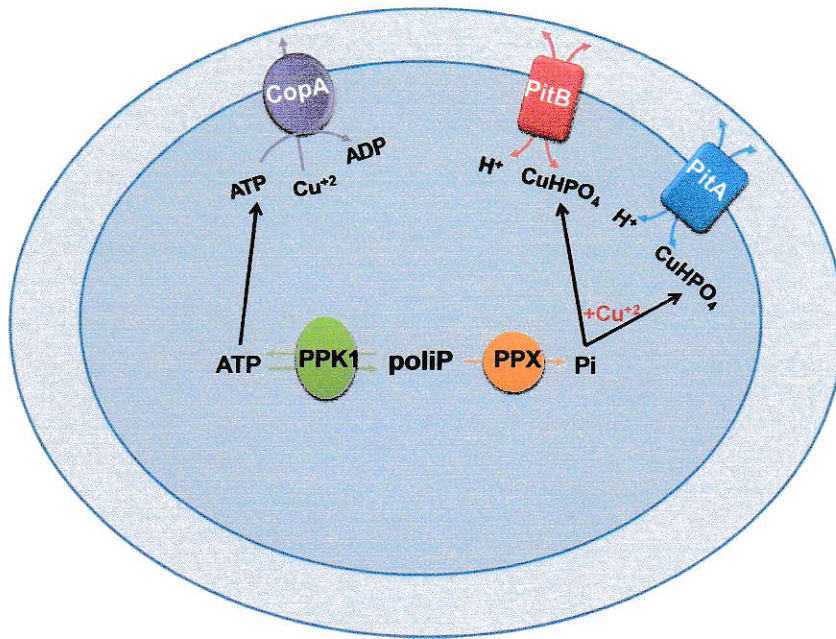


Figura 3. Modelo con las dos propuestas de participación del metabolismo de los poliPs en la resistencia al Cu en *E. coli*. En el esquema se muestran las proteínas a estudiar, con sus respectivas funciones. En flechas negras se indican los posibles vínculos entre el metabolismo de los poliPs y la resistencia al Cu.

1.6. Hipótesis

La alteración del metabolismo de los poliP combinada con las mutaciones en los genes *pit* y en otros determinantes de resistencia al cobre en *E. coli* aportará a dilucidar la función que tienen los poliP en la resistencia a este metal.

1.7. Objetivo general

Estudiar el mecanismo por el cual los poliPs aportan a la resistencia al Cu en *E. coli*.

1.8. Objetivos específicos

1. Generar mutantes por escisión en *E. coli* para los genes *pitA*, *pitB*, *copA*, los genes *ppk* y *ppx*.
2. Caracterización genotípica y fenotípica de los mutantes obtenidos.
3. Generar dobles y triples mutantes para estudiar la relación entre el poliP y las proteínas del sistema Pit, o del transportador CopA, en la resistencia a los metales pesados.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Cepas Bacterianas

Se construyeron un total de 8 cepas mutantes y 9 cepas recombinantes de *E. coli* derivadas de la cepa K12, que se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Cepas mutantes y recombinantes de *E. coli*

| Cepa | Características | Referencia |
|---|--|--------------------|
| BW23474 | $\Delta lac-169$ $robA1$ $creC510$ $hsdR514$ $\Delta uidA$ (<i>MluI</i>): <i>pir-116 endA recA1</i> | Biery y col., 2000 |
| TOP10 | F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>nupG</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ - | Invitrogen |
| K12 | ATCC® 29425 | ATTC |
| $\Delta pitA$ | Derivada de la K12 que carece del gen <i>pitA</i> | Este estudio |
| $\Delta pitB$ | Derivada de la K12 que carece del gen <i>pitB</i> | Este estudio |
| $\Delta poliP$ | Derivada de la K12 que carece del operón <i>ppk-ppx</i> | Este estudio |
| $\Delta copA$ | Derivada de la K12 que carece del gen <i>copA</i> | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta pitA$ | Derivada de la K12 que carece del gen <i>pitA</i> y del operón <i>ppk-ppx</i> | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta pitB$ | Derivada de la K12 que carece del gen <i>pitB</i> y del operón <i>ppk-ppx</i> | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta copA$ | Derivada de la K12 que carece del gen <i>copA</i> y del operón <i>ppk-ppx</i> | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta pitA\Delta pitB$ | Derivada de la K12 que carece de los genes <i>pitA</i> , <i>pitB</i> y del operón <i>ppk-ppx</i> | Este estudio |
| K12/pBADpoliP | Cepa K12 con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta pitA$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta pitA$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta pitB$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta pitB$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta poliP$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta poliP$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta copA$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta copA$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta pitA$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta poliP\Delta pitA$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta pitB$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta poliP\Delta pitB$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta copA$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta poliP\Delta copA$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |
| $\Delta poliP\Delta pitA\Delta pitB$ /pBADpoliP | Cepa $\Delta poliP\Delta pitA\Delta pitB$ con el plásmido pBADpoliP | Este estudio |

2.1.2. Plásmidos

A continuación se presentan los plásmidos utilizados en esta tesis, los que se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Plásmidos utilizados en *E. coli*

| Plásmido | Características | Referencia |
|------------|---|--------------------------------|
| pBAD-TOPO | <i>oriBR322, bla(ApR), araC.</i> | Invitrogen |
| pBAD-poliP | <i>oriBR322, bla(ApR), araC, ppk-ppx⁺</i> | Este estudio |
| pKD3 | <i>oriR6Ky, bla(ApR), cat, rgnB(Ter)</i> | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pKD4 | <i>oriR6Ky, bla(ApR), kan, rgnB(Ter)</i> | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pKD46 | <i>araBp-gam-bet-exo, bla(ApR), repA101(ts), oriR101</i> | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pCP20 | <i>FLP⁺, λ cl857⁺, λp_R, repA101(ts), kan</i> | Cherepanov y Wackernagel, 1995 |

pBAD-TOPO: Plásmido de expresión regulada, que se induce por arabinosa y se reprime por glucosa. Este plásmido pertenece al kit pBAD-TOPO TA® de Invitrogen®, el cual tiene unida una topoisomerasa en los extremos del plásmido (que se encuentra abierto), de manera que permite clonar rápidamente fragmentos de PCR amplificados por la enzima Taq, que cuentan con una adenina en el extremo. El producto génico que se exprese en este plásmido contendrá una cola de 6 histidinas en el C-terminal de la proteína. Tiene 4,1 kb de tamaño y como marcador de selección contiene el gen que otorga resistencia a la ampicilina.

pBADpoliP: Derivado del pBAD-TOPO con la inserción del operón *ppk-ppx* de *E. coli*. Debido a que el gen *ppx* está río abajo del *ppk1*, es la PPX la que queda fusionada con la cola de histidinas.

pKD3: plásmido de bajo número de copias de 2,8 kb que se utiliza como molde para las reacciones de PCR para la recombinación génica por la técnica de Datsenko y Wanner (2000). Contiene el gen de la β-lactamasa que le otorga resistencia a la ampicilina y el gen de la cloramfenicol acetil transferasa, que le da resistencia al

cloramfenicol. La zona que se amplifica por PCR contiene los sitios FRT que flanquean el gen de la cloramfenicol acetil transferasa.

pKD4: plásmido de 3,267 kb que al igual que el pKD3 se utiliza como molde en las reacciones de PCR para la técnica de Datsenko y Wanner (2000). Es prácticamente igual al pKD3, con la diferencia que entre los sitios FRT tiene el gen de la neomicina fosfotransferasa del Tn5, que le otorga resistencia a la kanamicina.

pKD46: plásmido de 6,33 kb derivado del pKD20 (Datsenko y Wanner, 2000) que en presencia de arabinosa expresa la recombinasa Red del fago λ , que permite la recombinación homóloga entre el producto de PCR y el DNA genómico. Contiene el gen de la β -lactamasa y es sensible a la temperatura: se replica cuando la bacteria se crece a 30 °C y se pierde de ésta cuando se incuba a 37 °C.

pCP20: plásmido de 9,4 kb de bajo número de copias que es sensible a la temperatura (Cherepanov y Wackernagel, 1995). En presencia de altas temperaturas (sobre 40°C) la bacteria que lo contiene expresa la recombinasa sitio específica FLP, que recombina los sitios FRT, de manera de escindir el gen que otorga la resistencia al antibiótico.

2.1.3. Medios de cultivo

Rutinariamente se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) que contiene 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, y 5 g/l de NaCl. Rutinariamente se preparó el medio con la triptona y el extracto de levadura (Difco) y el NaCl (Merck). Para obtener las mutaciones por la técnica de Datsenko y Wanner (2000) el medio LB se preparó con todos los reactivos marca Merck. Para algunas cepas, el medio se suplementó con los antibióticos ampicilina (100 μ g/ml) (LBA), kanamicina (50 μ g/ml) (LBK), o cloramfenicol

(50 µg/ml) (LBC). Las placas de medio LB sólido se prepararon sobre placas Petri con medio LB y agar al 1,5 %, y se suplementaron con antibióticos cuando fue necesario.

2.2. Métodos

2.2.1. Métodos de biología molecular

2.2.1.1. Extracción de DNA plasmidial

Para la extracción del DNA plasmidial de las cepas de *E. coli* BW23474/pKD3 y BW23474/pKD4 que portan el plásmido pKD3 y pKD4 respectivamente, se ocupó el kit “Wizard®Plus Midiprep” de Promega®. Este kit se basa en una lisis celular seguida de una neutralización y la retención del DNA plasmidial por una columna con resina, lavados y posterior solubilización en agua bidestilada. Para la extracción del DNA se utilizaron cultivos de 10 ml crecidos en medio LBK o LBC. El DNA plasmidial se guardó a -20 °C y se diluyó para posteriores reacciones de amplificación por PCR.

Para la extracción del DNA plasmidial desde las células TOP10 con el plásmido pBAD-TOPO y pBAD-poliP se ocupó el kit “HiYield Plasmid Mini kit” de RBC Bioscience®. El protocolo consiste en una lisis celular seguida de una neutralización, la unión a la resina de la mini columna, dos lavados y finalmente la elución del plásmido con agua bidestilada.

2.2.1.2. Extracción del DNA genómico

Para la extracción del DNA cromosómico de *E. coli* K12 se utilizó el kit “Wizard genomic DNA purification” de Promega®, siguiendo las instrucciones para las bacterias Gram Negativas. Brevemente el protocolo consiste en una lisis celular

seguida por una digestión enzimática del RNA, precipitación del DNA genómico con isopropanol y una posterior solubilización en agua bidestilada. El DNA se conservó en frío y se diluyó para realizar las amplificaciones por PCR.

2.2.1.3. Chequeo del DNA plasmidial

Para analizar que los plásmidos obtenidos por la extracción plasmidial corresponden a los esperados se procedió a digerirlos con enzimas de restricción y comparar el perfil obtenido con el perfil de restricción que se espera por el análisis *in silico*. Para ello los plásmidos pKD3 y pKD4 se sometieron a digestión con las enzimas *HindIII* y *PstI* (New England BioLabs®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos pKD46 y pCP20 se digirieron con la enzima *EcoRI* (Fermentas®), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

2.2.1.4. Electroforesis del DNA en geles de agarosa

Para visualizar rutinariamente el DNA se utilizaron geles de agarosa. Estos geles se prepararon en amortiguador TAE 0,5 X (Tris-acetato 20 mM pH 8, EDTA 0,5 mM) con agarosa al 1 % (Invitrogen®). Las electroforesis se corrieron por 25 min a 100 V en la cámara de electroforesis "Gel XL Ultra V-2" (Labnet). Como marcador de estándar de peso molecular se utilizó "HyperLadder™ I" (Bioline®) o "1 Kb DNA Ladder" (Invitrogen®). La tinción se realizó por 15 min en una solución de TAE 0,5 X con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. La visualización de las bandas se realizó mediante un transiluminador con luz U.V. (Syngene).

2.2.1.5. Electroforesis del DNA en geles de poliacrilamida

En ocasiones se necesitó determinar las diferencias de tamaño entre bandas de amplificados de PCR mediante la electroforesis en geles de acrilamida, debido a que

las diferencias eran cercanas a los 100 pb en fragmentos de aproximadamente 1500 pb. Para ello se prepararon geles de 20 cm a una concentración de acrilamida del 5 %. Como marcador de peso molecular se ocupó el marcador de 100 bp Invitrogen®. Se aplicaron los productos de PCR directamente, gracias a que el Green Buffer de la Go Taq (Promega®) es también buffer de carga. Se corrió el gel en amortiguador TAE 1 X, a 250 V por 2 h. La tinción se realizó con nitrato de plata de la siguiente forma. Se incubó el gel por 5 min en etanol al 10 %, y luego por 5 min en ácido nítrico al 1 %. Se realizaron 3 lavados con agua destilada, y luego se agregaron 250 ml de nitrato de plata y se incubó en la oscuridad por 20 min. Luego se lavó con agua destilada por 1 min, y se reveló con una solución de carbonato de sodio 0,28 M con formaldehído 0,5 %. La reacción de tinción se detuvo al incubar el gel con ácido acético al 10 % durante 5 min y luego el gel se mantuvo en agua destilada.

2.2.1.6. Purificación del DNA desde geles de agarosa

Se utilizó el kit "E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit" de Omega Bio-tek de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El método se basa en la escisión de un trozo del gel de agarosa que lleva el DNA a purificar, y su solubilización en un amortiguador a alta temperatura. Luego la solución se aplica en una mini columna que tiene una resina a la que se une el DNA, se lava y luego se eluye el DNA con agua bidestilada precalentada.

2.2.1.7. Precipitación y diálisis del DNA

Para precipitar el DNA se le agregó 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó a -20 °C por 1 h, y luego se centrifugó 20 min a 12.000 x g a 4 °C. Luego se lavó con 2 volúmenes de etanol al 70 % y se centrifugó por 10 min a 12.000 x g a 4 °C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Luego el pellet de DNA se

resuspendió en agua bidestilada. Para la precipitación se usaron 100 µl de producto de PCR, y el pellet obtenido se resuspendió luego en 20 µl de agua.

Para dializar las muestras de DNA se ocuparon filtros de membranas de nitrocelulosa Millipore® de 0,025 µm. Esta membrana se colocó flotando sobre agua bidestilada con la superficie brillante hacia arriba, y en ella se aplicó una gota de la muestra. Las muestras se dializaron por 1,5 h.

2.2.1.8. Partidores y reacciones de PCR

Amplificación por PCR de los plásmidos pKD3 y pKD4. Para amplificar el cassette de resistencia a kanamicina o a cloramfenicol presentes en los plásmidos pKD4 y pKD3 respectivamente se ocupó la enzima Go Taq Flexi de Promega®. Los partidores usados son los que se presentan en la Tabla 3, que contienen 20 b homólogas a la zona flanqueante de los extremos FRT (rojo) y además incorporan 40 b a cada extremo del amplificado que es homólogo a los extremos del gen a escindir (azul). La amplificación se realizó en volúmenes de 50 µl, que contenían: Green Buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, DMSO 5 %, Go taq 1 U, partidores 0,5 µM cada uno y como secuencia molde se ocupó 3 µl de una dilución 1/10 de la purificación plasmidial. El programa de PCR que se utilizó es el siguiente: 2 min a 95 °C, luego 35 ciclos de 30 seg a 95 °C seguido de 30 seg a 55 °C y 1,5 min a 72 °C, finalizando con 10 min a 72 °C.

Para verificar la recombinación homóloga y la escisión de los genes se realizaron PCR de colonias con la enzima Go Taq Flexi (Promega®). Para esto las colonias obtenidas se sembraron en una nueva placa y se incubaron a 37 °C durante 16 h. En 40 µl de agua bidestilada estéril se homogenizó la masa celular del clon a analizar hasta que quede una solución apenas opalescente. Para el PCR de colonia se ocuparon reacciones de 15 µl, que contenía: Green Buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs

0,2 mM, 0,38 U de Go Taq Flexi, 0,5 µM de cada partidor, y 1 µl de la suspensión de la colonia. Los partidores usados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Partidores de 60 nucleótidos

| Partidor | Secuencia |
|---------------|---|
| ppk-ppx H1+P1 | 5' TCAGGAAGCGGGACAAATCTAACCCGCTGATTGAAAGGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' |
| ppk-ppx H2+P2 | 5' GATCAAGCAGTACCAGCGCATTCTGACTAAACCAGTCATGCATATGAATATCCTCCTTAG 3' |
| pitA H1+P1 | 5' CGTTCTCAGCTCGCCGTGGTTATGGCGCGGTATTCAACTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' |
| pitA H2+P2 | 5' GAGTACGTGAGTAGTGGAAACCGGCATCCCGGTATAAATCCATATGAATATCCTCCTTAG 3' |
| pitB H1+P1 | 5' GATGGCGGCATTTTTTAACTTTTTTGGCGTGTATGGGCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' |
| pitB H2+P2 | 5' ATAGACACTGCCCGCTCATTGTGCCGCATGCCTTGCCGATATGAATATCCTCCTTAG 3' |
| copA H1+P1 | 5' GAATACCGATACTGTTGTAGATAAACCGCACCAGCAGGTTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG 3' |
| copA H2+P2 | 5' GGATGTGTCTACTGAAGCGCACGTTACCGGGACTGCCCATATGAATATCCTCCTTAG 3' |

Tabla 4. Partidores de 20 nucleótidos

| Partidor | Secuencia |
|-----------------|-------------------------------------|
| ppk-ppx sense | 5' ATGGGTCAGGAAAAGCTATACATCG 3' |
| ppk-ppx reverse | 5' AGCGGCGATTTCTGGTGTACTTT 3' |
| pitA sense | 5' ATGCTACATTTGTTTGGCTGGCCTGG 3' |
| pitA reverse | 5' CAGGAACTGCAAGGAGACCAGTAC 3' |
| pitB sense | 5' ATGCTAAATTTATTTGTTGGCCTTG 3' |
| pitB reverse | 5' AATCAACTGCAATGCTATCCAGTAC 3' |
| copA sense | 5' ATGTCACAAACTATCGACCTGACCC 3' |
| copA reverse | 5' GTTGGCGTTACTCACTACGGTAAT 3' |
| ppx sense | 5' ATGACTACATCAAATCACTCGAACCAACC 3' |
| pBAD reverse | 5' GATTTAATCTGTATCAGG 3' |

Para amplificar el operón *ppk1-ppx* de *E. coli* se ocupó la mezcla de enzimas Elongase® Enzyme Mix de Invitrogen®, que contiene una mezcla de las enzimas Taq y Pfu. Los partidores utilizados fueron ppk-ppx sentido y ppk-ppx reverso (Tabla 4). La reacción se realizó en 50 µl y conteniendo 0,2 mM de dNTPs, 1,6 mM MgCl₂, 0,2 µM de cada partidor, 100 ng de DNA genómico de *E. coli* K12, y 1 µl de la mezcla enzimática. El programa de PCR que se usó es el siguiente: 3 min a 94 °C, 35 ciclos de

30 seg a 94 °C seguido de 30 seg a 55 °C y la elongación de 4 min a 68 °C, para finalizar 10 min a 70 °C.

Para determinar la orientación en que se insertó el operón *ppk-ppx* en el plásmido pBAD-TOPO se realizó un PCR de colonia. Los partidores que se usaron son pBAD reverso y *ppx* sentido y se muestran en la Tabla 4.

2.2.1.9. Secuenciación del DNA

Para verificar las mutaciones realizadas, los fragmentos amplificados por PCR a partir del DNA genómico de los mutantes fueron secuenciados. Para ello se realizaron las purificaciones de los productos de PCR se enviaron a la empresa MacroGen Inc (Korea).

2.2.1.10. Clonación en pBAD-TOPO

El operón *ppk-ppx* se amplificó por PCR y se clonó en el vector pBAD-TOPO (Invitrogen®) siguiendo las instrucciones del proveedor. La ligación se realizó mezclando 0,2 µl (25 ng aproximadamente) de producto de PCR con 1 µl de solución salina, 4,3 µl de agua y 5 ng de vector. La mezcla se incubó por media hora a temperatura ambiente. La ligación se transformó como se describe posteriormente (2.2.1.11). Para chequear la presencia del plásmido con el operón insertado correctamente en las colonias transformantes se realizó una extracción de ácidos nucleicos totales. Los clones que contenían el plásmido del tamaño esperado se sometieron a un PCR en colonia, para determinar la orientación del fragmento de PCR. Para ello se usaron los partidores pBAD reverso y *ppx* sentido (Tabla 4). Los clones que tenían el fragmento correctamente orientado se seleccionaron para hacer los análisis de expresión de las proteínas, lo que se determinó por Western Blot. Se

encontraron dos clones que expresaban el operón en el plásmido, y se seleccionó uno de ellos para continuar los experimentos.

2.2.1.11. Transformación de *E. coli*

Se realizaron las transformaciones de los productos de ligación, de los vectores, y de los productos de PCR. Para el primer caso se usaron las células quimiocompetentes “One Shot® TOP10 Chemically Competent” (Invitrogen®), proporcionadas por el kit del vector pBAD-TOPO. El protocolo de transformación consiste en incubar 50 µl de células y 3 µl de ligación en hielo por 30 min, luego 1 min a 42 °C y para finalizar con 2 min en hielo. Para la recuperación se agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37 °C con agitación por 1 h. Luego se plaquearon alícuotas de 100 y 200 µl en placas de Petri con agar LBA.

La transformación de los vectores y productos de PCR se realizó mediante electroporación. Para ello se prepararon células electrocompetentes de la forma que se presenta a continuación. Un cultivo en fase exponencial (DO_{600} 0,6-0,8) se cosechó por centrifugación a 13.000 x g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados de las células con agua bidestilada estéril, las que se centrifugaron de la misma manera. Luego el pellet celular se resuspendió en agua bidestilada estéril, concentrando las células 100 veces. En una cubeta de electroporación de 1 mm se añadió 1 µl de DNA plasmidial ó 15 µl del DNA producto de PCR precipitado y dializado, y 50 µl de las células electrocompetentes, y se electroporó con el programa predeterminado para transformar *E. coli* en cubetas de 1 mm (Electroporador Bio-Rad). Luego se agregó 1 ml de medio LB y se dejó recuperar las células por 1 h cuando se transformaron con plásmidos, y 2 h cuando se transformaron con productos de PCR. La incubación se realizó a 30 ó 37 °C según el caso. Para el caso de los plásmidos, se plaqueó 100 µl en placas de Petri con agar y medio LBA; para el caso de los productos

de PCR el cultivo se centrifugó a 12.000 x g y las células se resuspendieron en 100 µl que se plaquearon en placas de Petri con agar y medio LBK o LBC, según el caso.

2.2.1.12. Determinación de los transformantes

Se realizó un aislamiento de los ácidos nucleicos totales para determinar si las colonias obtenidas luego de la transformación con un plásmido efectivamente portan el vector, o para determinar si el vector incorporó el gen de interés luego de una ligación. Para ello los clones se crecieron formando parches de 1 cm² en una placa de Petri con medio LBA sólido y se incubaron por 16 h. Se tomó la mitad de cada parche y se disolvió en 40 µl de una solución de sacarosa 0,18 M, Tris-HCl 3,2 mM y azul de bromofenol 2,5 mg/ml, a pH 7. Luego se agregó 15 µl de fenol cloroformo básico (fenol saturado básico 50 %, cloroformo 48 %, alcohol iso-amílico 2% marca Winkler Ltda.) a cada tubo y se agitó por vortex durante 15 seg. Posteriormente se centrifugó por 3 min a 12.000 x g y se aplicaron 15 µl de la fase acuosa superior directamente en un gel de agarosa al 1 % y se corrió la electroforesis. La presencia de una banda entre el DNA genómico y el RNA 23S indica la presencia de un plásmido en el clon analizado. Para identificar los clones que incorporaron el inserto luego de una ligación se comparan los tamaños de las bandas que corresponden a los plásmidos, los plásmidos más pesados son los que incorporaron el inserto.

2.2.1.13. Mutación por recombinación homóloga con productos de PCR

Se ocupó esta técnica para generar los mutantes en *E. coli*, como fue publicado por Datsenko y Wanner (2000). Brevemente esta técnica se basa en la escisión de uno o más genes mediante procesos de recombinación homóloga y recombinación sitio específica (Figura 4). Para ello se amplificaron por PCR el cassette del antibiótico del plásmido pKD3 o pKD4 con los partidores de 60 pb (Tabla 3), que poseen extremos

idénticos a la zona flanqueante del gen a escindir. Para esto, 100 μ l de la reacción de PCR se precipitaron, dializaron y se electroporaron en una cepa portadora del plásmido pKD46 (que se creció en presencia de arabinosa para expresar la recombinasa Red). Para determinar si ocurrió la recombinación homóloga se realizó una reacción de PCR a las colonias utilizando los partidores de 20 pb. Los clones positivos se crecieron a 42 °C para curar el plásmido pKD46. Posteriormente el mutante se transformó con el plásmido pCP20, los clones portadores del plásmido se incubaron a 42 °C para activar la recombinasa FLP y para curar el plásmido. Para determinar si ocurrió la recombinación sitio específica se realizó una nueva reacción de PCR de colonia con los partidores de 20 pb.

2.2.2. Técnicas de Microscopía

2.2.2.1. Microscopía electrónica de transmisión

Las cepas de *E. coli* silvestre y Δ poliP se crecieron en medio LB por 16 h. 5 μ l del cultivo se aplicaron sobre una grilla de cobre, por 1 min, luego el exceso del líquido se retiró con un papel filtro. Las células se observaron sin tinción en el microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 Bio Twin de la Unidad de Microscopía de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

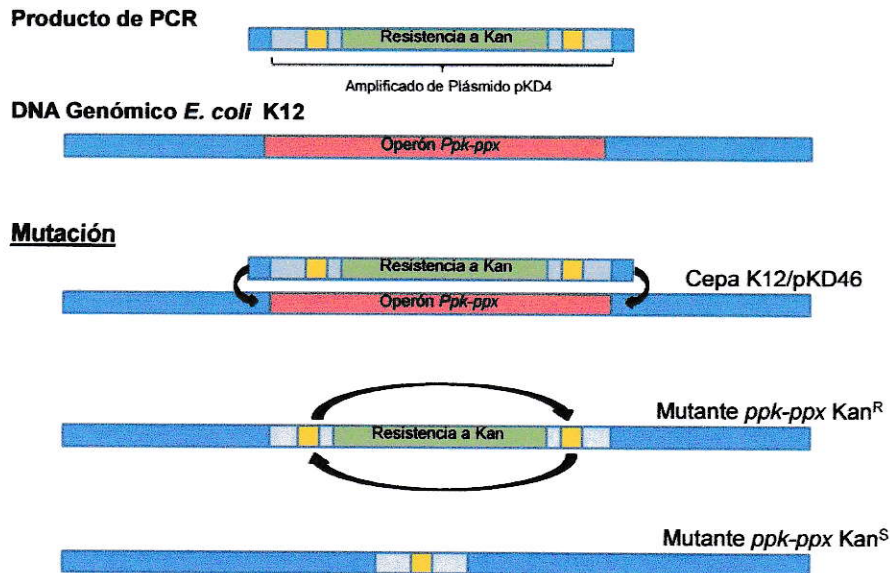


Figura 4. Esquema de la mutación por recombinación homóloga utilizando productos de PCR. En el ejemplo se muestra la mutación del operón *ppk1-ppx*.

2.2.3. Métodos de análisis de las proteínas

2.2.3.1. Preparación de las muestras para los análisis de western blot

Ensayo de inducción: En 5 ml de medio LBA se inocularon 100 μ l de un cultivo fresco de noche y se incubó a 37 °C con agitación hasta una DO_{600} de 0,5. Se tomó 1,5 ml del cultivo y las células se cosecharon por centrifugación a 13.000 x g por 1,5 min. Luego de descartar el sobrenadante, se determinó el peso húmedo del sedimento celular. Al cultivo restante se le agregó arabinosa 0,2 % y se incubó por 2 h a 37 °C con agitación. Se centrifugó 1 ml del cultivo a 13.000 x g, y luego de descartar el sobrenadante se determinó el peso húmedo del pellet de células. Las células se guardaron a -20 °C hasta que se realizó la electroforesis de poliacrilamida.

Las muestras de proteínas totales se prepararon lisando las células con la siguiente proporción: 3 mg de células (peso húmedo) se mezclaron con 20 µl de agua y 10 µl de la solución amortiguadora 3X (Tris-HCl 0,187 pH 6,8, SDS 6 %, glicerol 30 %, β-mercaptoetanol 15 % y azul de bromofenol 0,06 %). Las muestras se calentaron a 95 °C por 5 min, se centrifugaron brevemente y se aplicaron 5 µl del sobrenadante en cada pocillo del gel.

Ensayo de determinación de la MIC: Luego de la medición de la DO₆₀₀ en el ensayo de determinación de la MIC, los tubos sin Cu y con 1 mM de Cu (con glucosa o con arabinosa) se centrifugaron a 13.000 x g por 1,5 min. Se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo del pellet celular. Las muestras de proteínas totales se obtuvieron lisando las células de la manera mencionada arriba.

2.2.3.2. Electroforesis de las proteínas en geles de poliacrilamida SDS

Las muestras de las proteínas totales se aplicaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturantes en presencia de SDS según lo descrito por Laemmli (1970). El gel concentrador se preparó al 5 % de acrilamida, mientras que el gel separador al 10 %. El marcador de peso molecular que se utilizó es el Benchmark (Invitrogen®) y se aplicaron 1,5 µl de éste. La electroforesis se corrió a 80 V hasta que el colorante llegó al gel separador y luego a 150 V hasta que el colorante alcanzó la parte inferior de los geles. Los geles se tñeron con azul de Coomassie como se presenta en el 2.2.3.3.

2.2.3.3. Tinción de los geles de poliacrilamida

Para la tinción, los geles se incubaron en una solución de fijación (etanol 50 % y ácido fosfórico 2 %) por 30 min. Luego se incubó el gel por 1 h en la solución "blue silver" (Coomassie® Brilliant blue G 250" (Merck) 0,12 %, ácido fosfórico 10 %, sulfato

de amonio 10 % y metanol 20 %). Luego se destiñeron con 3 lavados con agua bidestilada.

2.2.3.4. Detección de las proteínas por Western blot

Se prepararon dos geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes, como se explicó arriba. En ambos geles se aplicaron las mismas muestras, e igual cantidad de proteínas por muestra. Un gel se tiñó con azul de Coomassie (ver arriba) como control de corrida electroforética y como control de la cantidad de proteína aplicada. El otro gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa Immobilon™ de 0,45 µm (Millipore), en amortiguador CAPS (CAPS 10 mM, metanol 10 %, pH 11). La transferencia se realizó en hielo, durante dos ciclos de 24 min con un máximo de 0,8 A. Luego de la electrotransferencia se tiñó el gel de poliacrilamida de la misma forma mencionada arriba, para verificar la eficacia de ésta.

La membrana con las proteínas transferidas se lavó con agua bidestilada y se secó a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó por 2 h en solución de bloqueo que contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,6 y NaCl 137 mM (TBS), Tween 20 al 0,1% y BSA al 1 %. Se incubó por toda la noche con el anticuerpo anti-His6 obtenido a partir de ratón (Calbiochem), en proporción 1/5.000. Posteriormente se lavó 4 veces con la solución de lavado (TBS y Tween 20 al 0,1 %) por 10 min. Se incubó por 2 h en TBS con los anticuerpos monoclonales anti-ratón conjugados con peroxidasa (Amersham®) en una dilución 1/5.000. Se lavó dos veces la membrana con solución de lavado, y luego 2 veces con TBS por 10 min. Se dejó secar a temperatura ambiente. El revelado se realizó en una solución con TBS, metanol al 20 %, 0,5 mg/ml de 4-Cloro-1-naftol (Biorad®) y H₂O₂ al 0,15 % (Merck®). La reacción se detuvo al lavar la membrana con abundante agua.

2.2.4. Técnicas de Microbiología

2.2.4.1. Curvas de crecimiento

En matraces de 125 ml se mezclaron 25 ml de medio LB con 50 μ l de un cultivo de noche y se incubaron a 37 °C con agitación (150 rpm). Cada 45 min se midió la DO₆₀₀ en el espectrofotómetro Genesys 6 (Thermo Spectronic). Cuando la medición fue de más de una unidad se realizaron diluciones. Las cepas se crecieron en triplicado.

2.2.4.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Los experimentos se realizaron en tubos de poliestireno de 5 ml (BD Falcon™). Para las cepas mutantes se mezclaron 1 ml de medio LB con 1 μ l de un cultivo fresco de noche. Para las cepas con el plásmido pBADpoliP el medio ocupado fue LBA suplementado con arabinosa (inductor) 0,2 % o glucosa (represor) 0,2 %. A los tubos se les agregó CuSO₄ 0,1 M. Los tubos se incubaron por 16 h a 37 °C con agitación, y se les determinó la DO₆₀₀ en el espectrofotómetro Genesys 6 (Thermo Spectronic). La MIC se definió como la concentración mínima de Cu que produce una inhibición del 50 % del crecimiento, respecto del cultivo sin Cu. Los resultados presentados tienen al menos triplicados.

3. Resultados

Los antecedentes confirman que el poliP es una molécula que participa en la resistencia a algunos metales pesados, sin embargo cómo es que realiza esta función no ha sido dilucidado. Se han planteado dos hipótesis, por un lado, que genera ATP, por otro lado, que libera Pi para formar un fosfato metálico. Para poder determinar si alguna de éstas es el mecanismo por el cual el poliP participa en la resistencia al Cu en *E. coli* se construyeron distintas cepas mutantes y se realizaron experimentos de resistencia al Cu.

3.1. Generación de cepas mutantes

Para realizar las mutaciones se utilizó la técnica de reemplazo génico por recombinación homóloga que describieron Datsenko y Wanner (2000). En esta técnica el gen o los genes a escindir se reemplazan por un DNA producto de PCR que contiene el gen que otorga la resistencia a kanamicina o cloramfenicol, flanqueado por unos sitios que luego permiten la recombinación sitio específica, de tal modo que en el genoma sólo queda una cicatriz después de eliminado el gen. Esta técnica no había sido utilizada por nuestro grupo, por lo tanto lo primero fue montar la técnica en el laboratorio.

Para ello, lo primero fue obtener los plásmidos necesarios para las reacciones de PCR y para las recombinaciones. Las cepas BW23474/pKD3 y BW23474/pKD4 fueron gentilmente donadas por el laboratorio de Microbiología (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile). Se realizaron las purificaciones plasmidiales y se comprobaron mediante la electroforesis en geles de agarosa. Adicionalmente se analizaron los patrones de digestión de los plásmidos con las enzimas *HindIII* y *PstI* (Figura 5). El perfil de restricción de los plásmidos fue el esperado, por lo tanto se ocuparon estas

purificaciones para realizar las reacciones de PCR para la recombinación homóloga del gen a mutar.

Por otro lado, los plásmidos pKD46 y pCP20 también fueron gentilmente donados por el laboratorio de Microbiología (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile). Las purificaciones se visualizaron en geles de agarosa y se realizaron análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, donde también se obtuvieron los perfiles de restricción esperados (Figura 5).

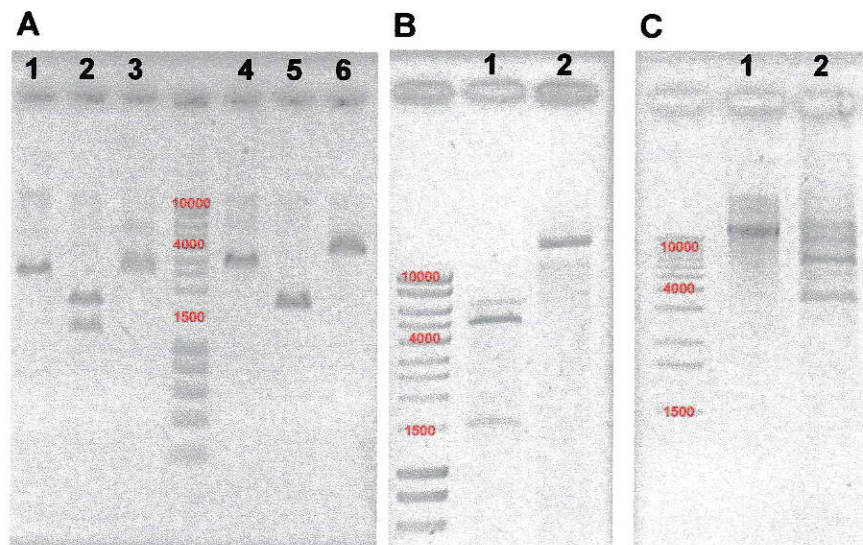


Figura 5 Obtención de los plásmidos pKD3, pKD4, pKD46 y pCP20. Geles de agarosa al 1 % para visualizar las purificaciones plasmidiales y los perfiles de restricción. Purificación plasmidial de pKD3 y pKD4, y el chequeo respectivo con la digestión enzimática. (A) en los carriles del 1-3 el plásmido pKD3 y del 4-6 el pKD4; en los carriles 1 y 4 el plásmido sin cortar, en los carriles 2 y 5 la digestión con *HindIII*, y en los carriles 3 y 6 la digestión con *PstI*. Purificación plasmidial de pKD46 (B), en el carril 1 la digestión del plásmido con *EcoRI*, y en el carril 2 el plásmido sin cortar. El plásmido pCP20 (C) se obtuvo (carril 1) y se chequeó con una digestión enzimática con *EcoRI* (carril 2). En rojo se muestra el valor en pares de bases de 3 bandas del marcador de peso molecular.

Las reacciones de PCR con los partidores de 60 nucleótidos presentados en la Tabla 3 se realizaron utilizando como molde de ADN los plásmidos pKD3 y pKD4. Los

amplificados que tuvieron como molde el plásmido pKD3 fueron de 1100 pb aproximadamente, mientras que los que utilizaron el pKD4 fueron de 1500 pb aproximadamente (Figura 6). Todos los carriles presentaron una segunda banda más tenue que la banda deseada y del doble de su tamaño, que no corresponde al plásmido utilizado como molde, y que aparece siempre en todas las condiciones donde ocurre la amplificación. Los productos de PCR se precipitaron, dializaron y utilizaron para transformar la cepa a mutar. Dicha cepa se encontraba previamente transformada con el plásmido pKD46, y con la expresión del la recombinasa Red inducida por el crecimiento en presencia de arabinosa.

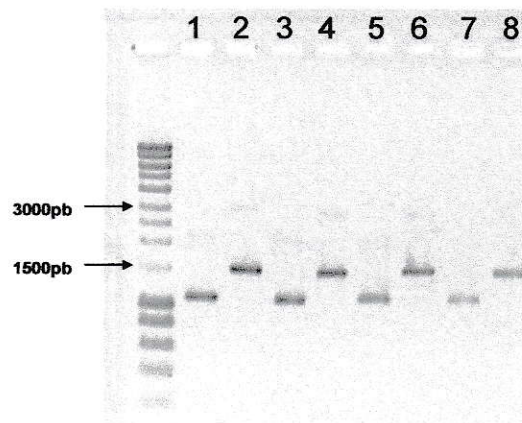


Figura 6. PCR con los plásmidos pKD3 y pKD4 como molde. En un gel de agarosa al 1 % se aplicaron 3 μ l del DNA proveniente de las reacciones de PCR realizadas para amplificar los cassettes de resistencia al cloramfenicol (carriles impares) y kanamicina (carriles pares), con los partidores presentados en la Tabla 3. El gel se tiñó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron con luz UV.

Con esta técnica se generaron las cepas $\Delta pitA$, $\Delta pitB$ y $\Delta copA$. Además la doble mutante del operón *ppk1-ppx*, que en adelante se llamará $\Delta poliP$. Además sobre ésta última se realizaron nuevas mutaciones, para generar las cepas: $\Delta poliP\Delta pitA$, $\Delta poliP\Delta pitB$, $\Delta poliP\Delta copA$, y $\Delta poliP\Delta pitA\Delta pitB$. Todas las cepas mutantes con las que se trabajó no contaban con resistencia a antibiótico, y era posible chequearlas

realizando una reacción de PCR. En la Figura 7 se muestran los amplificados de las cicatrices de las cepas con dos o más mutaciones.

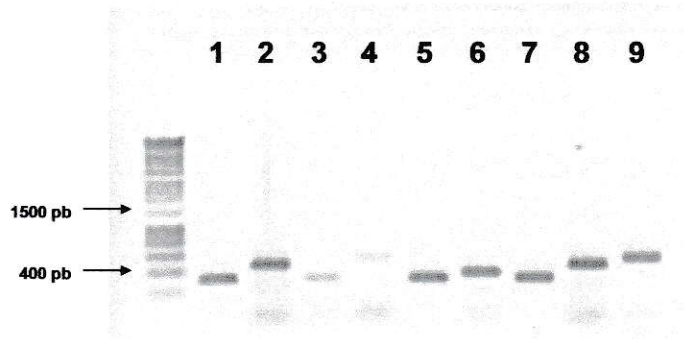


Figura 7. PCR de cicatrices genómicas luego de escindir los genes. Se realizó un PCR de colonia sobre las cepas mutantes utilizando los partidores de la Tabla 4. Carriles 1, 3, 5 y 7 corresponden a la cicatriz dejada por el operón *ppk1-ppx* presente en los dobles mutantes Δ poliP Δ *pitA*, Δ poliP Δ *pitB*, Δ poliP Δ *copA*, y Δ poliP Δ *pitA* Δ *pitB*, respectivamente. Los carriles 2 y 8 corresponden a la cicatriz del gen *pitA* de los mutantes Δ poliP Δ *pitA* y Δ poliP Δ *pitA* Δ *pitB*, respectivamente. Los carriles 4 y 9 corresponden a la cicatriz dejada del gen *pitB* en los mutantes Δ poliP Δ *pitB* y Δ poliP Δ *pitA* Δ *pitB*. Por último el carril 6 contiene la amplificación de la cicatriz del gen *copA* del doble mutante Δ poliP Δ *copA*.

La diferencia entre el tamaño del amplificado del gen *pitA* con el amplificado del mutante con la resistencia al cloramfenicol era muy pequeño (110 pb). Esto también ocurrió para el gen *pitB* (50 pb). En estos casos y para comprobar la eliminación del gen se realizaron geles de poliacrilamida al 5 %. Se analizaron 6 clones que posiblemente tenían la mutación para cada gen. Como se muestra en la Figura 8, los clones 1 y 6 de Δ *pitB* y los clones 1, 2 y 3 de Δ *pitA* evidenciaron un cambio en el tamaño del producto de PCR, y por lo tanto contienen la mutación. Se escogió el clon 1 de cada gen para seguir el procedimiento.

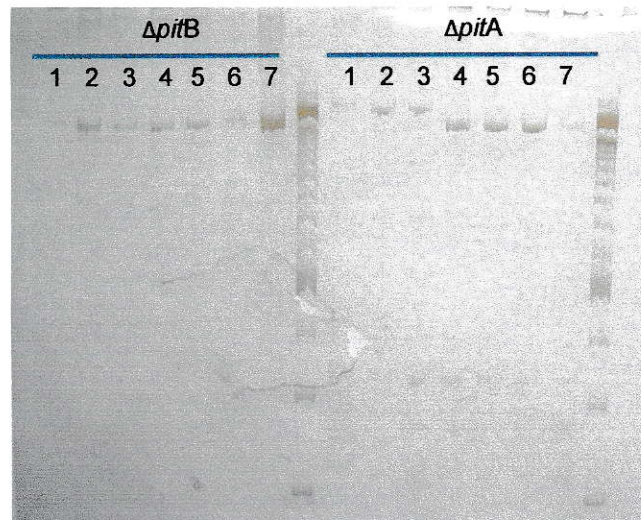


Figura 8. Electroforesis de poliacrilamida para determinar mutantes $\Delta pitA$ y $\Delta pitB$. Las muestras de DNA obtenidos por reacciones de PCR desde 6 colonias de los posibles mutantes se separaron mediante geles de poliacrilamida al 5 %, en TAE y se tiñeron con nitrato de plata. Los carriles del 1 al 6 corresponden las colonias en estudio, en el carril 7 de cada cepa está el amplificado del gen silvestre y en los carriles sin número el estándar de peso molecular 100 bp.

Una vez que se obtuvieron las mutantes que poseen resistencia a la kanamicina o a cloramfenicol se procedió a escindir el gen que otorga dicha resistencia. Para ello se transformó la cepa con el plásmido pCP20, que expresa la recombinasa FLP, para que ocurriera la recombinación sitio específica entre los sitios FRT. Luego estas cepas se incubaron a 45 °C, temperatura restrictiva para la replicación del plásmido. De esta manera se obtuvieron cepas que en lugar del gen presentan una cicatriz que consta de un sitio FRT y de aproximadamente 300 pb procedentes del plásmido pKD3 o del pKD4.

Los productos de PCR de las cicatrices de los mutantes se purificaron y se secuenciaron para confirmar que las mutaciones estuvieran correctas. Los resultados de la secuenciación confirmaron que las mutaciones realizadas se realizaron como se esperaba.

3.2. Observación al microscopio electrónico

Para observar posibles cambios en la morfología celular, se observaron al microscopio electrónico de transmisión las cepas K12 y Δ poliP (Figura 9). En la cepa silvestre se observaron prominentes flagelos, que no se observaron en la cepa Δ poliP. Adicionalmente se vio que las células de la cepa Δ poliP son más pequeñas que las de la cepa silvestre.

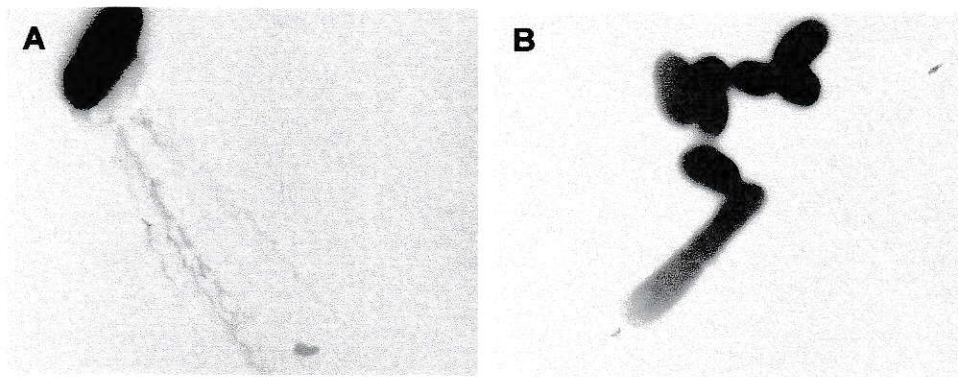


Figura 9. Visualización de las cepas K12 y Δ poliP al microscopio electrónico de transmisión. Células de cultivos en fase estacionaria de las cepas silvestre (A) y Δ poliP (B) se fotografiaron con una amplificación de 4200X. Las células se observaron sin tinción.

3.3. Estudio del crecimiento de las cepas

Para estudiar si las mutaciones realizadas afectaban el crecimiento de las cepas construidas, se realizaron curvas de crecimiento en el medio LB (Figura 10).

En este medio la DO_{600} de las cepas luego de las 24 h de crecimiento fue de 3,2 unidades en promedio (Figura 10). Las cepas alcanzaron una DO_{600} de entre 3 y 3,9 en la fase estacionaria del crecimiento, lo que da cuenta de una variación cercana a la unidad de DO_{600} . La mayoría de las cepas presentaron velocidades de crecimiento similares a la cepa silvestre. Sin embargo, la curva de crecimiento de la cepa

$\Delta\text{poliP}\Delta\text{pitA}\Delta\text{pitB}$ fue notoriamente diferente a las otras, ya que comienza con una velocidad de crecimiento similar a las otras cepas, pero alcanza en la fase estacionaria una DO_{600} equivalente al 50 % de la alcanzada por la cepa silvestre. Las cepas que con la mutación ΔpoliP (con excepción de la $\Delta\text{poliP}\Delta\text{pitA}\Delta\text{pitB}$) alcanzaron una DO_{600} en fase estacionaria mayor que las otras cepas.

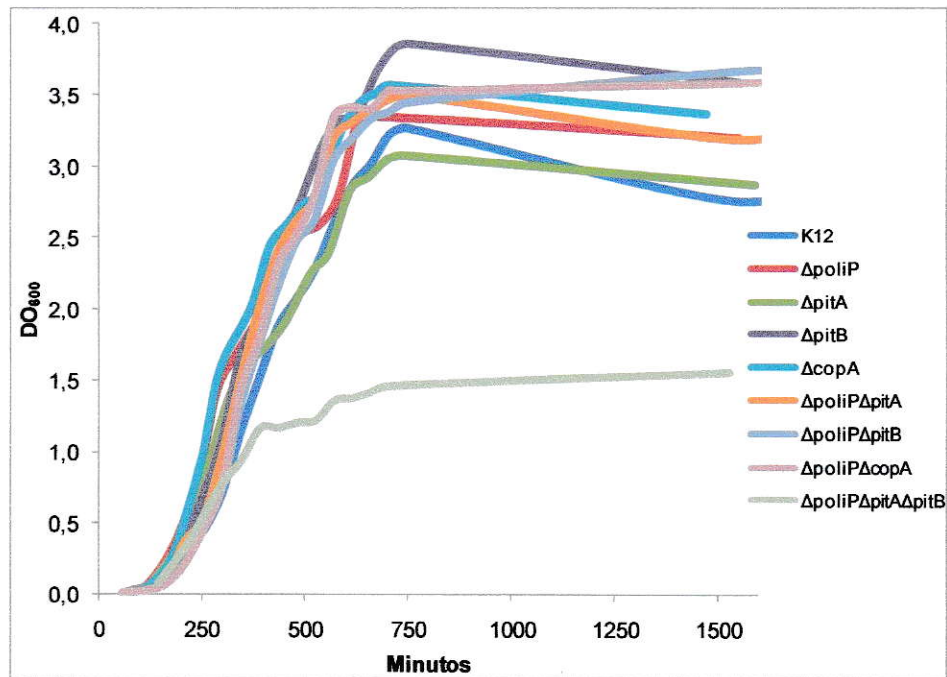


Figura 10. Curvas de crecimiento de las cepas en estudio en medio LB. Las cepas mutantes se crecieron a 37 °C con agitación de 150 rpm en medio LB a partir de un cultivo fresco de noche en proporción 1/500. Se siguió el crecimiento celular mediante la medición de la DO_{600} . Los experimentos se realizaron en triplicado y el promedio se muestra en la Figura.

3.4. Clonación del operón *ppk1-ppx*

Debido al tamaño del operón, la amplificación por PCR se realizó con una mezcla enzimática Elongase®, y no se pudo realizar con la enzima Taq polimerasa. Como se puede ver en la Figura 11, se obtuvo un alto rendimiento en la reacción de PCR. El

producto obtenido tiene el tamaño esperado, que es de 3500 pb, por lo tanto se ligaron al plásmido pBAD-TOPO y transformaron sobre células quimiocompetentes.

Las células transformantes se analizaron para comprobar la presencia del plásmido ligado con el operón *ppk1-ppx* (en adelante pBADpoliP) mediante una extracción de los ácidos nucleicos totales, y los clones seleccionados se analizaron para determinar la orientación del inserto por PCR de colonia. Se analizaron 63 clones, de ellos 11 contenían el producto de PCR en el plásmido, y 5 en la orientación correcta. En la Figura 12 se muestra el procedimiento: se muestra un gel con 22 clones a los que se les extrajeron los ácidos nucleicos totales, los 5 clones que presentaron la orientación correcta, y el aislamiento del plásmido de 2 de ellos.

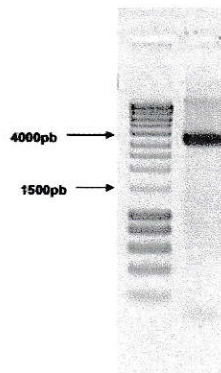


Figura 11. Amplificación del operón *ppk1-ppx* por PCR. El operón *ppk1-ppx* se amplificó con la mezcla enzimática Elongasa®. En el carril de la izquierda se muestra el estándar de peso molecular y a la derecha el operón con el tamaño esperado, de 3500 pb.

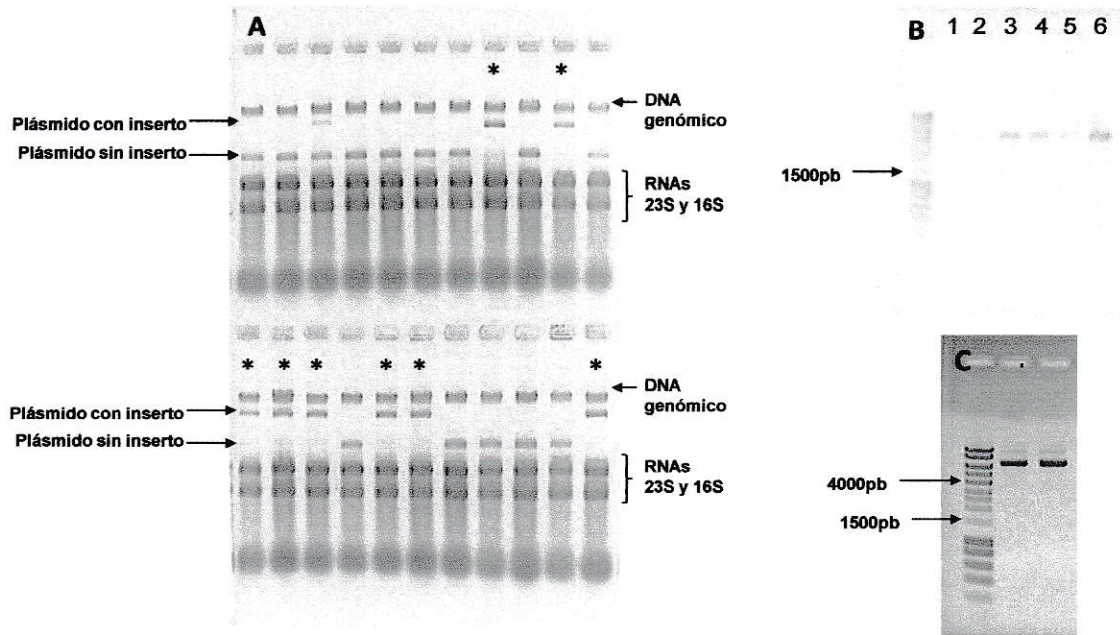


Figura 12. Procedimiento de clonación del operón *ppk1-ppx*. A las colonias obtenidas luego de la transformación con la ligación se les extrajeron los ácidos nucleicos totales para determinar los clones que contienen plásmidos que incorporaron el operón: con asterisco están marcados los carriles de los clones que presentaron un plásmido con el inserto (A). En B se muestran los 5 clones positivos (carriles 1-5) del PCR de colonia para determinar la orientación en que se insertó el operón *ppk1-ppx* en el plásmido, y el amplificado del operón desde el DNA genómico (carril 6). En C se muestra el DNA plasmidial de dos de los clones correctamente orientados.

3.5. Análisis de expresión de las proteínas

Para determinar si los clones obtenidos en la Figura 12 expresan correctamente las proteínas, se indujo la expresión en 4 de los clones seleccionados. Las células de los cultivos sin inducir e inducidos se colectaron y se obtuvieron muestras de las proteínas totales a las que se les realizó el ensayo de Western blot, utilizando el anticuerpo anti histidina como anticuerpo primario. Resulta posible determinar la expresión del operón mediante esta metodología debido a que el plásmido fusiona una cola de 6 histidinas, que en este caso queda en el C-terminal de la PPX.

El plásmido del clon 52 fue el único que se expresó en presencia del inductor (Figura 13). Este plásmido, que contiene el operón *ppk1-ppx*, se purificó y se transformó con él las cepas que tenían mutado el operón *ppk1-ppx* en el genoma

(Δ poliP, Δ poliP Δ pitA, Δ poliP Δ pitB, Δ poliP Δ copA, Δ poliP Δ pitA Δ pitB) y la cepa K12 como control.

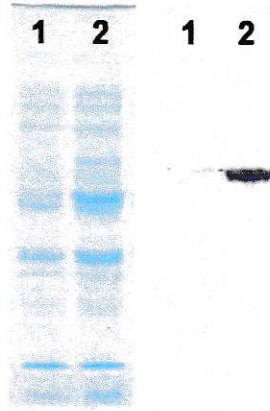


Figura 13. Análisis de expresión de los clones pBADpoliP. En la figura se muestra el clon correctamente orientado que presentó expresión del operón (clon 52). Todos los clones orientados se crecieron hasta DO_{600} 0,6 y luego se indujeron por 2 hr con arabinosa. Las células se colectaron y lisaron, y con las muestras de las proteínas totales se realizaron electroforesis de poliacrilamida y Western blot. A la izquierda se ve el gel de poliacrilamida al 10 % teñido con azul de Coomassie. A la derecha la membrana de Nitrocelulosa, que fue revelada empleando anticuerpos anti His y la reacción de la peroxidasa. Los carriles 1 contienen la muestra de proteínas totales obtenidas antes de agregar la arabinosa y los carriles 2 la muestra de proteínas totales de las células inducidas.

3.6. Determinación de la MIC

Para conocer cómo afecta el cobre a las células mutantes y recombinantes, se determinaron las MIC de las cepas mutantes sin plásmido (Figura 14) y con el pBADpoliP (Figura 15).

Como se puede ver en la Figura 14, las cepas que carecen del gen *copA* fueron las que presentaron una mayor disminución de la MIC. La cepa Δ poliP Δ pitA Δ pitB también presentó una disminución considerable, a diferencia de las cepas Δ poliP Δ pitA y Δ poliP Δ pitB.

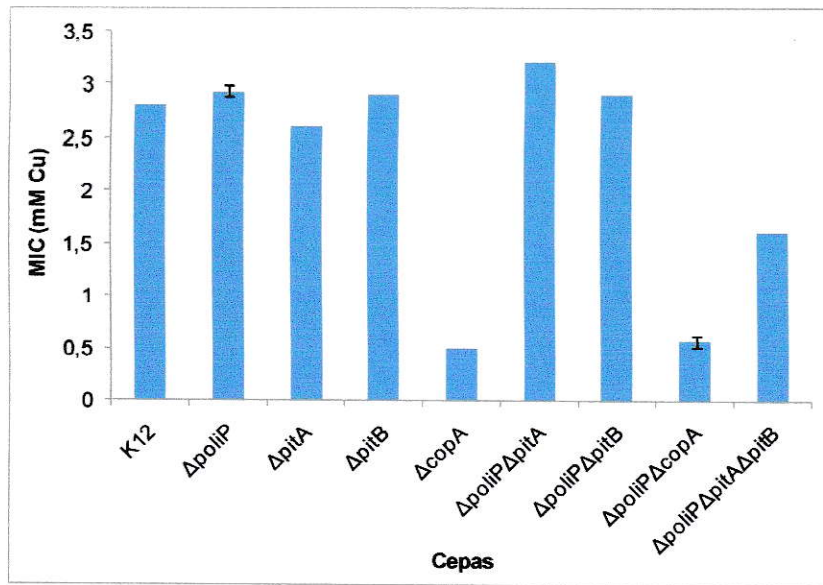


Figura 14. Valores de la MIC de las cepas mutantes. Las cepas se crecieron en medio LB con distintas concentraciones de Cu a 37 °C con agitación, y luego de 16 h se midió la DO_{600} de cada cultivo. En el eje vertical se muestra la concentración de Cu mínima que permite un 50 % del crecimiento respecto del cultivo sin Cu para cada cepa. Los experimentos se realizaron en triplicado.

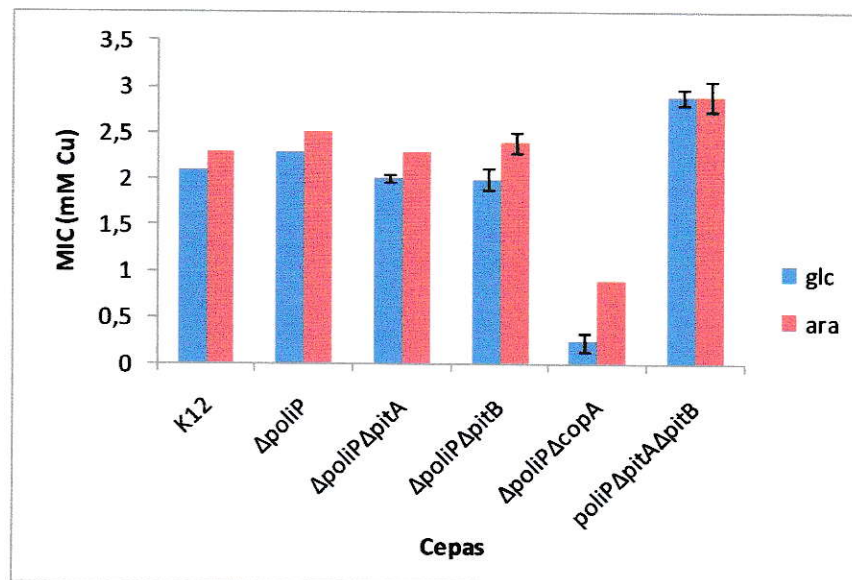


Figura 15. Valores de la MIC en cepas complementadas con el operón *ppk1-ppx*. Las cepas K12, $\Delta poliP$, $\Delta poliP \Delta pitA$, $\Delta poliP \Delta pitB$, $\Delta poliP \Delta copA$, y $\Delta poliP \Delta pitA \Delta pitB$ con el plásmido pBADpoliP se crecieron en medio LB en presencia de glucosa (glc) como represor, o de arabinosa (ara) como inductor con distintas concentraciones de Cu. A las 16 h se midió la DO_{600} y se determinó la concentración mínima de Cu que permite un 50 % del crecimiento respecto del cultivo sin Cu, para cada condición. Los experimentos se realizaron en triplicado.

La expresión del operón *ppk1-ppx* produjo un aumento de la MIC en la mayoría de las cepas. El aumento más importante de la MIC fue en la cepa Δ poliP Δ copA. La excepción fue la cepa Δ poliP Δ pitA Δ pitB, y para descartar que el plásmido no se estuviera expresando correctamente se realizó un Western blot con los cultivos utilizados para determinar la MIC. El resultado del Western blot demuestra que el operón se encuentra expresado, a altos niveles en presencia de arabinosa, y no se expresa en glucosa (Figura 16).

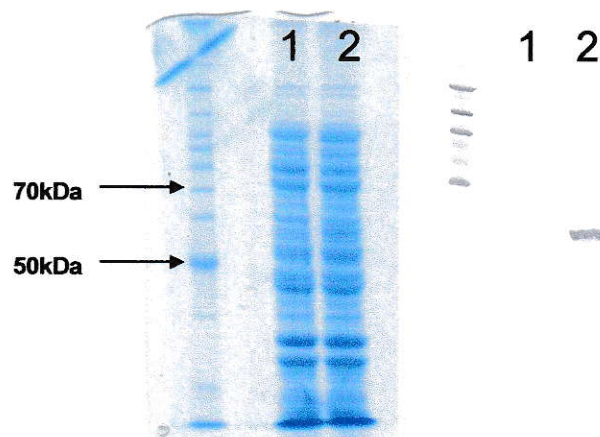


Figura 16. Análisis de expresión del plásmido pBADpoliP en cultivos con Cu. Se obtuvieron las proteínas totales de un cultivo que fue utilizado para determinar la MIC de la cepa Δ poliP Δ pitA Δ pitB, para realizar un Western blot. El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie, mientras que la membrana de nitrocelulosa se reveló con anticuerpos anti His y utilizando la reacción de la peroxidasa. En el gel (izquierda) y en la membrana (derecha) se muestran el estándar de peso molecular, junto a éste la muestra con glucosa (carril 1), y a la derecha la muestra con arabinosa (carril 2).

4. Discusión

El poliP es una molécula que se encuentra en todos los organismos y se ha visto que participa en una gran variedad de procesos celulares. Específicamente la participación del poliP en la resistencia al Cu se ha visto en múltiples organismos. En nuestro grupo lo hemos visto en las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Pseudomonas sp.* B4, y en la arquea *Sulfolobus metallicus*. Pero otros trabajos también han visto este fenómeno. Se ha descrito que cepas más resistentes al Cu tienen mayores niveles del poliP en el alga *Anabaena variabilis* (Hashemi y col., 1994). Sin embargo el mecanismo por el cual el poliP ejerce esta función ha sido una interrogante por mucho tiempo. Inicialmente se creía que sus propiedades químicas como polianión eran capaces por sí solas de quelar los metales en el citoplasma (Kornberg y col., 1999), pero con el uso de tecnologías de microscopía más avanzadas se ha visto que los metales no siempre colocalizan con los gránulos de poliP (Hashemi y col., 1994). Es por ello que se han planteado otros mecanismos, como el que planteó Keasling (1997) para la resistencia al cadmio. En esta tesis se realizaron mutantes y recombinantes para explorar si es posible este modelo en *E. coli* para el caso del Cu y para determinar cuál es el papel del poliP en este modelo.

4.1. Generación de las cepas mutantes y recombinantes.

Para el desarrollo de esta tesis se logró implementar en el laboratorio la técnica de mutaciones por recombinación homóloga mediante productos de PCR (Datsenko y Wanner, 1993). Para realizar las mutaciones se escogió la bacteria *E. coli* K12, debido a que no tiene mutaciones anteriores, considerando que se ha visto que las mutaciones de *relA* y *spot* (muy comunes en cepas de *E. coli* de laboratorio), afectan la regulación del Pi (Spira y Yagil, 1998).

Existen bibliotecas de mutantes en *E. coli*, donde se pueden adquirir cepas con mutaciones simples, sin embargo dichas mutaciones han sido construidas con la inserción de transposones. Debido a que en esta tesis se necesitaba realizar mutantes de varios genes, se decidió no utilizar estas cepas y construirlas en el laboratorio. De esta manera se obtuvieron cepas que no contienen resistencia a antibióticos, y que tienen el mismo fondo genético.

El principal problema para la construcción de los mutantes fue el medio de cultivo, ya que sólo fue posible obtener mutantes en medio LB cuando los reactivos eran marca Merck, y no con reactivos marca Difco (con la que se trabaja rutinariamente en el laboratorio). Fenómenos de este tipo, donde la marca del reactivo es importante, no son raros, y también han sido observados para otros experimentos en *Salmonella typhimurium* en el laboratorio de la Dra. Inés Contreras (comunicación personal).

Al visualizar los productos de los PCR amplificados con los partidores de 60 nucleótidos, se ve que hay una segunda banda que es más tenue y de mayor tamaño (Figura 6). Esta segunda banda migró en el doble del peso del fragmento esperado y no correspondía al plásmido que había sido usado como molde (no aparecía en el control negativo, sin enzima). No es claro a qué corresponde dicha banda, pero por su tamaño pareciera que fuera la migración de la unión de dos productos de PCR.

Los plásmidos pKD46 y pCP20 son termosensibles, por lo tanto para curar las cepas de los plásmidos se incubaron las cepas a 45 °C, ya que a 42 °C (como lo indica el protocolo original) aún se encontraron cepas que mantenían el vector (datos no mostrados).

La comprobación de la recombinación homóloga de los genes se realizó rutinariamente mediante una reacción de PCR, y se comparó el tamaño del amplificado con el del gen de interés en un gel de agarosa al 1 %. Sin embargo, el tamaño del gen *pitA* y del gen *pitB* y del reemplazo génico por el cassette que otorga resistencia a

cloramfenicol son muy similares: 120 pb y 50 pb respectivamente. Estas diferencias en los fragmentos mayores de 1000 pb no es posible visualizarlas en los geles de agarosa. Por lo tanto, para esta diferenciación fue necesario separar los productos de PCR en un gel que permitiera una mayor resolución, y para ello se utilizaron geles de poliacrilamida al 5 %. Esta metodología permite la diferenciación de fragmentos con menores diferencias de tamaños y fue desarrollada en el laboratorio de la Dra. Margarita Caru.

Se optó por utilizar el gen *copA* como blanco para realizar las mutaciones dentro de los determinantes de resistencia al Cu. En primer lugar, porque el efecto que produce su ausencia en la célula es fácilmente detectable en condiciones aeróbicas (Outten y col., 2001). Adicionalmente, es interesante porque es una ATPasa (Rensing y col., 1999), lo que permite analizar la posibilidad de que el poliP actúe como una fuente de ATP (Figura 3).

Luego que se obtuvo la primera ronda de mutantes, se procedió a realizar los dobles mutantes. Para ello era necesario transformar la cepa mutante con los plásmidos que permiten las recombinaciones. Probablemente debido a las mutaciones anteriores, la eficiencia de la transformación de estas cepas con el plásmido pKD46 o el pCP20 fue siempre menor. La cepa Δ poliP fue la cepa que se utilizó como fondo genético para realizar sobre ella las otras mutaciones en la construcción de las cepas Δ poliP Δ *pitA*, Δ poliP Δ *pitB*, Δ poliP Δ *copA*, y Δ poliP Δ *pitA* Δ *pitB*. La elección se justificó en que la eficiencia de esta mutación fue considerablemente menor que la de los otros genes, posiblemente debido al mayor tamaño que necesita para la recombinación, y en que todas las cepas con más de una mutación contienen la mutación del operón *ppk1-ppx*.

Para expresar reguladamente el operón *ppk1-ppx* se utilizó el plásmido inducible pBAD-TOPO. Este plásmido es de bajo número de copias, y de una expresión baja, de manera que no se formen cuerpos de inclusión. Es por esto que la expresión no es

posible visualizarla en un gel de poliacrilamida de las proteínas totales, sino que se requiere de la técnica de Western blot. La determinación de la expresión del operón fue posible gracias a que el plásmido contiene la secuencia que codifica las 6 histidinas, que se incorpora en el C-terminal de la proteína. De esta forma, la expresión del operón se siguió por la expresión de la proteína PPX, que por estar río debajo de la PPK1, es la que queda con la fusión de la cola de 6 histidinas. Otros trabajos han clonado la PPX insertándole una cola de histidinas, y se ha visto que la actividad enzimática se mantiene en dicha fusión (Chávez y col., 2009).

4.2. Caracterización de las cepas construidas

Fue posible observar al microscopio electrónico de transmisión las cepas K12 y Δ poliP. Las muestras se observaron sin tinción, y en las células de la cepa K12 se visualizaron flagelos prominentes, que no fueron identificados en la cepa Δ poliP. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que han visto que las bacterias que carecen de poliP no son móviles, aunque algunas sí poseen flagelo (Chávez y col., 2009; Rao y col., 2009; Rashid y col., 2000; Rashid y Kornberg, 2000).

Para determinar si alguna de las cepas presentaba diferencias en el crecimiento debido a las mutaciones, se realizaron curvas de crecimiento en medio complejo. Todas las cepas crecieron, y aunque algunas presentaron diferencias en el crecimiento, la mayoría no presentó variación significativa de la tasa de crecimiento, como ya se había visto para algunos de los mutantes (Crooke y col., 1994). En general, se evidenció que las cepas que contienen la mutación Δ poliP alcanzaron densidades ópticas mayores.

La cepa Δ poliP Δ pitA Δ pitB evidenció dificultades en el inicio del crecimiento en medio LB. Esto podría deberse a que en ausencia de los dos transportadores Pit, la

captación del fosfato (que en el medio LB es principalmente organofosfato) ocurriría mediante los transportadores GlpT y UhpT. Los sistemas de captación de organofosfatos son menos eficientes que el sistema Pst (van Veen, 1997), lo que podría dar cuenta de la diferencia de crecimiento.

4.3. El modelo de Keasling para la resistencia al Cu

En su modelo, Keasling propuso que el transportador Pit podría transportar los metales pesados, y el primer apoyo a esto lo aporta el trabajo de Beard y colaboradores (2000), que encontraron que la mutante *pitA* es más resistente al Zn (con una diferencia en la MIC de 0,5 mM). Adicionalmente se evidenció una disminución de los niveles de Zn intracelulares en el mutante *pitA* (Beard y col., 2000). Estos resultados sugieren que el Zn entra normalmente a la célula por PitA, y plantea la interrogante de si esto ocurre con otros metales pesados. Actualmente no se conoce cómo ingresa el Cu (y otros metales más) a la bacteria; no se ha encontrado un transportador específico que tenga esta función, y por lo tanto es posible pensar que entre a la célula mediante los transportadores de este tipo. Existen muy pocos organismos donde se ha encontrado un transportador específico para la captación del Cu, entre ellos están la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Dancis y col., 1994), y la bacteria *Enterococcus hirae* (Solioz y Stoyanov, 2003). Sin embargo no se ha encontrado ninguna proteína que cumpla esta función en *E. coli* y en muchas otras bacterias.

Por otro lado, el descubrimiento que en *E. coli* el gen *pitA*, que no está regulado por la concentración de Pi, sí responde a la concentración de Zn, siendo regulado positivamente por éste (Jackson y col., 2008), plantea una revisión de este transportador. ¿Será que el transporte de metales es una consecuencia del transporte

del Pi?, o por el contrario ¿será que el transporte del Pi es una consecuencia del transporte de los metales?, es una pregunta que por ahora no tiene respuesta.

Se había planteado que el poliP podía participar en la resistencia al Cu como fuente energética, a través de la conversión del poliP a ATP (Kornberg y col., 1999). Este ATP podría ayudar a la resistencia del Cu energizando a los sistemas de transporte primario que sacan el Cu del citoplasma de la célula. Para analizar esta posibilidad se realizaron los mutantes en el gen *copA*. La cepa $\Delta copA$ fue la cepa que presentó la mayor disminución de la MIC: 0,5 mM respecto 2,8 mM de la cepa K12. Esto está en acuerdo con los antecedentes bibliográficos, que señalan que CopA es la proteína de *E. coli* más importante para sobrevivir en presencia de altas concentraciones del Cu en el medio (Outten y col., 2001). Adicionalmente se construyó una cepa que además de *copA* carecía del operón *ppk1-ppx*, $\Delta poliP\Delta copA$. Esta cepa no fue más sensible a Cu que la cepa $\Delta copA$ (Figura 14). Al transformar la cepa $\Delta poliP\Delta copA$ con el plásmido pBADpoliP, sin embargo es posible ver que cuando se expresa el operón aumentó la resistencia al Cu, el cual fue el aumento más importante entre todas las cepas transformadas (ver Figura 15). El aumento considerable de la MIC sugiere que el mecanismo de acción del poliP en la resistencia al Cu no necesita de CopA. CopA es la única proteína conocida que participa en la resistencia del Cu en *E. coli* que utiliza ATP. Los resultados obtenidos descartan que en esta bacteria la forma de acción del poliP sea mediante la generación de energía (ya sea por producción de ATP o que sea usado como sustituto del ATP) para ser usado por esta proteína.

La posibilidad que el poliP sea una fuente de ATP para realizar algunas funciones celulares ha sido planteada por muchos autores. Uno de los estudios que apoya esta teoría es el que encontró gránulos de poliP en la base del flagelo de *Helicobacter pylori*, lo que sugiere que este polímero estaría energizando el flagelo en esa bacteria (Rao y col., 2009). Debido a que los mutantes *ppk1* en las distintas bacterias no son

móviles se ha propuesto que la carencia del poliP en la célula afecta la motilidad por carencia energética. Sin embargo, también se ha planteado que la falta de motilidad se debe a que las estructuras flagelares no sostienen el movimiento. Recientemente nuestro grupo encontró por proteómica diferencial en *Pseudomonas sp.* B4 (Varela y col., 2010) y por microarreglos de DNA de *E. coli* (resultados no publicados) que las cepas que tienen afectados los niveles de poliP tienen significativamente disminuidos los niveles de la flagelina, proteína que constituye fundamentalmente el flagelo. Estos resultados sugieren que la falta de motilidad se debería a un problema de regulación más central, por sobre una energización directa del poliP al flagelo.

En esta misma dirección, se ha planteado que los poliP pueden ser un reservorio energético para la célula, sin embargo en estudios que se han enfocado en la acumulación de poliP en la fase estacionaria de *E. coli*, se ha determinado que aunque los niveles del poliP sean muy elevados servirían sólo para reemplazar al ATP por 1 ó 2 seg (Rao y col., 1998). Por lo tanto la propuesta energética no parece posible, al menos en bacterias como *E. coli* que acumulan bajos niveles de poliP.

El modelo propuesto por Keasling (1997) para la resistencia a los metales pesados, postula que el metal sale como MeHPO_4 a través del sistema Pit. Actualmente se sabe que existen dos genes parálogos *pit* en el genoma de *E. coli*: *pitA* y *pitB*, y ambos son capaces de transportar el fosfato metálico. Para evaluar esta posibilidad se construyeron las cepas mutantes. Las cepas $\Delta pitA$ y $\Delta pitB$ no presentaron mayor sensibilidad al Cu, lo que se repitió en las cepas $\Delta poliP \Delta pitA$ y $\Delta poliP \Delta pitB$. Esto planteaba dos posibilidades, por un lado que los transportadores no tenían una participación en la resistencia al metal, o que la ausencia de uno era compensada por la presencia del otro. Para explorar esta posibilidad se construyó una cepa que careciera de los dos transportadores. La cepa múltiple mutante $\Delta poliP \Delta pitA \Delta pitB$ presentó una notoria disminución de la MIC, lo que sugería que la presencia de estos

transportadores era importante para resistir al Cu. Cuando en esta cepa se expresó el operón *ppk-ppx* en trans no se observó una diferencia respecto de la cepa que tenía reprimida la expresión. Se descartó que esto último se debiera a problemas en la expresión del plásmido, ya que el análisis de la expresión realizado mostraba claramente que el producto proteico se encontraba expresado en las condiciones esperadas y en altos niveles. Además se descartó el efecto de alguna mutación en la secuencia del plásmido ya que éste se secuenció y no se detectaron errores. Estos resultados sugieren fuertemente que los poliP requieren de al menos uno de los transportadores Pit para ejercer un efecto sobre la resistencia al Cu. Es importante hacer la mención que si bien el poliP tiene una función protectora frente al metal, en la bacteria *E. coli* es muy pequeña. Esto posiblemente debido a que en esta bacteria no acumula grandes cantidades del polímero. De hecho, un estudio de microarreglos de DNA de *E. coli* frente a distintas concentraciones de Cu no mostró inducido el operón *ppk1-ppx* (Kershaw y col., 2005).

Los resultados de esta tesis apoyan el modelo de Keasling como la forma en que los poliP ayudan a la resistencia al Cu en la bacteria *E. coli*. Queda aún por confirmar la formación del complejo CuHPO_4 , y que éste sea expulsado de la célula.

5. Conclusión

- En *E. coli* la resistencia al Cu que otorga el poliP requiere de al menos uno de los sistemas Pit, lo que apoya el Modelo de Keasling como el mecanismo por el cual el poliP protege a la célula frente al metal.

6. Bibliografía

- Ahn K. y Kornberg A.** 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **265**:11734-11739.
- Aiking H., Stijnman A., van Garderen C., van Heerikhuizen H., y van 't Riet J.** 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol. **47**:374-377.
- Akiyama M., Crooke E., y Kornberg A.** 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **268**:633-639.
- Alvarez S., y Jerez C.A.** 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. **70**:5177-5182.
- Beard S.J., Hashim R., Wu G., Binet M.R.B., Hughes M.N., y Poole R.K.** 2000. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **184**:231-235.
- Chávez F.P., Mauriaca C., y Jerez C.A.** 2009. Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria. BMC Res. Notes **2**:50.
- Cherepanov P.P., y Wackernagel W.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. Gene **158**:9-14.
- Crooke E., Akiyama M., Rao N.N., y Kornberg A.** 1994. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **269**:6290-6295.
- Dancis A., Haile D., Yuan D.S., y Klausner R.D.** 1994. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). J. Biol. Chem. **269**:25660-25667.
- 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. **97**:6640-6645.

- Finney L.A., y O'Halloran T.V.** 2003. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* **300**:931-936.
- Grass G., y Rensing C.** 2001a. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2145-2147.
- Grass G., y Rensing C.** 2001b. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**:902-908.
- Harris R.M., Webb D.C., Howitt S.M., y Cox G.B.** 2001. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:5008-5014.
- Hashemi F., Leppard G.G., y Kushner D.J.** 1994. Copper resistance in *Anabaena variabilis*: effects of phosphate nutrition and polyphosphate bodies. *Microb. Ecol.* **27**:159-176.
- Hayashi S., Koch J.P., y Lin E.C.C.** 1964. Active transport of L- α -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**:3098-3105.
- Hoffer S.M., Schoondermark P., van Veen H.W., y Tommassen J.** 2001. Activation by gene amplification of *pitB*, encoding a third phosphate transporter of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **183**:4659-4663.
- Hoffer S.M., y Tommassen J.** 2001. The phosphate-binding protein of *Escherichia coli* is not essential for Pi-regulated expression of the *pho* regulon. *J. Bacteriol.* **183**:5768-5771.
- Jackson R.J., Binet M.R.B., Lee L.J., Ma R., Graham A.I., McLeod C.W., y Poole R.K.** 2008. Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. *FEMS Microbiol. Lett.* **289**:219-224.
- Keasling J.D.** 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **829**:242-249.
- Keasling J.D., y Hupf G.A.** 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:743-746.

- Keasling J.D., Bertsch L., y Kornberg A.** 1993. Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**:7029-7033.
- Kershaw C.J., Brown N.L., Constantinidou C., Patel M.D., y Hobman J.L.** 2005. The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. Microbiology **151**:1187-1198.
- Keyhani S., Lopez J.L., Clark D.S., Keasling J.D.** 1996. Effect of polyphosphate on cadmium tolerance in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. Microbios **82**:105-1114.
- Kornberg A. Rao N.N., y Ault-Riché D.** 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu. Rev. Biochem. **68**:89-125.
- Kornberg A.** 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. J. Bacteriol. **177**:491-496.
- Kuroda A., y Ohtake H.** 2000. Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. Biochem. (Mosc). **65**:362-367.
- Larson T.J., Ye S., Weinszenborn D.L., Hoffmann H.J., y Schweizer H.** 1987. Purification and characterization of the repressor for the *sn*-glycerol-3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **262**:15869-15874.
- Loftin I., Franke S., Roberts S., Wiechsel A., Héroux A., Montfort W., Rensing C., y McEvoy M.** 2005. A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. Biochemistry **44**: 10533- 10540.
- Navarro C.A., Orellana L.H., Mauriaca C., y Jerez C.A.** 2009. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. Appl. Environ. Microbiol. **65**:6102-6109.

- Nesmeyanova M.A.** 2000. Polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochem. (Mosc)*. **65**:309-314.
- Outten F.W., Huffman D.L., Hale J., y O'Halloran T.V.** 2001. The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **276**:30670-30677.
- Rao N.N, Gómez-García M.R., y Kornberg A.** 2009. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:605-647.
- Rao N.N., Liu S. y Kornberg A.** 1998. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* **180**:2186-2193.
- Rashid M.H., Rao N.N., y Kornberg A.** 2000. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* **182**: 225-227.
- Rashid M.H, y Kornberg A.** 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:4885-4890.
- Reizer J., Reizer A., Saier M.H., Bork P., y Sander C.** 1993. Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belongs to the sugar kinase/actin/hsp 70 superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **18**:247-248.
- Remonsellez F., Orell A., Jerez C.A.** 2006. Copper tolerance in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology* **152**:59-66.
- Rensing C., y Grass G.** 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Lett.* **27**:197-213.
- Rensing C., Fan B., Sharma R., Mitra B., y Rosen B.P.** 1999. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:652-656.
- Rosenberg H., Gerdes R.G., y Harold F.M.** 1979. Energy coupling to the transport of inorganic phosphate in *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **178**:133-137.

- Sharfstein S.T., van Dien S.J., y Keasling J.D.** 1996. Modulation of the phosphate-starvation response in *Escherichia coli* by genetic manipulation of the polyphosphate pathways. *Biotechnol. Bioeng.* **51**:434-438.
- Spira B., y Yagil E.** 1998. The relation between ppGpp and the *pho* regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **257**:469-477
- Solioz M., y Stoyanov J.V.** 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:183-195.
- Valko M., Morris H., y Cronin M.T.D.** 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**:1161-1208.
- Van Dien S.J, Keyhani S., Yang C., y Keasling J.D.** 1997. Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1689-1695.
- van Veen H.W., Abee T., Kortstee G.J.J., Konings W.N., y Zehnder A.J.B.** 1994. Translocation of metal phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**:1766-1770.
- van Veen H.W.** 1997. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**:299-315.
- Varela C., Mauriaca C., Paradela A., Albar J.P., Jerez C.A., y Chávez F.P.** 2010. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol.* **10**:7.
- Wanner B.L.** 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**:47-54.
- Willisky G.R., Bennett R.L., y Malmay M.H.** 1973. Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*: involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *J. Bacteriol.* **113**:529-539.

Winkler H.H. 1966. A hexose-phosphate transport system in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **117**:231-240.

Zhang H., Ishige K., y Kornberg A. 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**:16678-16683.