



**EFFECTO DE COBRE Y CADMIO EN EL METABOLISMO
DE LOS POLIFOSFATOS Y EN LA EXPRESIÓN GLOBAL
DE PROTEÍNAS EN EL ARQUEÓN *SULFOLOBUS*
*METALLICUS***

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

FRANCISCO REMONSELLEZ FUENTES

Mayo del 2008

Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez

UCH-FC
DOC-Microbiología
R389
C.I

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO



Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

FRANCISCO REMONSELLEZ FUENTES

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Marzo de 2008.

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized 'C' and 'J' followed by 'erez', positioned above a dotted line.

Comisión de evaluación de Tesis

Dr. Margarita Carú

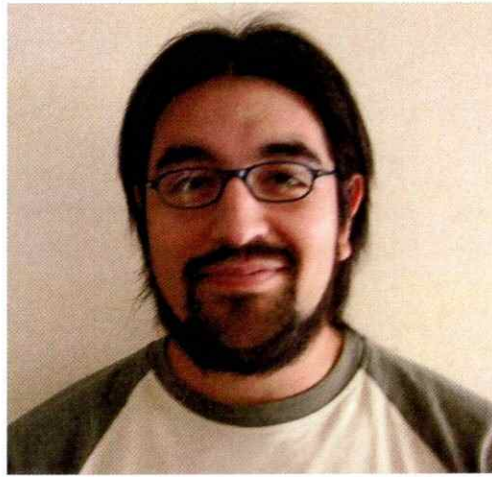
A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M Carú', positioned above a dotted line.

Dr. Davor Cotoras

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Davor Cotoras', positioned above a dotted line.

Dr. Claudio Vásquez

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Claudio Vásquez', positioned above a dotted line.



Nací en Santiago de Chile el 22 de Junio de 1976. La primera parte de mi educación básica la realicé en colegio Instituto América, un pequeño colegio particular subvencionado de la comuna de Maipú. La segunda parte de mi enseñanza básica y toda mi enseñanza media la realicé en el primer foco de luz de la nación: el Instituto Nacional General José Miguel Carrera. En el año 1995, con el fin de estudiar alguna carrera relacionada con el área biológica no tradicional, entré a la carrera de “Biotecnología” en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Luego de los altos y bajos que significan ser parte de la primera generación de una carrera nueva, incluyendo su cambio de nombre, obtuve el grado de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología el año 2000. Un año antes realicé una unidad de investigación en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias, en donde comencé a trabajar por primera vez con microorganismos termoacidófilos aislados desde fuentes hidrotermales. Hasta mediados del año 2006 me desarrollé como científico en el mismo laboratorio realizando mi Tesis de Pregrado y Tesis de Doctorado. Durante este tiempo obtuve una formación científica fuerte en microorganismos acidófilos que son actualmente utilizados en Biominería. Desde septiembre del año 2006 trabajo como investigador en el Centro de Biotecnología, de la Universidad Católica del Norte en la ciudad de Antofagasta, con el fin de aplicar el conocimiento científico y biotecnológico adquirido al monitoreo, control y mejora de procesos industriales de biolixiviación de minerales.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este complejo proceso deseo agradecer a:

Al Dr. Carlos Jerez por haber permitido desarrollarme y crecer en un ambiente científico y personal en su laboratorio.

Al Dr. Nicolás Guiliani por su amistad, apoyo y consejos entregados durante esta Tesis, especialmente en los momentos difíciles.

A Juan Araos por su incondicional ayuda en el desarrollo de esta Tesis y por generar un ambiente óptimo de trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Mario Vera, Francisco Chávez, Sergio Álvarez, Álvaro Orell, Felipe Gordillo, Mauricio Acosta, Lissette Valenzuela, Simón Beard, Claudio Navarro, Susana Valenzuela, Fernando Pagliai, José Ponce, Alex González, Matías Castro, Pilar Cortés, Álvaro Banderas, Lina Ruiz y Andrés Villa, por su apoyo, amistad, discusiones y los buenos momentos compartidos durante este proceso.

A CONICYT y al Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile.

A mi familia, Nelly, María, Pablo, Adriana, Emma y Ramón, por su incondicional apoyo.

A la Dr. Cecilia Demergasso por apoyar y facilitar el término de este proceso en buena forma.

En especial quiero dedicar esta Tesis a mi esposa Marly, por su gran amor, comprensión, incentivo y ayuda entregados durante todo este proceso y en especial en los momentos difíciles vividos debido a la falta de financiamiento.



INDICE DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xviii
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El dominio <i>Archaea</i>	1
1.1.1 Existencia del dominio <i>Archaea</i>	1
1.1.2 Características del dominio <i>Archaea</i>	2
1.2 El género <i>Sulfolobus</i>.....	3
1.2.1 Características del género <i>Sulfolobus</i>	3
1.2.2 <i>Sulfolobus metallicus</i> y su utilización en biominería.....	4
1.3 Polifosfatos inorgánicos	6
1.3.1 Características de los polifosfatos inorgánicos	6
1.3.2 Metabolismo de los poliP	7
1.3.2.1 Metabolismo de los poliP en bacterias	7
1.3.2.2 Metabolismo de los poliP en eucariontes	8
1.3.2.3 Metabolismo de los poliP en arqueas	9
1.3.3 Funciones de los poliP.....	10
1.3.4 PoliP y su relación con la tolerancia metales pesados	11
1.4 Mecanismos de respuesta a metales pesados en bacterias.....	14



1.5	Mecanismos de respuesta a metales pesados en bacterias extremófilas utilizadas en biominería.....	16
1.5.1	Características ambientales en los procesos de biolixiviación.....	16
1.5.2	Tolerancia a metales pesados en la bacteria acidófila <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	17
1.6	Tolerancia a metales pesados en arqueas acidófilas	18
1.6.1	Mecanismos de resistencia a cobre en arqueas acidófilas.....	19
1.6.2	Mecanismos de resistencia a otros metales en arqueas acidófilas	23
2.0	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
2.1	Cepas, medios y condiciones de cultivo	26
2.1.1	Cepas del género <i>Sulfolobus</i>	26
2.1.2	Cepas bacterianas	26
2.1.3	Medios y condiciones de cultivo.....	26
2.1.3.1	Medios y condiciones de cultivo para <i>S. metallicus</i> , <i>S. acidocaldarius</i> y <i>S. solfataricus</i>	26
2.1.3.2	Condiciones de cultivo para los ensayos con metales pesados en <i>S. metallicus</i> y <i>S. solfataricus</i>	27
2.1.3.3	Medios y condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	28
2.2	Síntesis y purificación de poliP <i>in vitro</i>	29
2.2.1	Síntesis <i>in vitro</i> de [γ -P ³³]poliP ₇₅₀ catalizada por la PPK recombinante de <i>E. coli</i>	29
2.2.2	Purificación de [γ -P ³³]poliP ₇₅₀ sintetizado <i>in vitro</i>	29
2.2.3	Análisis del [γ -P ³³]poliP ₇₅₀ sintetizado <i>in vitro</i>	30
2.3	Métodos de extracción y cuantificación de poliP.....	30
2.3.1	Extracción de poliP endógeno de <i>S. metallicus</i> , <i>S. acidocaldarius</i> y <i>S. solfataricus</i>	30
2.3.2	Purificación de la PPK recombinante de <i>E. coli</i>	31
2.3.3	Cuantificación de los poliP	32



2.4	Determinación de la actividad degradadora de los poliP (tipo PPX) y análisis de los productos de la reacción	33
2.4.1	Determinación de la actividad degradadora de los poliP (tipo PPX).....	33
2.4.2	Obtención de [P ³³] ortofosfato para calibrar la medición de la actividad degradadora de poliP (tipo PPX).....	33
2.5	Fraccionamientos celulares	34
2.5.1	Preparación de extractos crudos de <i>S. metallicus</i> para la determinación de la actividad degradadora de poliP (tipo PPX)	34
2.5.2	Preparación de extractos crudos de <i>S. metallicus</i> para electroforesis bidimensional de proteínas.....	35
2.5.3	Obtención de fracción de membranas totales de <i>S. metallicus</i>	35
2.6	Determinación del eflujo de Pi en <i>S. metallicus</i>	36
2.6.1	Marcación <i>in vivo</i> de <i>S. metallicus</i> con H ₃ ³² PO ₄	36
2.6.2	Determinación del eflujo de Pi.....	36
2.6.3	Visualización de especies de fosfato marcadas con ³² Pi.....	37
2.7	Determinación de la captación de cobre en <i>S. metallicus</i>	37
2.7.1	Marcación <i>in vivo</i> de <i>S. metallicus</i> con ⁶⁴ Cu.....	37
2.7.2	Determinación de la captación de cobre	37
2.8	Técnicas de microscopía	38
2.8.1	Microscopía electrónica de transmisión.....	38
2.8.2	Espectroscopía de pérdida de energía del electrón (EELS).	38
2.9	Métodos de análisis de proteínas	39
2.9.1	Determinación cuantitativa de proteínas	39
2.9.2	Electroforesis bidimensional de proteínas (Electroforesis 2D).....	39
2.9.2.1	<i>Preparación de la muestra para el isoelectroenfoque (IEF)</i>	39
2.9.2.2	<i>Isoelectroenfoque (Primera Dimensión)</i>	40
2.9.2.3	<i>Equilibrio de los geles inmovilizados ReadyStrip IPG</i>	40
2.9.2.4	<i>SDS-PAGE (Segunda Dimensión)</i>	41
2.9.2.5	<i>Tinciones de los geles bidimensionales</i>	41

2.9.2.6	<i>Identificación, selección y secuenciación de proteínas por espectrometría de masas</i>	43
3.0	RESULTADOS	45
3.1	Metabolismo de los poliP en <i>S. metallicus</i>	45
3.1.1	Los poliP inorgánicos en <i>S. metallicus</i>	45
3.1.1.1	<i>Observación microscópica de los gránulos de poliP en microorganismos del género Sulfolobus</i>	45
3.1.1.2	<i>Análisis de los gránulos en microorganismos del género Sulfolobus</i>	45
3.1.1.3	<i>Análisis cuantitativo de los poliP en microorganismos del género Sulfolobus</i>	47
3.1.1.4	<i>Actividad degradadora de poliP en <i>S. metallicus</i></i>	49
3.2	Relación entre la tolerancia a metales pesados y el metabolismo de poliP en <i>S. metallicus</i>	51
3.2.1	Relación entre la tolerancia a cobre y el metabolismo de los poliP en <i>S. metallicus</i>	52
3.2.1.1	<i>Efecto de CuSO₄ en el crecimiento de <i>S. metallicus</i></i>	52
3.2.1.2	<i>Efecto de CuSO₄ en los niveles de poliP en <i>S. metallicus</i></i>	54
3.2.1.3	<i>Niveles de poliP en células de <i>S. metallicus</i> transferidas a un medio con CuSO₄</i>	56
3.2.1.4	<i>Actividad tipo PPX en células de <i>S. metallicus</i> transferidas a un medio con CuSO₄</i>	57
3.2.1.5	<i>Actividad tipo PPX en extractos libres de células después de la adición de diferentes concentraciones de metales</i>	59
3.2.1.6	<i>Efecto del cobre sobre el eflujo de Pi desde células de <i>S. metallicus</i></i>	61
3.2.1.7	<i>Marcación y captación de cobre en células de <i>S. metallicus</i></i>	62
3.2.2	Relación entre la tolerancia a cadmio y el metabolismo de los poliP en <i>S. metallicus</i>	63
3.2.2.1	<i>Efecto de CdSO₄ en el crecimiento de <i>S. metallicus</i></i>	63
3.2.2.2	<i>Efecto de CdSO₄ en los niveles de poliP en <i>S. metallicus</i></i>	64

3.3	Efecto de metales pesados en los cambios globales de expresión de proteínas en <i>S. metallicus</i>.....	66
3.3.1	Efecto de CuSO_4 en el proteoma de <i>S. metallicus</i>	67
3.3.1.1	<i>Cambios globales en la expresión de proteínas de <i>S. metallicus</i> debido a la presencia de CuSO_4.....</i>	<i>67</i>
3.3.1.2	<i>Identificación de proteínas de <i>S. metallicus</i> que aumentaron su expresión debido a CuSO_4.....</i>	<i>73</i>
3.3.2	Efecto de CdSO_4 en el proteoma de <i>S. metallicus</i>	75
3.3.2.1	<i>Cambios globales en la expresión de proteínas de <i>S. metallicus</i> debido a CdSO_4.....</i>	<i>75</i>
3.3.2.2	<i>Identificación de proteínas de <i>S. metallicus</i> que aumentaron su expresión debido a CdSO_4.....</i>	<i>76</i>
4.0	DISCUSIÓN	78
4.1	Metabolismo de los poliP en <i>S. metallicus</i>.....	78
4.2	Relación entre el metabolismo de los poliP y la tolerancia a iones de metales pesados en <i>S. metallicus</i>.....	82
4.3	Transporte de fosfato y cobre en el modelo de detoxificación de metales pesados en <i>S. metallicus</i>.	87
4.4	Efecto de cobre y cadmio en el proteoma de <i>S. metallicus</i>.....	91
5.0	CONCLUSIONES.....	99
6.0	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. El árbol de la vida visto como una red.....	2
Figura 2. Polifosfatos inorgánicos.....	6
Figura 3. Esquema de la destoxificación de metales con la participación de poliP.....	13
Figura 4. Presencia de gránulos densos al paso de los electrones en miembros del género <i>Sulfolobus</i>	46
Figura 5. Espectros EELS de células de <i>S. metallicus</i> y <i>S. acidocaldarius</i>	47
Figura 6. Niveles de poliP durante el crecimiento de <i>S. metallicus</i>	49
Figura 7. Ensayo de la actividad tipo PPX en <i>S. metallicus</i>	50
Figura 8. Crecimiento de dos especies del género <i>Sulfolobus</i> en presencia de CuSO_4	53
Figura 9. Disminución de los niveles de poliP durante la exposición de <i>S. metallicus</i> a CuSO_4	55
Figura 10. Desaparición de gránulos de poliP durante la exposición de <i>S. metallicus</i> a CuSO_4	55
Figura 11. Contenido de poliP de células de <i>S. metallicus</i> expuestas a CuSO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	57
Figura 12. Actividad degradadora de poliP en células de <i>S. metallicus</i> expuestas a CuSO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	59
Figura 13. Respuesta de la actividad tipo PPX frente a cationes bivalentes <i>in vitro</i>	60

Figura 14. Efecto de CuSO ₄ sobre el flujo de Pi desde células de <i>S. metallicus</i>	62
Figura 15. Crecimiento de <i>S. metallicus</i> en presencia de CdSO ₄	64
Figura 16. Niveles de poliP durante la exposición de <i>S. metallicus</i> a CdSO ₄	65
Figura 17. Contenido de poliP en células de <i>S. metallicus</i> expuestas a CdSO ₄	66
Figura 18. Proteoma de <i>S. metallicus</i> crecido en condiciones normales.....	69
Figura 19. Proteoma de <i>S. metallicus</i> al exponerlo a 100 mM CuSO ₄	70
Figura 20. Efecto de la concentración de acrilamida en el proteoma de <i>S. metallicus</i> al exponerlo a 100 mM CuSO ₄	71
Figura 21. Efecto del gradiente de pH en el proteoma de <i>S. metallicus</i> al exponerlo a 100 mM CuSO ₄	72
Figura 22. Efecto de 1 mM CdSO ₄ sobre el proteoma de <i>S. metallicus</i>	77
Figura 23. Curso temporal de los niveles de poliP y la actividad tipo PPX en células de <i>S. metallicus</i> expuestas a cobre.....	86

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Concentraciones de metales toleradas por arqueas acidófilas.....	19
Tabla 2. Niveles de poliP y número de células alcanzados en la fase estacionaria de crecimiento en microorganismos del género <i>Sulfolobus</i>	48
Tabla 3. Actividades enzimáticas tipo PPX de diferentes fracciones proteicas en <i>S. metallicus</i> y <i>S. solfataricus</i>	51
Tabla 4. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masa que aumentaron su expresión al traspasar células de <i>S. metallicus</i> a CuSO ₄	73
Tabla 5. Comparación de los niveles de poliP presentes en diferentes microorganismos.....	80
Tabla 6. Tolerancia a cobre de algunos microorganismos acidófilos y neutrófilos.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

A₆₀₀: absorbancia a 600 nm

CHAPS: 3-[(3-cocamidopropil]dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CPK: creatina fosfoquinasa

DTT: ditioneitol

EDAX: dispersión de energía de rayos X

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EELS: espectroscopía de pérdida de energía del electrón

GITC: isotiocianato de guanidina

HSP: proteína de estrés térmico

IEF: isoelectroenfoque

IPTG: isopropil tio-β-D-galactósido

kDa: kiloDalton

LB: Luria-Bertani

NDK: nucleosido difosfato quinasa

PBS: solución amortiguadora de fosfato

Pi: pirofosfato

Pit: transportador inorgánico de fosfato

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PoliP: polifosfato inorgánico

PPK: polifosfato quinasa

PPK_r: polifosfato quinasa recombinante de *Escherichia coli*

PPX: exopolifosfatasa

SDS: dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TLC: cromatografía ascendente en capa fina

[γ -P³³]poliP₇₅₀: polifosfato radiactivo de 750 residuos sintetizado *in vitro*

RESUMEN

Sulfolobus metallicus es un arqueón termoacidófilo que crece bajo condiciones ambientales extremas, tales como pH ácido y altos niveles de metales tóxicos, y es de gran importancia en procesos de biominería. Los metales pesados son importantes cofactores de muchas enzimas involucradas en diversos procesos celulares. Mientras que cantidades trazas de metales son esenciales para la vida, un exceso es tóxico para las células. Los microorganismos que habitan ambientes con altas concentraciones de metales pesados se encuentran con una presión selectiva para desarrollar eficientes mecanismos de resistencia a metales, y muchos microorganismos acidófilos son resistentes a concentraciones de metales tóxicos que superan los niveles de resistencia de los microorganismos neutrófilos. Los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables para la resistencia a metales en arqueas acidófilas no se han caracterizado. Por lo tanto, nos interesamos en el estudio de mecanismos globales de respuesta a estrés por metales pesados en *S. metallicus*.

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son polímeros lineales de residuos de ortofosfato, los cuales son observados frecuentemente como gránulos densos al paso de los electrones y están presentes en muchos organismos incluyendo bacterias, arqueas y eucariontes. Los poliP tienen una variedad de funciones fisiológicas, y se ha propuesto que estos polímeros pueden funcionar como un mecanismo bacteriano de tolerancia a metales pesados. En este mecanismo, la hidrólisis del polímero y el transporte de complejos metal-Pi fuera de las células podrían ser los pasos fundamentales. Para estudiar si este sistema existe en arqueas, en esta Tesis estudiamos el posible papel del metabolismo de los poliP en la respuesta adaptativa de *S. metallicus* en tolerar metales

pesados (Cu^{2+} and Cd^{+2}). La presencia de poliP se determinó mediante microscopía electrónica, espectroscopía de pérdida de energía del electrón (EELS), y además se cuantificaron usando un método enzimático específico en *S. metallicus*, *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius*. Los tres microorganismos sintetizaron poliP durante su crecimiento, pero sólo *S. metallicus* acumuló gránulos de poliP y altos niveles de este polímero (180 nmoles/mg de proteína, expresado como residuos de Pi). Además, detectamos en *S. metallicus* una actividad tipo exopolifosfatasa (PPX) asociada a extractos de membranas, y estos valores fueron similares a los descritos para la actividad PPX de *S. solfataricus*.

Las diferencias en la capacidad de acumular poliP entre estas arqueas puede reflejar sus respuestas adaptativas a sus ambientes naturales. *S. metallicus* creció y toleró hasta 200 mM de sulfato de cobre, y los niveles de poliP disminuyeron al incrementar la concentración de cobre. Por otro lado, *S. solfataricus* no creció y no toleró concentraciones de sulfato de cobre mayores que 1–5 mM, posiblemente debido a los bajos niveles de poliP que presenta. Además, *S. metallicus* creció en presencia de concentraciones de sulfato de cadmio superiores a 1 mM. El traspaso de células de *S. metallicus* a 100 mM de sulfato de cobre produjo un rápido incremento en la actividad tipo PPX, la cual fue concomitante en el tiempo con la disminución en los niveles de poliP y la estimulación del eflujo de fosfato. Sin embargo, el traspaso de células de *S. metallicus* a 20 mM de sulfato de cadmio produjo una débil disminución en los niveles de poliP. Sumado a lo anterior, el cobre estimuló fuertemente la actividad tipo PPX en extractos libres de células desde *S. metallicus*, en un rango de 10 μM , y otros metales

tales como cadmio y zinc también estimularon la actividad tipo PPX. Los resultados sugieren fuertemente que un mecanismo de tolerancia a metales mediado por poliP es funcional en *S. metallicus*. Esta capacidad de acumular e hidrolizar poliP puede jugar un importante papel no solo en la sobrevivencia de este microorganismo en ambientes de minerales sulfurados conteniendo altas concentraciones de metales tóxicos, si no que también en su aplicación en procesos de biominería.

Con el objetivo de encontrar nuevos mecanismos responsables de la resistencia a metales en *S. metallicus* utilizamos una aproximación proteómica para analizar la expresión diferencial de proteínas en células expuestas a Cu^{+2} y Cd^{+2} . Este estudio reveló la disminución en la expresión de 23 proteínas y un aumento en la expresión de alrededor de 31 proteínas cuando las células se traspasaron a cobre. Observamos un comportamiento similar cuando las células se traspasaron a cadmio. 18 proteínas inducidas desde células expuestas a cobre se analizaron por espectroscopía de masa, y se encontró que estas estaban relacionadas con la producción y transporte de energía, la biosíntesis de aminoácidos, la respuesta a estrés, y la regulación de la transcripción. 9 de las proteínas inducidas se definieron como proteínas con funciones desconocidas. Se identificaron proteínas involucradas en el transporte de electrones, como oxidoreductasas que responderían al estrés oxidativo causado por metales pesados, y proteínas involucradas en estrés tales como la subunidad de la chaperonina HSP60 y del proteosoma, las que jugarían un importante papel en asegurar la calidad y funcionalidad de las proteínas. Algunas de estas proteínas también se indujeron cuando las células se expusieron a cadmio. El amplio espectro funcional que entregaron las proteínas sobreexpresadas es consistente con otros estudios proteómicos recientes relacionados

con la resistencia a metales pesados en otros procariontes y en el arqueón acidófilo *Ferroplasma acidarmanus*. Finalmente, este estudio constituye la primera caracterización proteómica de mecanismos de resistencia a metales pesados en un microorganismo termoacidófilo involucrado en procesos de biominería.

ABSTRACT

Sulfolobus metallicus is a thermoacidophilic archaeon of great importance for biomining operations. It grows under extreme environmental conditions such as acidic pH and presence of high levels of toxic metals. Heavy metals are important co-factors for many enzymes involved in diverse cellular processes. While trace amounts of metals are essential for life, high amounts are toxic for cells. Microorganisms inhabiting environments with high heavy metals concentrations encounter a selective pressure to develop metal resistance mechanisms, and many acidophilic microorganisms are resistant to concentrations of toxic metals that exceed the levels of resistance in neutrophilic microorganisms. The genetic and biochemical mechanisms responsible for metal resistance in acidophilic archaea remain largely uncharacterized. Therefore, we were interested to study global mechanisms of response to heavy metals stress in *S. metallicus*.

Inorganic polyphosphates (polyP) are linear polymers of orthophosphate residues, which are frequently observed as electron-dense granules and are present in most organisms including bacteria, archaea and eukaryotes. PolyP has a variety of physiological functions, and it has been proposed that they can work like a bacterial mechanism for heavy metals tolerance. In this mechanism, the hydrolysis of the polymer and the transport of a metal-Pi complex out of the cell are essential. To study if such a system exists in archaea, in this Thesis we studied the possible role of polyP metabolism in the adaptive response of *S. metallicus* tolerance to the heavy metals Cu^{2+} and Cd^{2+} . The presence of polyP was determined by electron microscopy and electron energy loss

spectroscopy (EELS) procedures, and quantified by using a specific enzymatic method in *S. metallicus*, *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. All three microorganisms synthesized polyP during growth, but only *S. metallicus* greatly accumulated granules of polyP, with polyP levels of 180 nmoles/mg of protein (expressed as Pi residues). Also, we detected in *S. metallicus* an exopolyphosphatase (PPX-like) activity associated to membrane extracts similar to the PPX activity found in *S. solfataricus*.

The differences in the capacity to accumulate polyP between these archaea may reflect adaptive responses to their natural environment. *S. metallicus* grew in and tolerated up to 200 mM copper sulfate, and its polyP levels decreased with increasing copper concentrations. On the other hand, *S. solfataricus* could not grow in or tolerate more than 1–5 mM copper sulfate, most likely due to its low levels of polyP. Also, *S. metallicus* could grow in the presence of cadmium sulfate concentrations up to 1 mM. Shifting *S. metallicus* cells to copper sulfate concentrations up to 100 mM led to a rapid increase in their PPX-like activity which was concomitant in time with a decrease in their polyP levels and a stimulation of phosphate efflux. However, shifting *S. metallicus* cells to 20 mM cadmium sulfate led to a weak decrease in their polyP levels. Furthermore, copper in the range of 10 μ M greatly stimulated PPX-like activity in cell-free extracts from *S. metallicus*. Other metals such as cadmium and zinc also stimulated the PPX-like activity. These results strongly suggest that a metal tolerance mechanism mediated through polyP is functional in *S. metallicus*. This ability to accumulate and hydrolyze polyP may play an important role not only in the survival of this

microorganism in sulfidic mineral environments containing high toxic metals concentrations, but also in their applications in biomining.

To find new genetic mechanisms responsible for metal resistance in *S. metallicus*, we used a proteomic approach. The differential expression of proteins in cells exposed to Cu^{+2} and Cd^{+2} revealed the repression of 23 proteins and the induction of around 31 proteins when cells were shifted to copper. We observed a similar behavior when cells were shifted to cadmium. 18 Copper-induced proteins were analyzed by mass spectrometry, and they were found to be related to the production and transport of energy, biosynthesis of amino acids, stress responses and transcription regulation. Nine of the copper-induced proteins were defined as proteins with unknown functions. Some proteins identified were related to electron transport and were putative oxidoreductases that could respond to oxidative stress caused by heavy metals. Others proteins had similarities to proteins involved in stress responses such as the subunits of HSP60 chaperonine and proteosome. All these proteins would play important roles in assuring the quality and functions of cell proteins. Some of these proteins were also induced when cells were exposed to cadmium. The broad functional spectrum of up-regulated proteins is consistent with other recent proteomic reports concerned with heavy metals resistance in other prokaryotes and in the acidophilic archaeon *Ferroplasma acidarmanus*. Finally, this study constitutes the first proteomic characterization of heavy metals resistance mechanisms in a thermoacidophilic microorganism involved in biomining processes.

1.0 INTRODUCCIÓN

1.1.1 El dominio *Archaea*

1.1.1 Existencia del dominio *Archaea*

La comparación de secuencias nucleotídicas de ARN ribosomal 16S/18S ha permitido la construcción de un árbol filogenético universal que agrupa a los seres vivos en tres dominios llamados *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea* (Woese y col., 1990). Desde entonces, comenzó el interés de avanzar en el estudio del dominio *Archaea*, y una de las razones fundamentales de este interés se atribuye a las características de adaptación a la vida en condiciones extremas que presentan muchos de sus representantes (Rajapogal y col., 1998).

El gran aumento de secuencias de ADN disponibles, gracias a la secuenciación de genomas microbianos, ha dado lugar a la construcción de árboles filogenéticos basados en otras secuencias de genes diferentes al ARN ribosomal 16S, pero universalmente conservados como por ejemplo la proteína de estrés térmico de 70 kDa (HSP70) (Gupta, 1998). Además, otros árboles universales construidos con diferentes genes muestran una variedad de posibles relaciones filogenéticas (Brown y Doolittle, 1997). Lo anterior desmoronó el nuevo paradigma de los tres dominios, entregando una nueva visión basada en que los fenómenos de transferencia horizontal de genes, que explican las aparentes inconsistencias entre distintos árboles universales, han ocurrido y son una fuerza importante en la evolución biológica, y por otro lado ponen en evidencia que los árboles filogenéticos universales basados en un único gen muestran la historia de ese gen y no necesariamente del organismo que lo contiene (Doolittle, 1999; Woese,

2000). Desde este punto de vista, para muchos genes el árbol de la vida se transforma en una red (Figura 1).

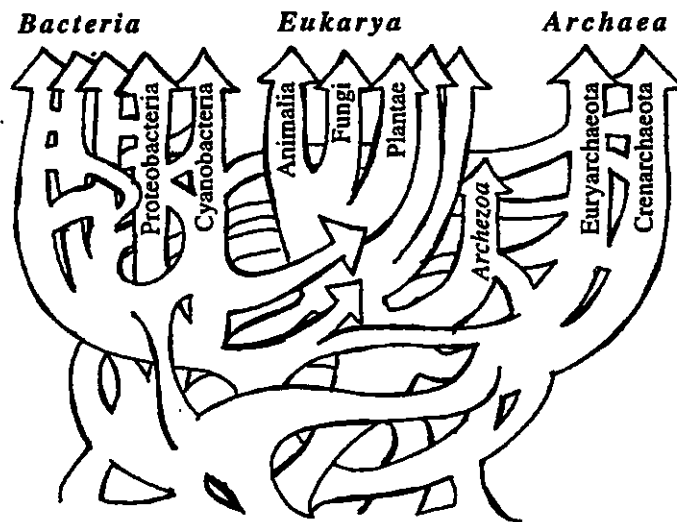


Figura 1. El árbol de la vida visto como una red (Doolittle, 1999).

1.1.2 Características del dominio *Archaea*

Entre los aspectos más sobresalientes que definen al dominio *Archaea* se puede destacar la estructura de sus envolturas celulares formadas por una capa S de glicoproteínas y una membrana plasmática que contiene una gran proporción de tetraéteres lipídicos (Brown y Doolittle, 1997; Rajagopal y col., 1998). También se han caracterizado clásicamente por su adaptación a la vida en condiciones extremas, por lo que muchos de sus representantes pertenecen a la categoría de extremófilos (Rajagopal y col., 1998).

La secuenciación de nuevos genomas de arqueas ha revelado que la mayor parte de los sistemas de procesamiento de la información como la replicación, la transcripción y la traducción, que mantienen y expresan los genomas son claramente de tipo

eucarionte (Baumann y col., 1995; Rowlands y col., 1994; Dennis, 1997). En cambio, los genes relacionados con el metabolismo son de tipo bacteriano (Olsen y Woese, 1997; Gaasterland, 1999). Otras similitudes con bacterias son sus tamaños celulares, ausencia de membrana nuclear y organelos, y la presencia de un cromosoma circular acompañado de plásmidos circulares más pequeños (Brown y Doolittle, 1997). Esto explicaría porqué los árboles basados en secuencias génicas relacionadas con estos procesos, como la transcripción y traducción, sugieren un origen común entre *Archaea* y *Eukarya* (Horiike y col., 2001). Por lo tanto, los enfoques comparativos que relacionan al dominio *Archaea* con bacterias y eucariontes podrían entregar una visión completa y representativa del fenómeno de la evolución biológica.

El dominio *Archaea* se divide en los reinos *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Korarchaeota*. Los *Crenarchaeota* incluyen a los termoacidófilos extremos, que crecen a pH entre 1 y 3, y a temperaturas de 80 °C a 102 °C o más (Brown and Doolittle, 1997), mientras que los *Euryarchaeota* incluyen a las arqueas halofílicas, capaces de tolerar concentraciones muy altas de sal, y a los metanógenos que generan metano bajo condiciones anaeróbicas; y los *Korarchaeota* comprenden microorganismos de ambientes termófilos aún no cultivados, identificados en base al análisis del ARN 16S (Barns y col., 1996).

1.2 El género *Sulfolobus*

1.2.1 Características del género *Sulfolobus*

El género *Sulfolobus* pertenece al reino *Crenarchaeota* y comprende especies termoacidófilas aisladas de hábitats geotermales como las fuentes solfatáricas

(Ciaramella y col., 2002). Estos ambientes extremos se caracterizan por las altas temperaturas de sus aguas circulantes, la presencia de minerales como hierro y azufre y una gran acidez (Stetter, 1995).

Debido a la existencia de especies heterótroficas y aerobias pertenecientes a este género, varios de estos microorganismos pueden cultivarse fácilmente en medio líquido, siendo ampliamente utilizados como modelo de estudios bioquímicos y genéticos. Por lo tanto, desde el punto de vista básico, se ha avanzado mucho en el estudio de *Sulfolobus acidocaldarius* y *Sulfolobus solfataricus*. El genoma del primero se secuenció y anotó recientemente (Chen y col., 2005). El genoma del segundo fue secuenciado por She y col. (2001), y se han desarrollado algunas herramientas genéticas necesarias para la expresión heteróloga y la mutagénesis en *S. solfataricus* (Aravalli y Garrett, 1997; Cannio y col., 1998; Jonuscheit y col., 2003). Recientemente se probó un sistema de transformación que utiliza un vector viral para la expresión heteróloga y homóloga de genes en *S. solfataricus*. Hasta el momento, este es el único sistema descrito para expresar proteínas a altas temperaturas que generalmente son encontradas en cuerpos de inclusión al clonarlas en huéspedes mesofílicos (Albers y col., 2006).

1.2.2 *Sulfolobus metallicus* y su utilización en biominería

S. metallicus es un termoacidófilo que crece a 65 °C, a pH entre 2 y 3, y tiene la capacidad de oxidar hierro y azufre (Stetter, 1998; Bathe y Norris, 2007). Es el menos estudiado dentro de este género, pero es el más interesante desde el punto de vista biotecnológico. Las propiedades metabólicas que tienen algunos microorganismos como *S. metallicus* se emplean con gran beneficio para extraer metales como cobre y oro desde

los minerales que los contienen, en el proceso biotecnológico conocido como biolixiviación (Lindström y col., 1992; Aguilar, 1996; Bathe y Norris, 2007). Este proceso es de gran importancia industrial no sólo en Chile, sino que mundialmente, ya que utiliza minerales que no pueden lixiviarse de manera química y además produce menos contaminación ambiental al compararlo con los métodos tradicionales (Gentina y Acevedo, 1985; Acevedo y col., 1993; Rawlings, 2002).

En años recientes ha sido de interés el desarrollo de procesos de biolixiviación a altas temperaturas utilizando arqueas termofílicas como *S. metallicus* y *Acidianus brierleyi* (Rawlings, 2002; Bathe y Norris, 2007); donde la aplicación de éstos microorganismos ha resultado en un aumento de las tasas de obtención de minerales (Nemati y col., 2000; d'Hugues y col. 2001; Stott y col., 2001), debido a que las reacciones químicas ocurren a mayor velocidad (Lindström y col., 2001). Sin embargo, no existe claridad acerca de los mecanismos de adaptación de este tipo de microorganismos a estos ambientes extremos como lo son altas concentraciones de metales pesados y alta acidez.

Desde el punto de vista básico, existe un gran interés por dilucidar los mecanismos por los cuales estos extremófilos se adaptan y responden a su medio ambiente. Pero además, el conocimiento de estos mecanismos es de importancia para controlar el complejo ecosistema microbiano presente en operaciones de biominería o para evitar contaminaciones ambientales (ácido y metales pesados) en sitios mineros abandonados, debido a los procesos biogeoquímicos normales que desempeñan estos microorganismos (Aguilar, 1996).

1.3 Polifosfatos inorgánicos

1.3.1 Características de los polifosfatos inorgánicos

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son polímeros lineales formados por decenas a cientos de ortofosfatos (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido (Figura 2) (Kornberg, 1995; Kornberg y col., 1999). Estas moléculas se han encontrado en todos los seres vivos en los que se los ha estudiado: bacterias, hongos, protistas, plantas y animales (Wood y Clarck 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y col., 1990). De especial interés es el hecho que los poliP podrían ser considerados como componentes prebióticos (Yamagata y col., 1991). Su carga negativa sugiere que podrían haberse adherido a las superficies de pirita donde se cree que se originaron los primeros metabolizadores quimioautotróficos en un ambiente no reductor y de altas temperaturas (Wächtershäuser, 1992).

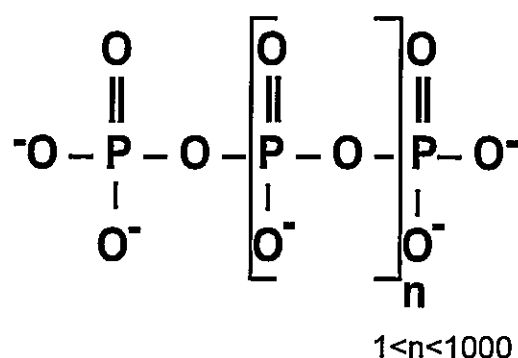


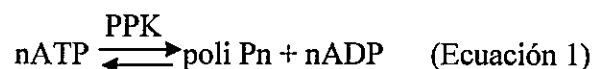
Figura 2. Polifosfatos inorgánicos. n representa el número de residuos de fosfato.

La localización de los poliP varía entre bacterias y eucariontes. En bacterias, los poliP son principalmente citoplasmáticos y se encuentran como gránulos o en forma soluble (Rao y col., 1998). En eucariontes, los poliP se encuentran en distintos compartimentos celulares como vacuolas, pared celular y núcleo (Kulaev y col., 1999).

1.3.2 Metabolismo de los poliP

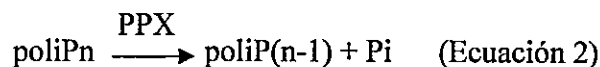
1.3.2.1 Metabolismo de los poliP en bacterias

Hasta hace pocos años, la única vía bien establecida para la biosíntesis de poliP en bacterias era la polimerización del fosfato terminal del ATP mediante la enzima polifosfato quinasa o PPK, según la reacción reversible:



La PPK de *Escherichia coli* ha sido purificada, su gen clonado y secuenciado (Ahn y Kornberg, 1990; Akiyama y col., 1992). La enzima es un homotetrámero con subunidades de 80 kDa asociado a membrana; y homólogos del gen que codifica para la PPK se encuentran presentes en varios genomas bacterianos (Tzeng y Kornberg, 1998).

En *E. coli*, el gen *ppk* es parte de un operón en el cual se encuentra río abajo un segundo gen cuyo producto es una exopolifosfatasa (PPX) que hidroliza los residuos terminales de poliP liberando Pi (Akiyama y col., 1993) según la siguiente reacción:



Además de la PPK y la PPX, otras enzimas contribuyen a la síntesis y degradación de los poliP en bacterias. Por ejemplo, se ha detectado una actividad 1,3-difosfoglicerato-poliP fosfotransferasa (Kulaev y col., 1999) y se ha caracterizado la enzima polifosfato glucoquinasa que es capaz de utilizar el poliP como sustituto de ATP en reacciones de fosforilación de glucosa en algunas bacterias (Hsieh y col., 1993). Incluso recientemente se identificó una glucoquinasa estrictamente dependiente de los poliP (Tanaka y col., 2003).

Recientemente en *Pseudomonas aeruginosa* se descubrió una nueva actividad PPK (designada PPK2) que presenta principalmente actividad polinucleótido quinasa (NDK) que utiliza a los poliP como donantes para generar GTP a partir de GDP a una tasa 75-veces mayor que la síntesis de poliP a partir de GTP. Pero utiliza indistintamente GTP y ATP en la síntesis de los poliP (Zhang y col., 2002). Por lo tanto, la PPK2 sintetiza GTP a partir de poliP y en contraste, la PPK favorece la síntesis de los poliP exclusivamente a partir de ATP (Zhang y col., 2002; Ishige y col., 2002).

1.3.2.2 Metabolismo de los poliP en eucariontes

En eucariontes, por su parte, se describió una actividad dolicol pirofosfato: polifosfato fosfotransferasa asociada a las membranas de vesículas de transporte en levadura. Esta enzima cataliza la transferencia de fosfato desde el dolicol fosfato hacia el poliP (Kulaev y col., 1999). Se identificaron cuatro genes homólogos, *PHM1*, *PHM2*, *PHM3* y *PHM4*, que codifican para proteínas de la membrana vacuolar en *Saccharomyces cerevisiae* y cuyos mutantes son deficientes en acumulación de poliP (Ogawa y col., 2000a). Por otro lado, varias polifosfatasas han sido caracterizadas a

nivel genético en levadura. Una de ellas es la exopolifosfatasa citosólica codificada por el gen *ppx1* (Wurst y Kornberg, 1994; Wurst y col., 1995) que no presenta ninguna similitud con las exopolifosfatasas bacterianas. En el mismo microorganismo también se ha descrito una endopolifosfatasa vacuolar (Ppn1) (Sethuraman y col., 2001).

1.3.2.3 Metabolismo de los poliP en arqueas

El grupo de trabajo del Dr. Jerez ha estudiado durante varios años los mecanismos de adaptación a cambios en el ambiente en varios microorganismos pertenecientes al género *Sulfolobus*. Entre ellos, se ha investigado la respuesta global de *S. acidocaldarius* ante condiciones de estrés como el aumento de temperatura y la carencia de fosfato (Osorio y Jerez, 1996). Mediante microscopía electrónica de transmisión se detectó la presencia de gránulos densos a los electrones, probablemente compuestos por poliP (Osorio, 1998). Además, la descripción de una proteína asociada al glicógeno en *S. acidocaldarius* con actividad PPK (Skórko y col., 1989) sugirió la existencia de los poliP en este microorganismo. Por lo tanto, se han realizado estudios cuantitativos determinando los niveles de poliP en *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*, como también sus variaciones frente a distintos cambios ambientales (Cardona, 2001). Con respecto a la enzimología del metabolismo de los poliP en el dominio *Archaea*, la PPK unida a glicógeno descrita por Skórko y col. (1989) resultó ser una glicógeno sintetasa (Cardona y col., 2001). Por lo tanto, no se tenía conocimiento de las enzimas involucradas en el metabolismo de los poliP, hasta que se describió un gen *ppx* funcional en *S. solfataricus*, con similitud al gen *ppx* de *E. coli* (Cardona y col., 2002).

1.3.3 Funciones de los poliP

A pesar de la multiplicidad de funciones que puedan tener los poliP debido a su posible origen prebiótico y a su carácter ubicuo, estas moléculas fueron consideradas clásicamente como componentes con función de reserva energética. De esta manera, la regulación y función de los poliP en los seres vivos permaneció desconocida por mucho tiempo. En los últimos años se han estudiado sus posibles funciones fisiológicas y potenciales aplicaciones industriales. Entre las funciones propuestas se ha postulado que el poliP actúa como sustituyente de ATP en reacciones de proteínas quinasas (Kornberg y col., 1999). También es una reserva de fosfato, debido a que el poliP puede ser convertido a Pi por la acción de polifosfatasas, lo que asegura una mantención de niveles estables de este ión. También colabora con la mantención del pH intracelular al presentar acción amortiguadora (Kornberg y col., 1999). Su alta densidad de cargas negativas y la flexibilidad de su enlace lo convierte en un buen quelante de iones metálicos tales como Mn^{+2} , Ca^{+2} , Al^{+3} , lo que sugiere su posible participación en mecanismos celulares de detoxificación de metales pesados (Keasling, 1997). Existen otras funciones de los poliP, como por ejemplo participar en la regulación de la expresión de ciertos genes tales como *rpoS*, un factor sigma de fase estacionaria (Shiba y col., 1997) y de los genes SOS, involucrados en un sistema global de respuesta ante distintos tipos de estrés (Tsutsumi y col., 2000). Además se demostró que la proteasa Lon de *E. coli* forma un complejo con los poliP, el cual es responsable de la degradación de proteínas ribosomales en respuesta a la carencia de aminoácidos (Kuroda y col., 2001).

La dinámica de acumulación y utilización de los poliP muestra sin duda que la mayor utilización de estas moléculas debe ser como fuente de energía y reserva de Pi. Además, la acumulación de poliP asociada a la limitación de algunos nutrientes e incluso a condiciones de estrés, como carencia de aminoácidos y fosfato, sugiere que probablemente el poliP sea un enlace entre este tipo de situaciones y los sistemas globales de respuesta (Ault-Riché y col., 1998; Kornberg y col., 1999).

1.3.4 PoliP y su relación con la tolerancia metales pesados

Un proceso de gran importancia ecológica consiste en la remoción de iones metálicos desde sitios contaminados (Keasling y col., 2000). Uno de los mecanismos por los cuales las células pueden tolerar amplias concentraciones de metales pesados, es el secuestro de estos debido a la interacción con los poliP, disminuyendo sus concentraciones intracelulares (Keasling, 1997). Por lo tanto, la relación existente entre los poliP y la resistencia a metales sugiere una posible aplicación de organismos con el metabolismo de los poliP genéticamente mejorados para la biorremediación de aguas contaminadas con este tipo de iones (Keasling y col., 1998; Keasling y col., 2000).

Generalmente los poliP se encuentran en vacuolas de microorganismos eucariontes y como gránulos en bacterias, donde se encuentran asociados con cationes (Urech y col., 1978; Peverly y col., 1978). Entre ellos, los más frecuentes son Ca^{+2} , K^{+} y Mg^{+2} (Keasling, 1997). Sin embargo, en los gránulos de poliP de algunas bacterias se han encontrado también metales pesados como aluminio, titanio, plomo y cadmio (Keasling, 1997). Dada su naturaleza polianiónica y por lo tanto, su carácter quelante de iones de metales pesados, se ha propuesto que las células emplean los poliP como un

mecanismo para desintoxicarse de los metales pesados una vez que éstos han ingresado a la célula (Keasling, 1997). Al respecto, existen estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis de dispersión de energía de rayos X (EDAX) que muestran que los poliP se asocian *in vivo* a iones metálicos (Aiking y col., 1984; Pettersson y col., 1985, Witschel y col., 1999), como es el caso *Staphylococcus aureus* que es capaz de secuestrar níquel (González y Jensen, 1998). Además, Aiking y col. (1984) demostraron que *Klebsiella aerogenes* acumula gránulos de poliP para detoxificar cadmio, y Petterson y col. (1985) observaron que *Anabaena cylindrica* acumula más aluminio durante el crecimiento en alta concentración de fosfato, condición en la que se forman gránulos de poliP.

Teóricamente, al aumentar el nivel celular de poliP las células deberían hacerse más tolerantes a los metales pesados. Sin embargo, en estudios con bacterias modificadas genéticamente que aumentan sus niveles de poliP no se ha podido demostrar claramente este tipo de correlación (Keasling y Hupf, 1996; Keasling y col., 1998). No obstante, al sobreexpresar la PPK y la PPX, se han obtenido células más tolerantes a cadmio (Keasling y Hupf, 1996). Esto sugiere que no sólo es importante un elevado nivel de los poliP, sino que también se requiere la degradación de ellos. Esto está en concordancia con evidencias que sugieren que los poliP intracelulares serían degradados luego de exponer a *K. aerogenes* a cadmio (Aiking y col., 1984).

Basado en los datos anteriores, Keasling (1997) propuso un modelo (Figura 3) para explicar el fenómeno de la interacción del metal con los poliP. Este modelo plantea que la concentración intracelular de cationes regula la actividad polifosfatasa.

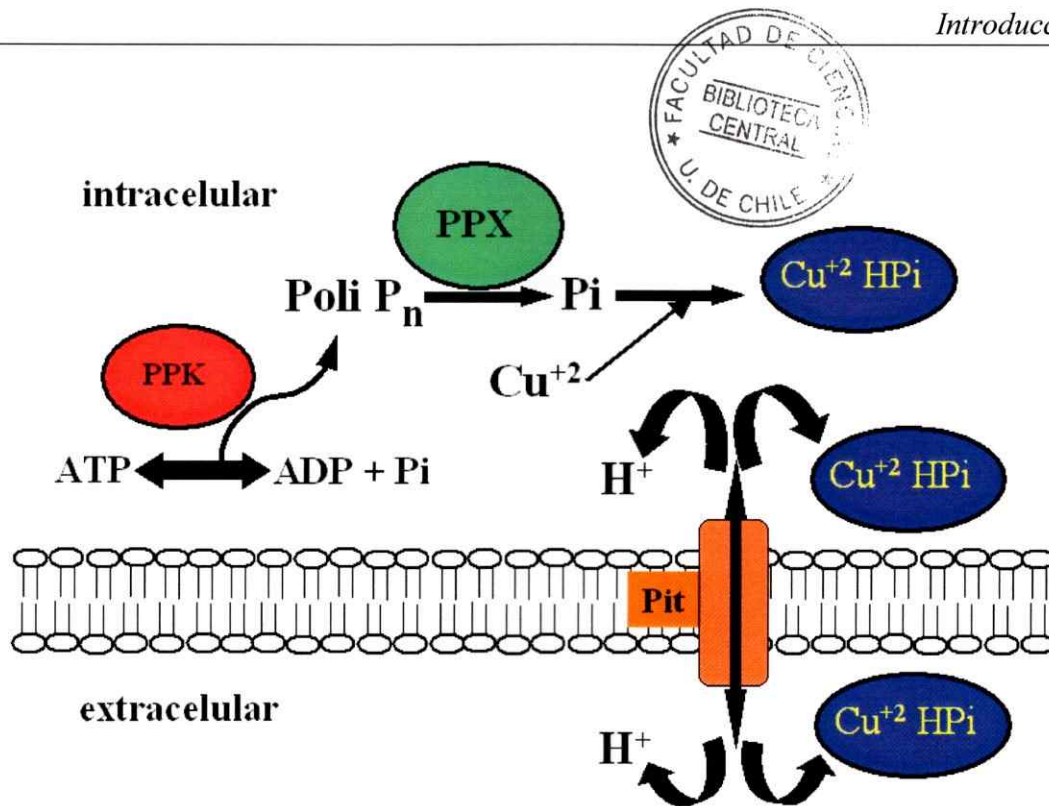


Figura 3. Esquema de la detoxificación de metales con la participación de poliP. La concentración intracelular del metal regularía la actividad exopolifosfatasa (PPX) afectando directamente los niveles de poliP. El fosfato liberado desde el poliP es transportado fuera de la célula con el ión metálico a través de un transportador de fosfato tipo Pit (Kearling, 1997).

La liberación *in vitro* de fosfato a partir de los poliP por la enzima PPX es afectada por la concentración de cationes (Kearling, 1997), ya que incrementos en la concentración de NaCl, NaF, o MgCl₂ inducen un aumento de la actividad PPX, mientras que la disminución de la concentración de los iones inhibe la actividad de la enzima (Kearling y col., 1993). Posteriormente, el fosfato liberado es transportado fuera de la célula acompañado por cationes, como se demostró en los sistemas transportadores de fosfato inorgánico (Pit) de *E. coli* y *Acinetobacter johnsonii*, los que transportan reversiblemente complejos metal-fosfato (van Veen y col., 1994 a y b).

1.4 Mecanismos de respuesta a metales pesados en bacterias

Los metales desempeñan papeles esenciales en los procesos vitales de los microorganismos. Algunos metales, tales como calcio, cobalto, cobre, hierro, potasio, magnesio, manganeso, sodio y zinc, son nutrientes requeridos por las células y son esenciales. Otros metales tales como plata, aluminio, cadmio, oro y mercurio no tienen un papel biológico. Los metales esenciales presentan funciones bioquímicas importantes como ser cofactores de enzimas, participar activamente en algunos procesos de oxidoreducción y estabilizar algunas estructuras como proteínas, paredes celulares e incluso ácidos nucleicos (Bruins y col., 2000; Ettema y col., 2003). Por el contrario, la toxicidad de los metales ocurre por diversos mecanismos entre los que se pueden destacar: la formación de enlaces de coordinación con aniones provocando el bloqueo de grupos funcionales de enzimas, el desplazamiento de metales esenciales desde sus sitios de unión nativos y la desintegración de membranas celulares. Además, metales como cobre y hierro, cuya función fisiológica es participar en reacciones redox, pueden generar productos secundarios dañinos (Bruins y col., 2000).

Debido a la presión selectiva en ambientes que contienen metales (Bruins y col., 2000), los microorganismos han desarrollado mecanismos específicos altamente regulados para el transporte de estos micronutrientes (Nies, 1999). Existen diversos sistemas regulatorios asociados con el estrés de metales de transición (Outten y col., 2000). Estos mecanismos denominados de resistencia son codificados genéticamente y se expresan frente a la presencia del metal. Los microorganismos deben resolver el dilema que se presenta entre la necesidad de las células por mantener un balance entre los sistemas de adquisición y de eflujo de metales para prevenir sus efectos tóxicos. Es

importante destacar que los microorganismos pueden presentar mecanismos denominados de tolerancia, que no dependen la presencia de los metales pero de igual forma pueden tener efectos sobre la tolerancia que puedan tener las células a dichos metales.

Los mecanismos de resistencia a metales pueden estar asociados a elementos cromosomales y a transposones, pero los más específicos y por lo tanto más estudiados se encuentran asociados a plasmidios (Silver, 1996; Bruins y col., 2000). La mayoría de los autores concuerdan con que existen cinco mecanismos básicos para responder a la presencia de metales (Dopson y col., 2003; Bruins y col., 2000):

1. Transporte activo o eflujo, el cual es el mecanismo principal usado por los microorganismos para exportar metales tóxicos desde su citoplasma hacia el espacio extracelular. Estos mecanismos pueden ser dependientes o no de ATPasas, y además son altamente específicos (Ej: arsénico, cadmio y cobre).
2. Conversión enzimática a una forma menos tóxica (Ej: mercurio).
3. Secuestro o inmovilización intra o extracelular por proteínas o metalotioninas, o por depósito de sales insolubles sobre la superficie celular (Ej: cobre, cadmio, zinc, uranio).
4. Exclusión por medio de barreras de permeabilidad mediante alteración de las envolturas celulares, dentro de las cuales se encuentra la unión del cobre al periplasma, o por otro lado la formación extracelular de polisacáridos en algunas bacterias, otorgándoles la capacidad de bioabsorber iones metálicos extracelularmente o unión del metal a exopolisacáridos (Ej: cobre, cadmio).

5. Reducción de la sensibilidad al metal de los blancos celulares, mediado por mecanismos moleculares normales de la célula, como pueden ser el caso de mutaciones o mecanismos de reparación del ADN (Ej: cobre, cadmio, hierro).

Es importante destacar que los microorganismos pueden presentar no solo uno de estos mecanismos, sino que es posible la presencia de una combinación de varios mecanismos de resistencia. Además, otros factores pueden determinar la capacidad de tolerancia a metales pesados en cada microorganismo; como lo son el papel que juega cada metal en el metabolismo normal de la célula y la presencia de genes localizados en cromosomas, transposones o plásmidos que controlan la resistencia a los metales (Bruins y col., 2000).

1.5 Mecanismos de respuesta a metales pesados en bacterias extremófilas utilizadas en biominería

1.5.1 Características ambientales en los procesos de biolixiviación

En general, los ambientes lixiviantes contienen grandes cantidades de sulfuros metálicos que son sometidos continua y simultáneamente tanto a reacciones de oxidación química como de oxidación bacteriana. Como producto final de la oxidación de estos compuestos azufrados, en gran medida catalizada por la acción fisiológica de las bacterias, se genera gran cantidad de ácido sulfúrico que disminuye el pH del medio y además se liberan altas concentraciones de iones de metales pesados, los que son potencialmente tóxicos para las propias células que participan en estos procesos (Dopson

y col., 2003). Se ha descrito una gran variedad de microorganismos capaces de crecer en ambientes donde ocurren estos procesos, que incluye no sólo a bacterias quimiolitotróficas autotróficas, sino también, bacterias heterotróficas, arqueas, hongos, algas y algunos protozoos (Johnson, 1998).

Las características más sobresalientes de los microorganismos que son capaces de vivir en este ambiente son su carácter acidófilo y su capacidad para tolerar altas concentraciones de iones de metales pesados. Sin duda, dada las características particulares del ambiente, los microorganismos que se desarrollan en este hábitat están constantemente sometidos a una presión selectiva para desarrollar mecanismos que les permiten adaptarse a estas condiciones extremas (Dopson y col., 2003).

1.5.2 Tolerancia a metales pesados en la bacteria acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans*

La mayoría de los microorganismos altamente tolerantes a metales pesados se han aislado desde drenajes ácidos de minas y drenajes ácidos desde rocas. En los drenajes ácidos de mina y en los sitios de biolixiviación, la bacteria *A. ferrooxidans* ha sido la más estudiada durante muchos años, pero gracias al uso de herramientas filogenéticas moleculares se demostró que otras especies también se encuentran en sitios de biolixiviación tanto naturales como comerciales (Dopson y col., 2003).

A. ferrooxidans es una bacteria gram negativa capaz de tolerar una concentración de hasta 800 mM de cobre (Das y col., 1998). Sin embargo, se sabe muy poco en cuanto a los mecanismos moleculares mediante los cuales esta bacteria tolera altas concentraciones de este metal (Rohwerder y col., 2003). La reciente disponibilidad de la

secuencia del genoma de esta bacteria ha permitido identificar genes putativos que codificarían para determinantes genéticos de resistencia a metales (Barreto y col., 2003). Algunos estudios realizados en *A. ferrooxidans* indican que este microorganismo es capaz de incorporar una gran cantidad de cobre y probablemente este cobre puede ser excluido desde el interior de las células vía algún sistema inducible de eflujo de cobre (Boyer y col., 1998). Además, mediante aproximaciones proteómicas se han identificado varias proteínas inducidas en respuesta a cobre, zinc, níquel y cadmio, algunas de ellas específicas para cada metal y otras que probablemente serían parte de una respuesta más general frente al estrés de metales (Novo y col., 2000). Otro antecedente importante en cuanto a la tolerancia de *A. ferrooxidans* a cobre tiene que ver con los altos niveles de poliP que acumula este microorganismo en su citoplasma. Sin embargo, cuando esta bacteria es expuesta a cobre, estos poliP comienzan a ser progresivamente degradados, lo que es acompañado por el eflujo de iones fosfato y supuestamente de átomos de cobre desde la célula (Álvarez y Jerez, 2004). Esto apoya la idea que este microorganismo utiliza la exclusión de cobre como mecanismo de respuesta a altas concentraciones de este metal.

1.6 Tolerancia a metales pesados en arqueas acidófilas

A pesar que la mayoría de los mecanismos de resistencia a metales pesados identificados en microorganismos neutrófilos también están presentes en microorganismos acidófilos, el grado de tolerancia a metales pesados es mayor en estos últimos, posiblemente debido a la presencia de efectivos mecanismos de resistencia a metales (Dopson y col., 2003). A pesar de esto, muy pocos estudios relacionados con

tolerancia a metales pesados se han desarrollado en arqueas acidófilas (Baker-Austin y col., 2007).

La mayoría de los estudios realizados en algunas arqueas acidófilas hasta hace algunos años sólo dan referencia de altos niveles de tolerancia a ciertos metales que presentan estos microorganismos (Tabla 1), pero no dan una explicación de los posibles mecanismos de resistencia y tolerancia que presentan. De esta manera, únicamente se ha documentado la tolerancia de algunas cepas del género *Sulfolobus* a metales como cadmio, cobalto, cobre, níquel, zinc y magnesio (Miller y col., 1992); como también la toxicidad del arsenito [As(III)] en *Ferroplasma acidarmanus* y *Metallosphaera sedula* (Huber y col., 1989; Dopson y col., 2003; Gihring y col., 2003).

Tabla 1. Concentraciones de metales toleradas por arqueas acidófilas, revisado por Dopson y col., 2003.

Arqueas acidófilas	Concentración de metal (mM)				
	As(III)	Cu(II)	Zn(II)	Cd (II)	Ni (II)
<i>F. acidarmanus</i>	13	16	ND	9	ND
<i>M. sedula</i>	1	16	150	1	ND
<i>S. acidocaldarius</i>	ND	1	10	10	1
<i>S. solfataricus</i>	ND	1	10	10	0,1

ND = no determinado.

1.6.1 Mecanismos de resistencia a cobre en arqueas acidófilas

El cobre es uno de los metales encontrados en altas concentraciones en los procesos de biolixiviación, y es un elemento traza que funciona como cofactor en varias enzimas dentro del metabolismo celular. Bajas concentraciones de cobre son vitales para los organismos vivos, sin embargo un exceso del metal es extremadamente tóxico

(Deigweiher y col., 2004; Baker-Austin y col., 2005; Ettema y col., 2006). Por lo tanto, una fuerte regulación de la concentración de cobre intracelular es requerida por las células, la cual es mantenida generalmente por transportadores específicos de tipo ATPasas que utilizan la energía utilizada por la hidrólisis de ATP (Mandal y col., 2002; Deigweiher y col., 2004). Este tipo de enzimas aparecen como elementos centrales en los procesos de biotolerancia y bioacumulación de metales (Mandal y col., 2002). Hasta hace algunos años no existían comunicados de resistencia al cobre en arqueas, sólo algunos estudios de tolerancia en *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* (Miller y col., 1992), en *F. acidarmanus* (Dopson y col., 2003), como también en *M. sedula* (Huber y col., 1989) (Tabla 1).

El primer trabajo sobre la caracterización funcional de una ATPasa tipo CopA en una arquea hipertermófila, *Archaeoglobus fulgidus*, se realizó hace pocos años. En este estudio se demostró que la ATPasa tipo CopA es activada independientemente por Ag^+ y Cu^+ a altas temperaturas, y no es activada a 37 °C. Además, esta enzima se fosforiló en presencia de estos metales, lo que indica que conduce movimientos de metales hacia el exterior de la célula. Esta proteína es un fuerte candidato para estudios estructurales/funcionales de este tipo de transportadores en microorganismos termófilos (Mandal y col., 2002).

Debido a la disposición del genoma completo de *S. solfataricus* se han realizado algunos estudios bioinformáticos en busca de determinantes genéticos involucrados en la resistencia a cobre. Uno de estos estudios describe la presencia de un dominio llamado TRASH, el cual contiene motivos con residuos de cisteína muy conservados que dan cuenta de un posible efecto sobre la coordinación de algunos metales. Este dominio

TRASH se encuentra en múltiples genomas procariontes, y es parte de reguladores transcripcionales, ATPasas que transportan metales e hidrogenasas. Se describió que algunas arqueas como *S. solfataricus* y *Sulfolobus tokodaii* presentan este dominio en marcos de lectura abiertos que codifican para ATPasas que transportan cobre, reguladores transcripcionales y metalochaperonas para cobre. Se sugiere que este dominio es un nuevo componente en el tráfico de metales dentro de las células y en los mecanismos de resistencia a metales pesados (Ettema y col., 2003). Otros autores han descrito la existencia de dos genes que codifican para las putativas CopA y CopB de *S. solfataricus* y además investigaron los mecanismos moleculares de la ATPasa de tipo CopB de este microorganismo. Se demostró la funcionalidad del dominio fosfatasa mediante la capacidad de hidrolizar ATP con una mayor actividad a altas temperaturas, y además se demostró que esta actividad fue incrementada específicamente por Cu^{+2} . A pesar de los datos obtenidos, el papel biológico de esta proteína es desconocido debido a que no existen mutantes disponibles para estudiar este tipo de función *in vivo* (Deigweiher y col., 2004).

Recientemente se identificó un “cluster” de genes tipo *cop* que se encuentra conservado en varios genomas de arqueas que pertenecen al reino *Crenarchaeota* tales como *S. solfataricus*, *S. tokodaii* y *S. acidocaldarius*. Este “cluster” codifica para una metalochaperona (CopM), una ATPasa para cobre (CopA), y un nuevo regulador transcripcional (CopT) el cual controla la expresión de los genes *cop*. El regulador CopT de *S. solfataricus* tiene en el extremo N-terminal un dominio HTH de unión a ADN y en el extremo C-terminal un dominio TRASH. Los genes *copM* y *copA*, los cuales también presentan un dominio TRASH, se transcriben como una sola unidad y en respuesta a

concentraciones de cobre y cadmio que inhiben el crecimiento de este microorganismo. Ensayos de unión a ADN revelaron que CopT se une al promotor de *copMA*, pero no a su propio promotor. Además, el cobre modula específicamente la afinidad del regulador transcripcional por el ADN. Por lo tanto, este “cluster” tipo *cop* estaría jugando un rol importante en la respuesta a cobre en *S. solfataricus*. El rol de la proteína CopM no está claro, pero podría estar cumpliendo varias funciones como lo son el tráfico de metales dentro de la célula, regulando la actividad de CopA, o modulando la regulación transcripcional (Ettema y col., 2006).

En el arqueon *F. acidarmanus* también se han estudiado determinantes genéticos relacionados con la resistencia a cobre debido a que este microorganismo es un acidófilo aislado desde drenajes ácidos de minas donde las concentraciones de cobre son muy altas (0,4 g/l). Los genes *copMA* de este microorganismo (referidos como *copZB*) también son expresados como un mensajero policistrónico, y la expresión fue inducida al aumentar las concentraciones de cobre, y el gen *copT* (referido como *copY*) tampoco cambia su expresión frente a cobre. Complementario a lo anterior, el estudio proteómico de este microorganismo frente a altas concentraciones de cobre reveló una acumulación de proteínas de estrés involucradas en plegamiento de proteínas (subunidades del termosoma, chaperonas moleculares) y reparación del ADN. Probablemente, esto refleja una respuesta global para rescatar a las células del desplegamiento de proteínas y/o la formación de radicales libres (Baker-Austin y col., 2005).

1.6.2 Mecanismos de resistencia a otros metales en arqueas acidófilas

A pesar del bajo número de estudios relacionados con la tolerancia a metales pesados en arqueas acidófilas, otro metal que ha acaparado la atención de muchos autores es el arsénico. Esto debido a que el arqueón acidófilo *F. acidarmanus*, el cual es nativo de ambientes ricos y contaminados en arsénico, además de presentar una alta tolerancia a arsenito [As(III)] y arseniato [As(V)], podría estar involucrado en procesos de biolixiviación (Gihring y col., 2003). Estudios *in silico* indicaron la presencia de un homólogo a la bomba de eflujo ArsB, en varios genomas de microorganismos acidófilos, incluyendo a las arqueas *F. acidarmanus*, *Thermoplasma acidophilum* y *Thermoplasma volcanium*; pero no se encontró una homología significativa en *S. solfataricus* y *S. tokodaii* (Dopson y col., 2003). Además, en *F. acidarmanus* también se encontró el represor ArsR, que se encuentra en un simple operón con ArsB; y por otro lado este microorganismo no presenta genes homólogos a la reductasa tipo ArsC (Gihring y col., 2003).

En microorganismos del género *Sulfobus* no se han realizado muchos estudios referentes a mecanismos de resistencia a arsénico. Sólo en una cepa de *S. metallicus* denominada BC se ha descrito una actividad oxidasa de [As(III)] unida a membrana, la cual pudiera estar involucrada en resistencia a [As(V)]. Además, este microorganismo presentó una proteinasa dependiente de tetrionato con actividad reductora de [As(V)] (Sehlin y Lindström, 1992). Por lo tanto, las especies del género *Sulfolobus* podrían ser resistentes a arsénico vía una oxidasa de [As(III)], o alternativamente mediante una reductasa de [As(V)] que no presente homología con la reductasa tipo ArsC (Dopson y col. 2003).

Datos obtenidos por análisis bioinformáticos en *F. acidarmanus* son apoyados por resultados bioquímicos que indicaron que este microorganismo tolera hasta 13 mM de [As(III)] y [As(V)], aunque la reducción de este último no es observada, como tampoco la oxidación de arsenito [As(III)] a una forma menos tóxica, por lo tanto se sugiere que este microorganismo tiene un sistema de resistencia a arsénico desconocido (Gihring y col., 2003; Baker-Austin y col., 2007). Finalmente, se realizó un estudio proteómico en *F. acidarmanus* crecido en [As(III)], el cual reveló la expresión de proteínas asociadas al plegamiento de proteínas, tales como la chaperonina termosomal HSP60 y la proteína de estrés térmico DnaK. Este trabajo es el primer estudio de mecanismos de resistencia a arsénico mediante proteómica en arqueas acidófilas (Baker-Austin y col., 2007).

Uno de los metales más tóxicos para las células es el cadmio. A pesar de esto, no se han descrito mecanismos específicos de tolerancia para este metal en microorganismos acidófilos. En algunos microorganismos, el cadmio es captado vía transportadores de magnesio y manganeso (Revisado por Nies, 1999). Sólo algunos niveles de tolerancia a cadmio se han descrito en arqueas acidófilas (Tabla 1). En *Thermoplasma* spp. se encontró un homólogo a la ATPasa (CadA) presente en algunos Gram positivos, la cual elimina cadmio de las células (Dopson y col., 2003). Finalmente, estudios de tolerancia a zinc y níquel se han realizado en especies del género *Sulfolobus* (Miller y col., 1992) (Tabla 1), pero los mecanismos de tolerancia a estos metales no han sido aún elucidados (Dopson y col., 2003).

Basado en los antecedentes ya expuestos y en el gran interés por conocer los mecanismos de resistencia y tolerancia a metales pesados en arqueones utilizados en

biominería, en esta Tesis se propuso estudiar la respuesta a metales pesados, especialmente cobre, en *S. metallicus*. Adicionalmente, los resultados obtenidos permitirán aumentar el conocimiento acerca de la homeostasis de metales pesados en arqueas.

Por lo tanto, como hipótesis de trabajo se planteó que algunos metales tóxicos tienen un efecto sobre el metabolismo de los poliP y también sobre la expresión global de proteínas cuando el arqueón *S. metallicus* se enfrenta a estas condiciones. Para validar esta hipótesis nos propusimos como objetivo general estudiar el efecto que tienen algunos metales pesados, como el cobre y el cadmio, en el metabolismo de los polifosfatos y en la expresión global de proteínas posiblemente relacionadas con la homeostasis de estos metales, en el arqueón *S. metallicus*.

Finalmente nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar los niveles de poliP y actividad PPX en *S. metallicus*.
- Determinar si existe una relación entre la tolerancia a metales pesados (cobre y cadmio) y el metabolismo de los poliP en *S. metallicus*.
- Estudiar los cambios globales en la expresión de proteínas de *S. metallicus* frente a metales pesados (cobre y cadmio). Además de identificar y caracterizar las proteínas que cambien su expresión frente a estas condiciones.

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas, medios y condiciones de cultivo

2.1.1 Cepas del género *Sulfolobus*

Se utilizaron las cepas DSM 6482 de *S. metallicus*, DSM 639 de *S. acidocaldarius* y DSM 1617 de *S. solfataricus*.

2.1.2 Cepas bacterianas

Se utilizó la bacteria *E. coli* NR100, la cual es una cepa BL21 (DE3), transformada con un vector de expresión de tipo pET-21b(+) que contiene como inserto el gen *PPK1* de *E. coli* fusionado a un péptido de 6 histidinas (*PPK1r*) para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad (Ault-Riché y col., 1998). La cepa fue proporcionada por el Dr. Arthur Kornberg.

2.1.3 Medios y condiciones de cultivo

2.1.3.1 Medios y condiciones de cultivo para *S. metallicus*, *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*

S. metallicus se creció a 65 °C y 120 rpm (agitación orbital) en medio 88 ajustado a pH 2, que contiene 1,3 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,28 g/l KH₂PO₄, 0,25 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 0,07 g/l CaCl₂ x 2 H₂O y 0,02 g/l FeCl₃ x 6 H₂O, 1,8 mg/l MnCl₂ x 4 H₂O, 4,5 mg/l Na₂B₄O₇ x 10 H₂O, 0,22 mg/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,05 mg/l CuCl₂ x 2 H₂O, 0,03 mg/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,03 mg/l VOSO₄ x 2 H₂O y 0,01 mg/l CoSO₄ x 7 H₂O. El medio fué suplementado con 0,05 % (p/v) de azufre elemental y 0,02 % (p/v) de extracto de levadura. El inóculo se realizó al 10 % (v/v).

S. acidocaldarius se creció a 70 °C y 180 rpm (agitación orbital) en el mismo medio utilizado para *S. metallicus*. La diferencia es que el medio se suplementó con 0,1 % (p/v) de extracto de levadura y 0,2 % (p/v) de sacarosa según Skórko y col., (1989). El inóculo se realizó al 5 % (v/v).

S. solfataricus se creció a 70 °C y 180 rpm en medio 182 ajustado a pH 4,2, que contiene 3,1 g/l KH_2PO_4 , 2,5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ y 0,25 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, y como trazas contiene 1,8 mg/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$, 0,22 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,05 mg/l $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 mg/l $\text{VOSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ y 0,01 mg/l $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$. El medio es suplementado con 0,1 % (p/v) de extracto de levadura y 0,1 % (p/v) de casaminoácidos. El inóculo se realizó al 5 % (v/v).

2.1.3.2 Condiciones de cultivo para los ensayos con metales pesados en *S. metallicus* y

S. solfataricus

Condiciones de cultivo para los ensayos de tolerancia a cobre y cadmio en *S. metallicus* y *S. solfataricus*

Para el estudio de la tolerancia a cobre en *S. metallicus* y *S. solfataricus*, los microorganismos se crecieron en sus respectivos medios que contenían desde el inicio diferentes concentraciones de CuSO_4 que fueron desde 5 hasta 200 mM. Para el estudio de la tolerancia a cadmio en *S. metallicus* y *S. solfataricus*, los microorganismos se crecieron en sus respectivos medios que contenían desde el inicio diferentes concentraciones de CdSO_4 que fueron desde 0,01 hasta 10 mM. El crecimiento se determinó contando el número de células utilizando una cámara Petroff-Hauser.

Condiciones de cultivo para los ensayos de traspaso a cobre y cadmio en *S. metallicus*

Para los estudios de traspaso a metales pesados, *S. metallicus* se creció en ausencia de cobre y cadmio hasta fase estacionaria temprana, que corresponde a 10^8 células/ml. Posteriormente, el medio fue removido de las células mediante centrifugación. Las células se traspasaron a un nuevo medio que contenía 0, 10, 20 o 100 mM de CuSO_4 , como también a un nuevo medio conteniendo 0, 5, 10 o 20 mM CdSO_4 . Como condición control las células se traspasaron a 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Posterior al traspaso, se tomaron alícuotas en diferentes tiempos para la determinación de los niveles de poliP y la actividad degradadora de los poliP (PPX).

Condiciones de cultivo para los ensayos de expresión diferencial de proteínas en *S. metallicus*

Para los ensayos de expresión diferencial de proteínas, *S. metallicus* se creció en ausencia de cobre y cadmio hasta fase estacionaria temprana. A los cultivos se les agregó 100, 200 mM de CuSO_4 o 5 mM de CdSO_4 , y se dejaron crecer durante 24 h. Las células obtenidas por centrifugación se trataron para la obtención de extractos totales de proteínas.

2.1.3.3 Medios y condiciones de cultivo para E. coli

La bacteria *E. coli* NR100 se creció a 37 °C y 200 rpm (agitación orbital) en medio Luria-Bertani (LB; 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl) (Sambrook y Russell, 2001) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina, hasta alcanzar una A_{600} de 0,6. Luego se agregó IPTG a una concentración 1 mM final y se dejó crecer

2 h más para inducir la expresión del gen *ppk*. Finalmente, las células se centrifugaron para la posterior purificación de la PPK recombinante.

2.2 Síntesis y purificación de poliP *in vitro*

2.2.1 Síntesis *in vitro* de [γ -P³³]poliP₇₅₀ catalizada por la PPK recombinante de *E. coli*

La síntesis *in vitro* de [γ -P³³]poliP₇₅₀ se realizó según Ault-Riché y col. (1998), en un volumen de 10 ml de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 40 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, 40 mM creatina-fosfato, 20 μ g/ml creatina fosfoquinasa (CPK), 1 mM [γ -P³³]ATP (0,01 μ Ci/nmol) y 90.000 unidades de PPKr de *E. coli* (Kumble y col., 1996). La reacción se incubó 3 h a 37 °C y se detuvo agregando 1 ml de 0,5 M EDTA. La cinética de reacción se siguió mediante TLC ascendente en placas de polietilenimidacelulosa (SIGMA-ALDRICH®) utilizando como solvente una solución 0,75 M KH₂PO₄, pH 3,5.

2.2.2 Purificación de [γ -P³³]poliP₇₅₀ sintetizado *in vitro*

La reacción de síntesis de 10 ml se cargó en un colchón de 55 ml de 2,5 M CsCl en 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA. La centrifugación se realizó durante 16 h a 100.000 \times g (rotor Sorval® 647.5). El gradiente se dividió en alícuotas de 5 ml, y a cada una de ellas se le determinó la radiactividad emitida (cpm). A las alícuotas que presentaron mayor radiactividad se les agregó 3,5 ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min para precipitar el poliP, seguido de una centrifugación por 30 min a 16.000 \times g (rotor Beckman® AJ-20). Los sedimentos se

lavaron con 3,5 ml de etanol al 70 %, se secó durante la noche al vacío a temperatura ambiente y se resuspendió en 600 μ l de agua bidestilada estéril. La concentración de poliP se determinó en alícuotas de 1 μ l en un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments LS 5000 TD, Fullerton, EUA). Típicamente se obtuvieron soluciones de entre 8 y 20 mM de $[\gamma\text{-P}^{33}]$ poliP₇₅₀.

2.2.3 Análisis del $[\gamma\text{-P}^{33}]$ poliP₇₅₀ sintetizado *in vitro*

El análisis del poliP sintetizado *in vitro* se realizó mediante la hidrólisis del polímero utilizando la PPX de *S. cerevisiae* (PPXSce) según lo descrito previamente (Wurst y col., 1995; Cardona y col., 2001). El ensayo se realizó en un volumen de 20 μ l conteniendo 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM Mg(CH₃COO)₂, 50 mM NH₄(CH₃COO)₂, 200 μ M $[\gamma\text{-P}^{33}]$ poliP₇₅₀ y 6.000 unidades de PPXSce (Wurst y col., 1995). La reacción se incubó a 37 °C y la cinética de reacción se siguió mediante TLC.

2.3 Métodos de extracción y cuantificación de poliP

2.3.1 Extracción de poliP endógeno de *S. metallicus*, *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*

La extracción de poliP se realizó según Ault-Riché y col. (1998). A los tiempos correspondientes, alícuotas de 100 ml de cultivos provenientes desde *S. metallicus*, y alícuotas de 10 ml desde *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* se centrifugaron durante 10 min a 9.800 \times g. Los sedimentos tienen aproximadamente 4 mg de células (peso húmedo). Los sedimentos se resuspendieron en 0,3 ml de 4 M GITC, 50 mM Tris-HCl

pH 7,0 calentado previamente a 95 °C. La suspensión se mezcló por vortex y se incubó a 95 °C por 3 min para conseguir una lisis rápida. Se reservó una alícuota de 15 µl de esta fracción para la determinación de proteínas. A cada tubo se agregó 30 µl de 10 % SDS y luego de incubación a 95 °C durante 2 min, se agregó 300 µl de 96 % etanol y 5 µl de una suspensión de microperlas de vidrio Glassmilk® (Bio 101). Luego de agitación por vortex y de incubar 30 s a 95 °C, los tubos se centrifugaron a 13.000 x g durante 1 min y el sedimento de Glassmilk® se resuspendió por vortex en 0,5 ml de “buffer New Wash” (5 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 % etanol) frío en hielo y se centrifugó a 13.000 × g durante 30 s. El sedimento que contenía el poliP, ADN y ARN unido a Glassmilk®, se resuspendió en 100 µl de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7,0, 5 mM MgCl₂, 5 µg/ml de DNasa y 5 µg/ml de RNasa y se incubó a 37 °C por 30 min. Luego el sedimento se lavó dos veces con 200 µl de “buffer New Wash” frío en hielo para eliminar los productos de la degradación de los ácidos nucleicos. El poliP unido a Glassmilk® se eluyó en dos pasos resuspendiendo el sedimento por vortex en 50 µl de agua cada vez, incubando 2 min a 95 °C y centrifugando a 13.000 × g para tomar el sobrenadante. El poliP soluble recuperado en esta fracción (100 µl) se congeló a -20 °C hasta su cuantificación.

2.3.2 Purificación de la PPK recombinante de *E. coli*

La PPKr de *E. coli* se purificó desde la cepa NR100 por afinidad a Ni⁺², de acuerdo a lo descrito por Tzeng y Konberg (2000). La cepa se cultivó en 1 L de medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Las células se colectaron por

centrifugación durante 20 min a $4.500 \times g$, y el sedimento se resuspendió en 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM $MgCl_2$ a una proporción de 3 ml/g de células (peso húmedo). Se realizó una ruptura celular mediante tratamiento con lisozima (250 $\mu g/ml$), seguido de 3 ciclos de congelamiento y descongelamiento en hielo seco, más 1 min de sonicación (Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR®). Se agregó secuencialmente y en concentraciones finales los siguientes compuestos: 1 M KCl, 100 mM Na_2CO_3 y 0,05 % Triton X-100, y luego se incubó durante 2 h a 4 °C, para así liberar a la PPKr de las membranas. Se centrifugó 20 min a $40.000 \times g$ y el sobrenadante se aplicó a una columna con resina "His Bind" (Novagen) cargada con $NiSO_4$, equilibrada con 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 % (v/v) glicerol, 5 mM $MgCl_2$, 0,05 % Triton X-100 y 100 mM imidazol. La elusión se realizó en la misma solución con 1 M EDTA. La muestra se dializó contra 50 mM Tris pH 7,4, 1 mM DTT, 10 % glicerol y se almacenó a -80 °C.

2.3.3 Cuantificación de poliP

La reacción se realizó según Ault-Riché y col. (1998) utilizando la actividad reversa de la PPKr de *E. coli* en exceso de ADP (Kumble y col., 1996). El ensayo se realizó en un volumen final de 50 μl en amortiguador 50 mM Hepes-KOH pH 7,2, 40 mM $(NH_4)_2SO_4$, 4 mM $MgCl_2$, 0,1 mM ADP, 2.500 unidades de la PPKr y 5 μl de solución conteniendo el poliP por determinar. La incubación se realizó por 90 min a 37 °C. La reacción se interrumpió por calentamiento (2 min a 95 °C) y luego la mezcla se diluyó 1:20, 1:50, 1:200 y 1:500. Alícuotas de 50 μl de estas diluciones se ensayaron

con 50 μ l de luciferasa (Roche[®]), en placas de 96 pocillos. El ATP generado por la PPK se cuantificó midiendo la luz emitida en un luminómetro Lumi/96 de Bioscan[®].

2.4 Determinación de la actividad degradadora de los poliP (tipo PPX) y análisis de los productos de la reacción

2.4.1 Determinación de la actividad degradadora de los poliP (tipo PPX)

La actividad PPX se determinó midiendo el fosfato que se obtiene debido a la hidrólisis del [γ -P³³]poliP₇₅₀ según lo descrito por Cardona y col. (2002), con las siguientes modificaciones. La mezcla de reacción (50 μ l) contenía 50 mM Tris-acetato pH 7,0, 1 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 50 μ g de extracto de proteína y 250 μ M [γ ³³]poliP₇₅₀. El MnCl₂ se agregó al final para evitar la precipitación del poliP. Luego de incubar 60 min a 65 °C, se tomaron 4 μ l de cada reacción, los que se aplicaron en una TLC como se describió en el punto 2.2.1. Las manchas obtenidas por el fosfato producido se visualizaron y cuantificaron utilizando un equipo Phosphor imager (Molecular Imagen FXTM System, Bio-Rad) y se extrapolaron a una curva de calibración de [P³³] ortofosfato. Una unidad se definió como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 pmol de ortofosfato (Pi) a partir de poliP por min a 65 °C.

2.4.2 Obtención de [P³³] ortofosfato para calibrar la medición de la actividad degradadora de poliP (tipo PPX)

Para disponer de un estándar de ortofosfato (Pi) marcado radiactivamente con P³³ que permitió la cuantificación de la actividad degradadora de los poliP, se realizó una

hidrólisis ácida del $[\gamma\text{-P}^{33}]\text{poliP}_{750}$ sintetizado *in vitro*. Para ello se tomó una cantidad conocida de $[\gamma\text{-P}^{33}]\text{poliP}_{750}$ y se incubó durante 1,5 h a 98 °C en presencia de 1 M HCl pH 1,3, completando un volumen total de 200 μl . El progreso de la hidrólisis se siguió mediante TLC. El $[\text{P}^{33}]\text{ortofosfato}$ de concentración conocida, se utilizó para la preparación de una curva de calibración de pmoles de $[\text{P}^{33}]\text{ortofosfato}$ con respecto a la intensidad de la radiactividad, la cual fue cuantificada en un equipo Phosphor imager (Molecular Imagen FX™ Systems) luego de su exposición en una pantalla K-Screen.

2.5 Fraccionamientos celulares

2.5.1 Preparación de extractos crudos de *S. metallicus* para la determinación de la actividad degradadora de poliP (tipo PPX)

Para determinar la actividad tipo PPX en extractos crudos de *S. metallicus*, células provenientes desde cultivos crecidos hasta fase estacionaria temprana (10^8 células/ml), o desde cultivos traspasados a distintas concentraciones de CuSO_4 , CdSO_4 o a 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se colectaron por centrifugación durante 15 min a $7.700 \times g$. Las células se lavaron con medio 88 para remover el azufre. Luego las células se resuspendieron en un amortiguador que contine 50 mM Tris-acetato pH 7,0, 10 % sacarosa (razón 20 μl de amortiguador por 1 mg de peso húmedo de células), se congelaron y se sonicaron (Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR®) 8 veces durante 30 s cada vez. Las suspensiones finales (lisados) se centrifugaron a $4.300 \times g$ durante 5 min para eliminar las células enteras, y el sobrenadante se utilizó para determinar la actividad tipo PPX.

2.5.2 Preparación de extractos crudos de *S. metallicus* para electroforesis bidimensional de proteínas

Para realizar el isoelectroenfoque de la electroforesis bidimensional de los extractos crudos de *S. metallicus*, células provenientes desde cultivos crecidos hasta fase estacionaria temprana (10^8 células/ml), o desde cultivos traspasados a 100, 200 mM de CuSO_4 , o a 5 mM CdSO_4 , se colectaron por centrifugación durante 15 min a $7.700 \times g$. Las células se lavaron con medio 88 para remover el azufre. Luego las células se resuspendieron en un amortiguador que contine 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g/ml}$ PMSF pH 8,15 (razón 20 μl de amortiguador por 1 mg de peso húmedo de células), se congelaron y se sonicaron (Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR[®]) 6 veces durante 30 s cada vez. Las suspensiones finales (lisados) se centrifugaron a $9.800 \times g$ durante 5 min para eliminar las células enteras. A los sobrenadantes se les determinó la concentración de proteínas, y posteriormente se utilizaron en el isoelectroenfoque.

2.5.3 Obtención de fracción de membranas totales de *S. metallicus*

El procedimiento se realizó similarmente a lo descrito por Guiliani y Jerez (2000). El extracto crudo obtenido según el punto 2.5.1 se sometió a centrifugación a $100.000 \times g$ durante 2 h. El sobrenadante de esta centrifugación constituyó la fracción de proteínas soluble (fracción citoplasmática). El sedimento, que representa la fracción de membranas totales, se lavó en su superficie con 50 mM Tris (pH 7), 10 % sacarosa, para eliminar los contaminantes de la fracción soluble, y finalmente se resuspendió en 200 μl de la misma solución.

2.6 Determinación del eflujo de Pi en *S. metallicus*

2.6.1 Marcación *in vivo* de *S. metallicus* con $H_3^{32}PO_4$

Las células se crecieron en medio 88 suplementado con 0,05 % (p/v) de azufre elemental y 0,02 % (p/v) de extracto de levadura hasta fase exponencial media en condiciones suficiente de Pi (2 mM de Pi). Para la marcación, las células se centrifugaron y concentraron a una densidad de 10^{10} células/ml en un medio nuevo con una baja concentración de Pi (0,2 mM de Pi), para así favorecer la incorporación de la marca. A esta suspensión celular (5 ml) se le agregó 100 μ Ci/ml de $H_3^{32}PO_4$ y se incubó durante 20 h a 65 °C con agitación orbital. Finalmente, las células marcadas radiactivamente se colectaron por centrifugación.

2.6.2 Determinación del eflujo de Pi

Las células marcadas con ^{32}P i se lavaron exhaustivamente (5 veces) mediante resuspensión y centrifugación con nuevo medio 88 conteniendo condiciones suficientes de Pi (2 mM de Pi) para eliminar la marca radiactiva no incorporada. Finalmente, las células se resuspendieron en el mismo medio alcanzando un número de 10^8 células/ml, en presencia o ausencia de $CuSO_4$. Con el fin de determinar el aumento de ^{32}P i liberado al medio, se tomaron muestras de 1,5 ml periódicamente, las que se centrifugaron a $12.000 \times g$ por 10 min y se determinó la radiactividad liberada hacia el medio contenida en el sobrenadante mediante un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments LS 5000 TD, Fullerton, EUA).

2.6.3 Visualización de especies de fosfato marcadas con ^{32}P i

Los mismos sobrenadantes cuantificados en el punto 2.6.2 se analizaron mediante TLC tal como se describió en el punto 2.2.1., y además se agregó ^{32}P i como estandar. Después de la corrida se visualizaron especies de fosfato marcadas con ^{32}P i presentes en el sobrenadante utilizando el equipo Phosphor imager.

2.7 Determinación de la captación de cobre en *S. metallicus*

2.7.1 Marcación *in vivo* de *S. metallicus* con ^{64}Cu

Las células se crecieron en medio 88 suplementado con 0,05 % (p/v) de azufre elemental y 0,02 % (p/v) de extracto de levadura hasta fase exponencial media. Para la marcación, las células se centrifugaron y se resuspendieron alcanzando 10^7 células en 300 μl de medio 88 fresco sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las células se marcaron con 5 μM ^{64}Cu durante 10 h. Como control de marcación se utilizó la bacteria *Enterococcus faecalis* en medio PBS (pH 7), la cual se marcó con la misma concentración de Cu y durante el mismo tiempo.

2.7.2 Determinación de la captación de cobre

Las células marcadas con ^{64}Cu se lavaron mediante resuspensión y centrifugación con medio 88 fresco conteniendo 500 μM CuSO_4 una vez, y con medio 88 fresco dos veces. Para el caso del control *E. faecalis*, los lavados se realizaron con 500 μM CuSO_4 una vez, 500 μM EDTA una vez y Glicina pH 3 una vez. El ^{64}Cu

incorporado se determinó mediante un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments LS 5000 TD, Fullerton, EUA).

2.8 Técnicas de microcopía

2.8.1 Microscopía electrónica de transmisión

El análisis visual de células sin teñir de *S. metallicus* y *S. solfataricus* para determinar la presencia de gránulos densos al paso de los electrones (gránulos de poliP) se realizó según González y Jensen (1998). Células provenientes de cultivos crecidos hasta fase estacionaria temprana desde varias condiciones de crecimiento se lavaron con agua bidestilada estéril. Luego las células se resuspendieron a una A_{600} de 0,5 y alícuotas de 10 μ l de las suspensiones celulares se aplicaron sobre grillas de níquel cubiertas con carbón, dejándolas sedimentar. El exceso de líquido se absorbió con papel de filtro y las grillas se secaron al aire; este procedimiento se repitió 2 veces. Para el análisis, las células se observaron con un microscopio electrónico de transmisión (Philips Tecnai 12) operado a 80 kV.

2.8.2 Espectroscopía de pérdida de energía del electrón (EELS)

El análisis de EELS (Lünsdorf y col., 2000) se realizó con un microscopio electrónico de transmisión de energía-filtrada integrado Zeiss CEM 902 (EFTEM). El microscopio funcionó en el modo de proyección de imagen espectroscópica del electrón (ESI) para la representación del fosfato, y el EELS paralelo se realizó para el registro del espectro con la ayuda del programa ESI-Vision (Soft Imaging Systems, Münster,

Alemania). Se utilizaron los ajustes de abertura según lo descrito por Lünsdorfy col. (2000). La hidroxilapatita comercial se utilizó como estándar interno de fosfato (Chávez y col., 2004).

2.9 Métodos de análisis de proteínas

2.9.1 Determinación cuantitativa de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó según el método de Bradford (1976) utilizando el sistema comercial Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce).

2.9.2 Electroforesis bidimensional de proteínas (Electroforesis 2D)

2.9.2.1 Preparación de la muestra para el isoelectroenfoque (IEF)

Los extractos crudos obtenidos en el punto 2.5.2 se utilizaron para realizar el isoelectroenfoque. Para cada muestra, 250 μ l de un amortiguador IEF de rehidratación que contiene algunas modificaciones al descrito por Choe y Lee (2000) y Hatzimanikatis y col. (1999), compuesto por 8 M urea, 2 M tiourea, 2 % (p/v) CHAPS, 0,27 % (v/v) anfolitos Bio-Lyte[®] 3-10, 0,13 % (v/v) anfolitos Bio-Lyte[®] 5-8, y 0,001 % (p/v) azul de bromofenol, se incubaron a 25 °C durante 30 min. Luego al amortiguador IEF se le agregó 0,03 g de DTT (64,5 mM concentración final). Entre 120 y 500 μ g de proteínas de los extractos crudos, y agua nanopura estéril se agregó al amortiguador IEF para alcanzar un volumen de 300 μ l finales. Las muestras conteniendo el amortiguador IEF y las distintas cantidades de proteínas se incubaron a temperatura ambiente por 1 h, pasado este tiempo los 300 μ l se agregaron con una micropipeta a la bandeja de focalización de proteínas. Los geles inmovilizados RadySrips IPG (Biorad) de 11 cm de largo, con

rangos de pH 3-10 no lineal (NL) y 5-8, se ponen en contacto con la muestra y el amortiguador de rehidratación IEF, y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente se agregó 2,5 ml aceite mineral con una pipeta sobre cada gel inmovilizado para prevenir la deshidratación y precipitación de la urea.

2.9.2.2 Isoelectroenfoque (Primera Dimensión)

La corrida del isoelectroenfoque se programó en el PROTEAN IEF (Biorad) con una temperatura fija de 20 °C en la plataforma de Peltier. La rehidratación de los geles inmovilizados se realizó con un programa en condiciones pasivas (sin voltaje) durante 18 h. Luego del tiempo de rehidratación el programa de focalización comenzó automáticamente. El programa de focalización contiene un paso 1 a 250 V por 15 min, una paso 2 a 2.000 V por 2 h, un paso 3 a 8.000 V por 4 h, un paso 4 a 10.000 V por 11 h, y un paso 5 a 50 V por 4 h, y alcanzó un total de 120.00 V/h.

2.9.2.3 Equilibrio de los geles inmovilizados ReadyStrip IPG

Para preparar lo geles inmovilizados para la segunda dimensión, estos se quitaron de la bandeja de focalización y se traspasaron a otra bandeja especial para ser equilibrados. El equilibrio se realizó con algunas modificaciones según lo descrito por Hatzimanikatis y col. (1999). En una primera etapa los geles inmovilizados se equilibraron con 2,5 ml de un amortiguador compuesto por 24 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M urea, 2 % (p/v) SDS, 30 % (v/v) glicerol y 156 mM DTT, durante 15 min. Luego los geles inmovilizados se secaron con toalla nova y se equilibraron con 2,5 ml de un segundo amortiguador compuesto por 24 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 M urea, 2 % (p/v)

SDS, 30 % (v/v) glicerol y 135 mM yodoacetamida. Finalmente, los geles inmovilizados se secaron nuevamente, y se dejaron con 2.5 ml de amortiguador de electroforesis de proteínas compuesto por 250 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina y 1 % (p/v) SDS, hasta que fueron corridos en la segunda dimensión.

2.9.2.4 SDS-PAGE (Segunda Dimensión)

Los geles inmovilizados se transfirieron a geles SDS-PAGE, con porcentajes de 11,2 % acrilamida y 0,3 % bisacrilamida, y 14,6 % acrilamida y 0,4 % bisacrilamida, y se cubrieron con 1 % agarosa en amortiguador de electroforesis de proteínas, luego de aplicar el patrón de peso molecular (BenchMark™ Ladder, Invitrogen). Los geles se corrieron toda la noche a un voltaje constante de 70 V.

2.9.2.5 Tinciones de los geles bidimensionales

Tinción con plata de los geles bidimensionales

La tinción con plata se realizó según lo descrito por Shevchenko y col. (1996), con las siguientes modificaciones. Luego de la electroforesis los geles se fijaron con 30 % (v/v) de etanol, 10 % (v/v) de ácido acético en agua destilada durante toda la noche. Después se lavaron tres veces con 30 % (v/v) de etanol en agua destilada durante 20 min, y adicionalmente una vez con agua durante 15 min para remover el ácido remanente. Los geles se sensibilizaron durante 1 min en una solución que contiene 0,25 g/l de ditionito, y estos se lavaron con dos cambios de agua destilada durante 1 min cada uno. Posterior al lavado, los geles se sumergieron en una solución de 0,2 % (p/v) de AgNO₃, 1 mM formaldehído, y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. La

solución de AgNO_3 se descartó y los geles se lavaron con agua destilada por 1 min. Los geles se desarrollaron con una solución que contiene 6 % (p/v) de Na_2CO_3 , 6 mM formaldehído, 20 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y se agitó vigorosamente hasta que la solución adquirió un color amarillo. En este momento se descartó la solución y se reemplazó por una porción fresca. Es fundamental que el desarrollo se realice en una solución transparente. Una vez que se adquirió la intensidad deseada, la solución de desarrollo se descartó, se agregó 5 % (v/v) de ácido acético en agua destilada, y se dejó en agitación por 10 min. Finalmente, los geles se lavaron cuatro veces con agua destilada, y se guardaron a 4 °C en 1 % (v/v) de ácido acético en agua destilada hasta ser utilizados.

Tinción con azul de Coomasie G-250 de los geles bidimensionales

La tinción con azul de Coomasie coloidal G-250 se realizó según lo descrito por Giavalisco y col. (2005), con las siguientes modificaciones. Luego de la electroforesis los geles se fijaron con 50 % (v/v) de etanol, 2 % (v/v) de ácido fosfórico en agua destilada durante toda la noche. Después se lavaron dos veces con agua destilada por 1 min cada vez. Posterior al lavado, los geles se sumergieron en una solución de 34 % (v/v) de metanol, 15 % (p/v) de sulfato de amonio, 2 % (v/v) de ácido fosfórico en agua destilada durante 1 h. Se agregó 0,25 g de azul de Coomasie coloidal en la solución de 250 ml que contiene a los geles, y se agitó gentilmente a temperatura ambiente durante 24 h. Finalmente, los geles se destiñeron con dos lavados utilizando agua destilada.



Tinción con SYPRO® de los geles bidimensionales.

La tinción con SYPRO® (Biorad) se realizó según lo descrito por el manual de instrucciones de los productores, con las siguientes modificaciones. Luego de la electroforesis los geles se fijaron con 10 % (v/v) de metanol, 7 % (v/v) de ácido acético en agua destilada durante 30 min, y después se lavaron con agua destilada por 1 min. Se agregó a los geles 200 ml de la tinción fluorescente SYPRO®, y se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 90 min. Se eliminó la tinción fluorescente, y los geles se traspasaron a una solución con 10 % (v/v) metanol, 7 % (v/v) ácido acético en agua destilada durante 60 min para eliminar el exceso de fluorescencia que pueden tener los geles. Para obtener las imágenes, los geles se lavaron con agua, y se utilizó un transiluminador con luz ultravioleta.

2.9.2.6 Identificación, selección y secuenciación de proteínas por espectrometría de masas

Las intensidades de las señales de las proteínas que cambiaron su expresión en los geles bidimensionales de los extractos crudos de *S. metallicus* en condiciones normal y después de traspasarlo a cobre se determinaron usando el programa computacional de análisis de imágenes de geles bidimensionales "Delta 2D software package" (DECODON GmbH, Alemania). Se tomaron 18 proteínas desde los geles bidimensionales obtenidos de la condición con 100 mM CuSO₄ y se enviaron para su posterior secuenciación mediante espectrometría de masas (MS) con un equipamiento de ionización por electro-spray y un analizador de tiempo de vuelo (ESI-QUAD-TOF). Las

muestras se procesaron en el Centro de Proteómica de la Universidad de Cambridge (UK). Los datos de los iones MS/MS producidos con este método se utilizaron para identificar las proteínas mediante su búsqueda en las bases de datos de secuencias aminoacídicas de las proteínas (Mascot, Matrix Science). Los parámetros de tolerancia del péptido (± 2 Da) y la tolerancia de MS/MS (± 1.2 Da) se limitaron y el tipo de instrumento se fijó en ESI-QUAD-TOF. Las búsquedas se realizaron contra toda la base de datos de NCBI debido a que no existe la secuencia del genoma de *S. metallicus*.

3.0 RESULTADOS

3.1 Metabolismo de los poliP en *S. metallicus*

3.1.1 Los poliP inorgánicos en *S. metallicus*

3.1.1.1 Observación microscópica de los gránulos de poliP en microorganismos del género *Sulfolobus*

Una de las formas de observar los poliP es examinar mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) la presencia de gránulos densos al paso de los electrones en células no teñidas. Estos gránulos se han descrito frecuentemente como acumulaciones de poliP (Wood y Clark, 1988; Harold, 1966). Cuando se analizaron células de *S. solfataricus* (Figura 4A) y *S. acidocaldarius* (datos no mostrados), algunas presentaron débiles y pequeños gránulos densos a los electrones de forma esférica. En contraste, todas las células de *S. metallicus* (Figura 4B) presentaron entre dos y tres grandes gránulos densos a los electrones.

3.1.1.2 Análisis de los gránulos en microorganismos del género *Sulfolobus*

Para obtener detalles acerca de la composición de los gránulos densos a los electrones se utilizó espectroscopía de pérdida de energía de los electrones (EELS), la cual permite un análisis más detallado de un compuesto químico en particular (Lünsdorf y col., 2000; Chávez y col., 2004). La Figura 5 muestra los espectros de pérdida de energía obtenidos desde áreas celulares que contenían gránulos densos a los electrones en *S. metallicus* (espectro azul) y *S. acidocaldarius* (espectro rojo). Después de la substracción del ruido y filtrado de los espectros se muestra que el perfil del espectro de

S. metallicus (azul) es muy similar al del patrón de hidroxilapatita (verde), el cual se usa como fosfato de referencia (Figura 5).

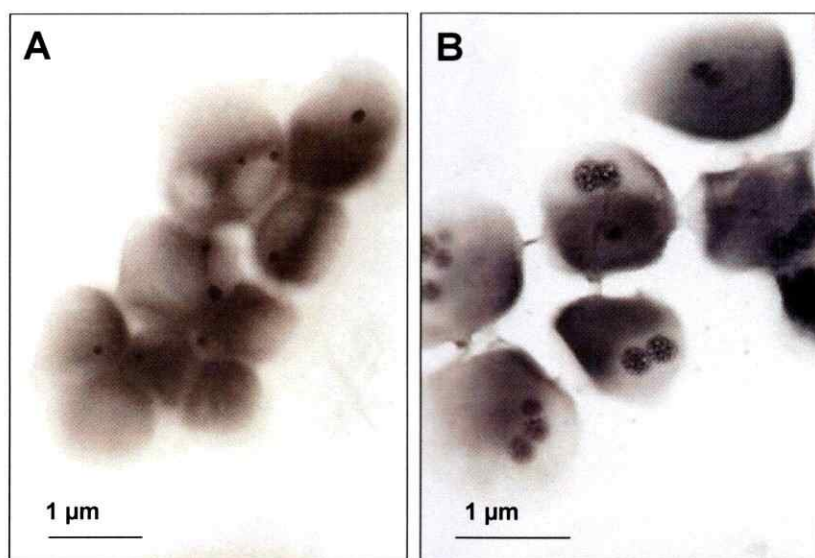


Figura 4. Presencia de gránulos densos al paso de los electrones en miembros del género *Sulfolobus*. Las células de *S. solfataricus* (A) o *S. metallicus* (B) crecidas hasta fase estacionaria temprana se analizaron mediante microscopía electrónica.

El inicio de la energía de ionización de la franja L2,3 coincide en los 135 eV para los tres espectros, seguido por la característica pérdida de energía cerca de las estructuras de los extremos (ELNES) con la región de pérdida de energía más alta alrededor de los 50 eV (indicado con una barra en la Figura 5). Los tres máximos principales están presentes en todos los espectros obtenidos, aunque las intensidades del espectro de *S. acidocaldarius* (rojo) fueron muy débiles (Figura 5), y al mismo tiempo similares a las intensidades obtenidas en *S. solfataricus* (datos no mostrados). A pesar que los máximos III de los espectros son menores a los que muestra la hidroxilapatita (Figura 5) demostramos que los gránulos densos a los electrones acumulados por *S. metallicus*

están principalmente compuestos por fosfato y es muy probable que correspondan a poliP.

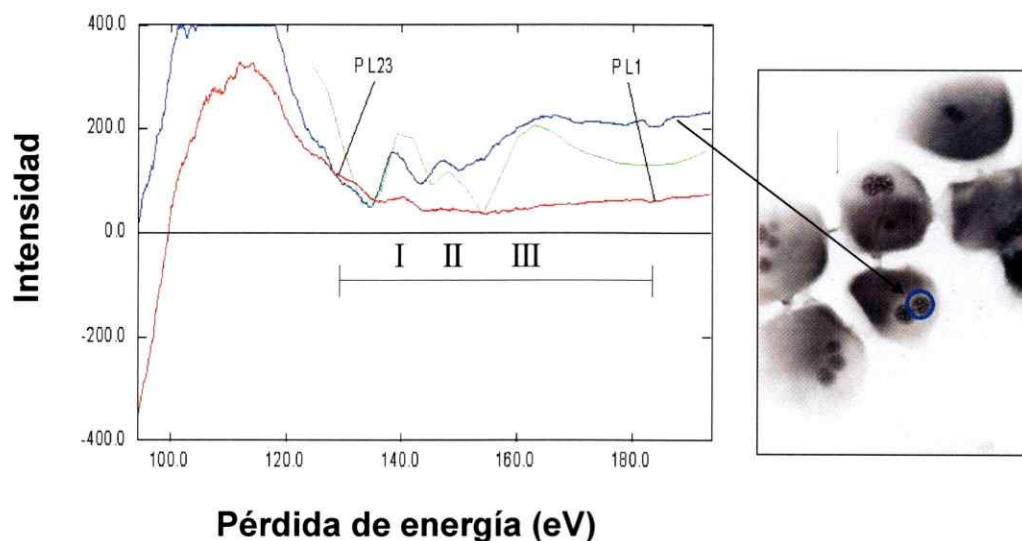


Figura 5. Espectros EELS de células de *S. metallicus* y *S. acidocaldarius*. Comparación de los espectros de los gránulos densos a los electrones desde *S. metallicus* (azul) y *S. acidocaldarius* (rojo). El espectro de hidroxilapatita de calcio (verde) se utilizó como control de fosfato.

3.1.1.3 Análisis cuantitativo de los poliP en microorganismos del género *Sulfolobus*

Para determinar si la presencia los gránulos densos a los electrones compuestos de fosfato tiene relación con los niveles de poliP, se cuantificó este biopolímero en las mismas condiciones y medios de cultivo empleados en las observaciones de microscopía electrónica en *S. metallicus*, *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*. Esta metodología se basa en la conversión enzimática del poliP, previamente extraído de las células, a ATP mediante la utilización de la PPKr de *E. coli* en exceso de ADP y posterior cuantificación de ATP mediante la producción de luz en presencia de

luciferina/luciferasa (Ault-Riché y col., 1998). Los tres microorganismos sintetizaron poliP, alcanzando los mayores valores en la fase estacionaria de crecimiento (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de poliP y número de células alcanzados en la fase estacionaria de crecimiento en microorganismos del género *Sulfolobus*.

Microorganismo	PoliP (nmoles poliP/mg proteína)	Crecimiento (células/ml)
<i>S. metallicus</i>	180	2×10^8
<i>S. acidocaldarius</i>	15	8×10^9
<i>S. solfataricus</i>	20	4×10^9

La síntesis de poliP en *S. metallicus* se incrementó al avanzar la etapa de crecimiento (Figura 6). Este comportamiento también se observó en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* (datos no mostrados). Los niveles de acumulación de poliP alcanzados en *S. metallicus* (Tabla 2 y Figura 6) fueron mayores a los descritos en otros microorganismos, como *E. coli* que no forma gránulos de poliP visibles bajo condiciones normales de crecimiento (Kornberg y col., 1999). Este alto nivel de poliP demostrado en *S. metallicus* es aproximadamente 10 veces mayor a los que presentaron *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* (Tabla 2). Estos resultados confirman que la acumulación de los gránulos densos al paso de los electrones compuestos de fosfato en *S. metallicus* es posiblemente debida a los altos niveles poliP inorgánicos presentes en este microorganismo.

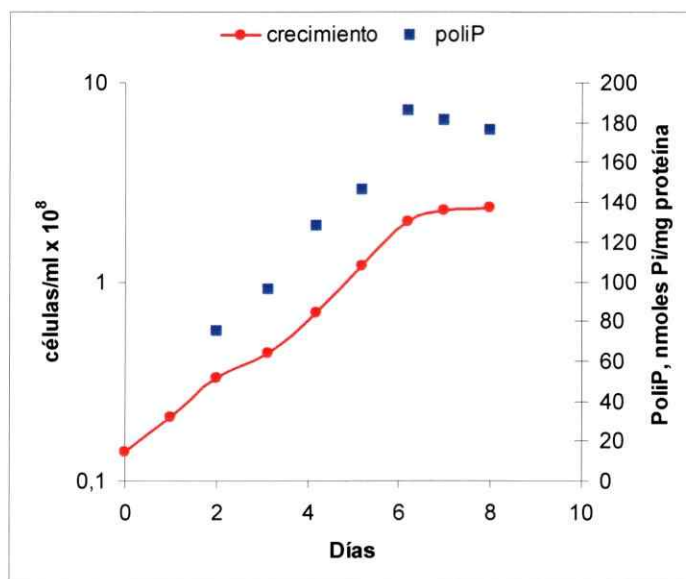


Figura 6. Niveles de poliP durante el crecimiento de *S. metallicus*. El microorganismo se creció en medio 88, se determinó el número de células mediante conteo celular y los niveles de poliP se cuantificaron por su conversión a ATP mediante la reacción reversa de la PPKr, a los tiempos de crecimiento indicados.

3.1.1.4 Actividad degradadora de poliP en *S. metallicus*

Para la determinación de la actividad tipo PPX se utilizó como sustrato [³³P]poliP de 750 residuos, sintetizado *in vitro* utilizando la PPKr de *E. coli*. Empleando 50 µg de proteínas, 1 mM Mg²⁺, 100 mM KCl, pH 7,0, se determinó la actividad tipo PPX en extractos crudos (fracción total) y en las fracciones de proteínas soluble y de membranas de *S. metallicus*. El ensayo se realizó mediante la cuantificación de Pi generado a partir de poliP radiactivo, separado mediante TLC sobre placas de polietileniminacelulosa y visualizado en un phosphorimager (Figura 7A). Además, se observó el efecto que tiene la temperatura de incubación (65 °C) en la hidrólisis del poliP cuando no se agregó extracto proteico al ensayo (blanco enzima) (Figura 7A). Las manchas visualizadas debido al fosfato producido después de las incubaciones se cuantificaron utilizando una

curva de calibración en pmoles de $[P^{33}]$ ortofosfato (Figura 7B), que se obtuvo mediante la hidrólisis química de $[\gamma-P^{33}]$ poliP₇₅₀ sintetizado *in vitro* como se describió en Materiales y Métodos.

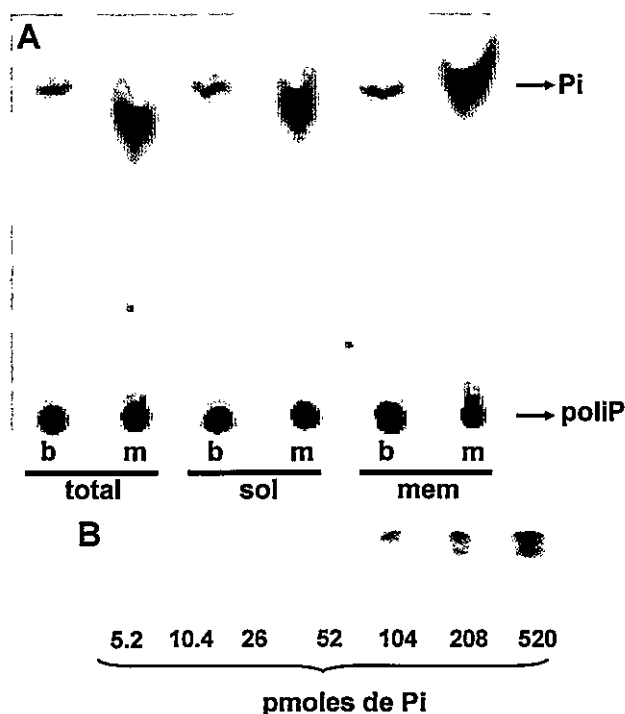


Figura 7. Ensayo de la actividad tipo PPX en *S. metallicus*. (A) Las células se fraccionaron como se indicó en Materiales y Métodos. Luego de 60 min las reacciones se detuvieron al aplicar 4 μ l de cada ensayo en la placa cromatográfica. **b:** blanco enzima; **m:** muestra; **total:** fracción total de proteínas; **sol:** fracción de proteínas solubles; **mem:** fracción de proteínas de membrana. (B) Curva de calibración en pmoles de $[P^{33}]$ ortofosfato.

S. metallicus presentó una actividad específica tipo PPX de 834 U/mg de proteína, la cual es similar a la actividad específica observada en extractos proteicos de *S. solfataricus*. Finalmente, se observó que estos niveles de actividad específica tipo

PPX están principalmente asociados a las fracciones de membranas tanto de *S. metallicus* como de *S. solfataricus* (Tabla 3).

Tabla 3. Actividades enzimáticas tipo PPX en diferentes fracciones proteicas en *S. metallicus* y *S. solfataricus*.

Fracciones	<i>S. metallicus</i>	<i>S. metallicus</i>	<i>S. solfataricus</i>
	Unidades (pmoles Pi/min)	Actividad específica (U/mg proteína)	Actividad específica (U/mg proteína) [‡]
Extracto total	9.675	834	800
Soluble	5.269	684	400
Membranas	521	950	850

[‡]Actividad tomada desde Cardona y col., 2002.

3.2 Relación entre la tolerancia a metales pesados y el metabolismo de poliP en *S. metallicus*

En las siguientes secciones se describen experimentos que pretenden relacionar el metabolismo de los poliP y la tolerancia a metales pesados en *S. metallicus*. Para estos experimentos se utilizaron como modelos los iones Cu^{2+} y Cd^{+2} . Por un lado, el primero se encuentra en altas concentraciones en los ambientes biolixivantes y el segundo ha sido descrito por tener efectos sobre los niveles de poliP en algunos microorganismos. Como se mencionó anteriormente, algunos metales podrían estimular la hidrólisis de los poliP y el transporte de Pi, junto al ión metálico hacia el espacio extracelular como una forma de detoxificar el ambiente intracelular (Keasling, 1997).

3.2.1 Relación entre la tolerancia a cobre y el metabolismo de los poliP en *S. metallicus*

3.2.1.1 Efecto de CuSO_4 en el crecimiento de *S. metallicus*

Previo a estudiar el efecto del cobre sobre los poliP en *S. metallicus*, se determinó el efecto que tiene este elemento sobre el crecimiento de este arqueón. Para ello, el microorganismo se creció en medio 88 pero en presencia de 10, 50, 100 y 200 mM CuSO_4 o en ausencia de esta sal. Las células utilizadas en estos experimentos fueron previamente adaptadas a estas condiciones de crecimiento mediante trasposos sucesivos a las concentraciones mencionadas anteriormente. Se observó una pequeña disminución en las tasas de crecimiento y en los niveles de células alcanzados en las curvas cuando los microorganismos se crecieron en concentraciones ascendentes de cobre comparado con el cultivo control sin metal (Figura 8A). Sin embargo, en la concentración de 200 mM CuSO_4 se observó un efecto mayor en el crecimiento con un 30 % de disminución en el número de células (Figura 8A). Por otro lado, *S. solfataricus* no creció a ninguna de la concentraciones de cobre ensayadas (Figura 8B). Estos resultados concuerdan con previas comunicaciones en las cuales *S. solfataricus* creció sólo a concentraciones entre 0,1 y 1 mM de cobre, siendo completamente inhibido su crecimiento en presencia de 10 mM cobre (Miller y col., 1992).

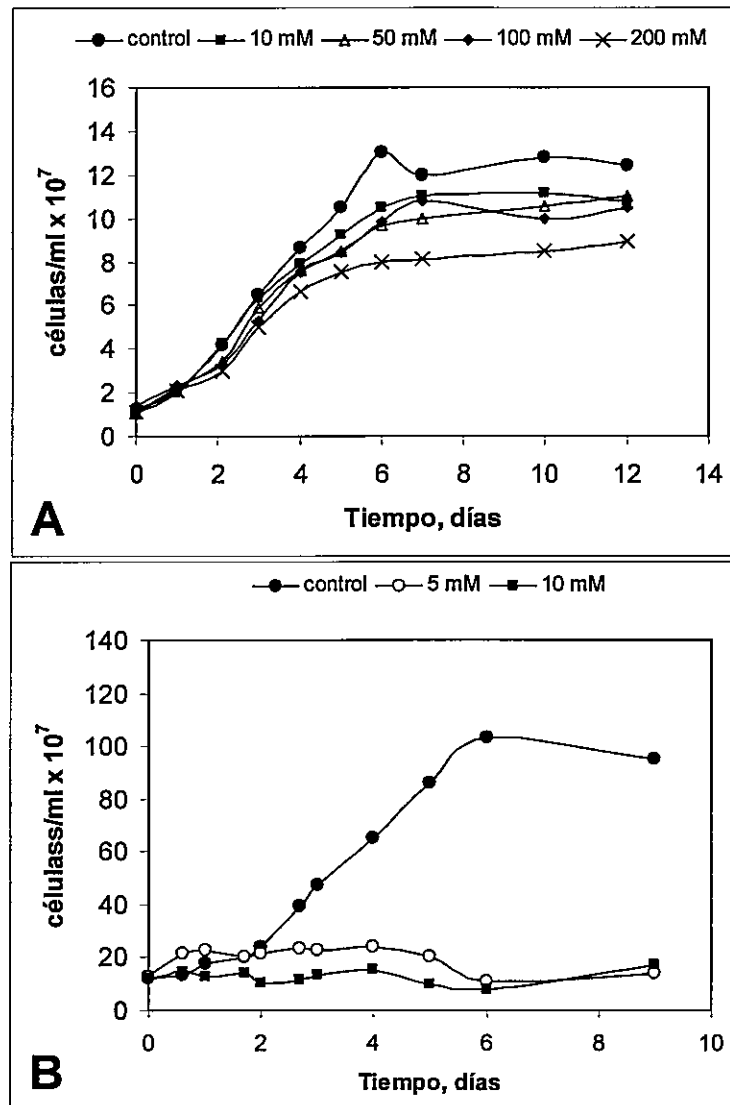


Figura 8. Crecimiento de dos especies del género *Sulfolobus* en presencia de CuSO_4 . Células de *S. metallicus* (A) y *S. solfataricus* (B) se inocularon en sus respectivos medios en ausencia de CuSO_4 , o se suplementaron con 5, 10, 50, 100 o 200 mM CuSO_4 , y las células se contaron diariamente.

3.2.1.2 Efecto de CuSO_4 en los niveles de poliP en *S. metallicus*

Para evaluar la relación entre el metabolismo de los poliP y la presencia de cobre en células de *S. metallicus*, durante el crecimiento del microorganismo se investigó el efecto que tienen diferentes concentraciones de CuSO_4 sobre el nivel celular de poliP. Se utilizaron células previamente adaptadas a las correspondientes concentraciones de cobre, tal como se describió en el punto 3.2.1.1. Los niveles de poliP mostraron una gradual disminución al incrementar la concentración de cobre en el medio de cultivo de *S. metallicus* y en forma clara se observó el mayor descenso de los niveles de poliP (más del 85 %) cuando la concentración de CuSO_4 alcanzó 200 mM con respecto a las células crecidas sin cobre (Figura 9). Es importante recordar que esta concentración de cobre no afectó mayormente el crecimiento de las células (Figura 7A) por lo que esta disminución no estaría dada por algún defecto fisiológico producto de la incapacidad de la bacteria para tolerar esta condición ambiental. Los resultados obtenidos anteriormente se correlacionaron exactamente con la desaparición de gránulos de poliP cuando las células se crecieron en altas concentraciones de CuSO_4 (100 y 200 mM) con respecto a las células crecidas sin cobre (Figura 10A, B, C). En ausencia de cobre, el 96 % de las células presentaron dos o tres grandes gránulos de poliP por célula (Figura 10A), mientras que en 200 mM de CuSO_4 los gránulos de poliP son de pequeño tamaño y con sólo el 46 % de las células contenía estos agregados (Figura 10C). Estos resultados sugieren una probable relación entre los niveles de poliP y la adaptación de *S. metallicus* para crecer en presencia de Cu^{+2} .

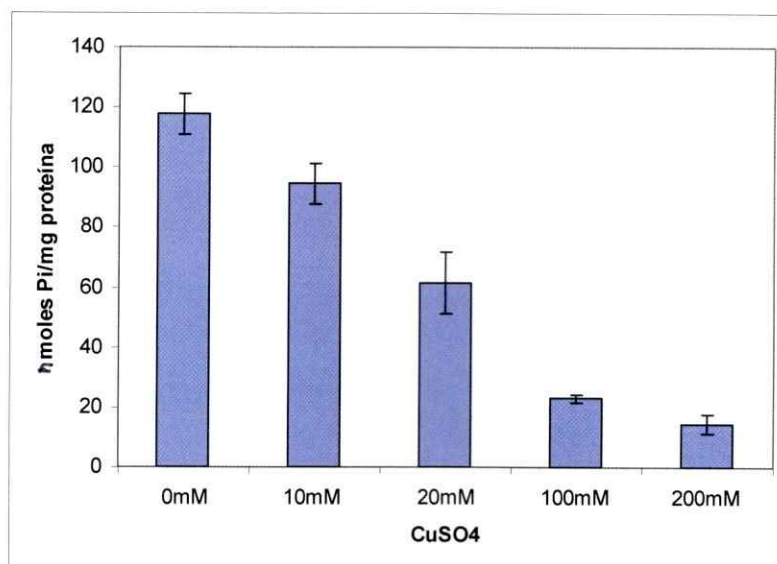


Figura 9. Disminución de los niveles de poliP durante la exposición de *S. metallicus* a CuSO_4 . Las células se crecieron en ausencia o presencia de las concentraciones de CuSO_4 indicadas hasta fase estacionaria temprana y el poliP se cuantificó como se describió en Materiales y Métodos. La barra de error representa las desviaciones estándar.

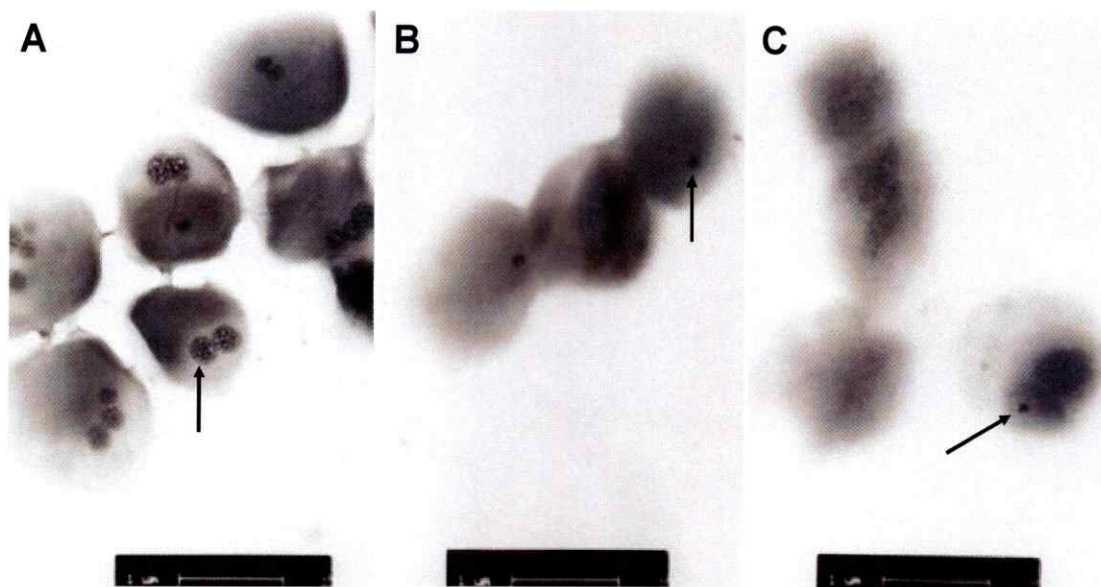


Figura 10. Desaparición de gránulos de poliP durante la exposición de *S. metallicus* a CuSO_4 . Células tomadas de cultivos descritos en la Figura 8 crecidos en ausencia de CuSO_4 (A), o en presencia de 100 mM (B) y 200 mM (C) de CuSO_4 , se analizaron mediante microscopía electrónica sin tinción.

3.2.1.3 Niveles de poliP en células de *S. metallicus* transferidas a un medio con CuSO_4

Para investigar el efecto de los iones de cobre sobre los niveles de poliP se utilizaron células no adaptadas a crecer en este elemento. Para ello se creció *S. metallicus* en medio 88 y las células se traspasaron al mismo medio pero con diferentes concentraciones de CuSO_4 . Como se mostró anteriormente, bajo esta condición de crecimiento las células acumulan altos niveles de poliP (Figura 9). Las células se colectaron a diferentes intervalos de tiempo y los niveles de poliP fueron cuantificados. Se observó una rápida disminución en el nivel de poliP cuando las células se expusieron a la sal de cobre, siendo el efecto más notorio en 100 mM CuSO_4 (Figura 11). A los 15 min después del traspaso a 100 mM CuSO_4 , el nivel de poliP disminuyó alrededor de un 60 % con respecto al valor obtenido a tiempo cero (Figura 11), y este nivel se mantuvo por las siguientes 24 h (datos no mostrados). Para observar el posible efecto del sulfato sobre los niveles de poliP, se traspasaron células de *S. metallicus* a 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y se observó que esta sal no tiene efectos significativos sobre los niveles de poliP, manteniéndose los niveles de este polímero entre 130 y 145 nmoles de Pi/mg de proteína como se muestra en la Figura 11 (triángulos naranjos). Estos resultados muestran que la presencia de cobre y no de sulfato, genera una importante disminución en el nivel celular de poliP en *S. metallicus*, probablemente debido a una mayor degradación de este polímero como se ha propuesto en otros sistemas (Aiking y col., 1984; Keasling, 1997; Álvarez y Jerez, 2004).

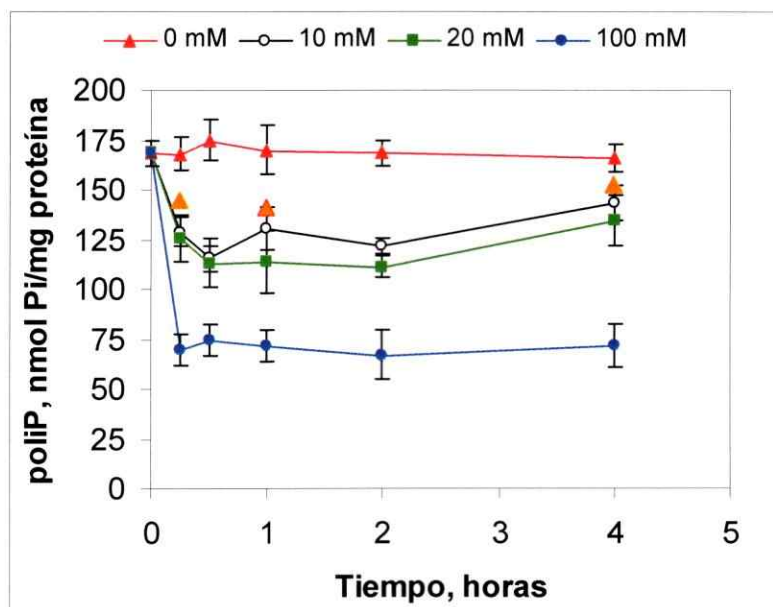


Figura 11. Contenido de poliP de células de *S. metallicus* expuestas a CuSO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Células de *S. metallicus* se crecieron en ausencia de CuSO_4 hasta fase estacionaria temprana (10^8 células/mL). Las células se traspasaron a medios frescos conteniendo distintas concentraciones de CuSO_4 o 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (triángulos naranjos). Alícuotas se tomaron a los tiempos indicados y se determinó los niveles de poliP como se describió en Materiales y Métodos.

3.2.1.4 Actividad tipo PPX en células de *S. metallicus* transferidas a un medio con CuSO_4

Como se mostró en los experimentos recién descritos, la presencia de CuSO_4 produjo una disminución del nivel celular de poliP en *S. metallicus*, tanto en células adaptadas (Figura 9) como en células no adaptadas a este compuesto (Figura 11). El modelo propuesto para la destoxicación de iones metálicos (Figura 3), propone un aumento de la actividad PPX estimulada por algún eventual ión metálico tóxico. Por lo

tanto, se estudió el efecto del cobre sobre esta actividad tipo PPX en *S. metallicus*. Para ello se creció *S. metallicus* en medio 88 y las células se traspasaron a mismo medio conteniendo diferentes concentraciones de CuSO_4 . Las células se colectaron a diferentes intervalos de tiempo y la actividad tipo PPX se cuantificó en extractos libres de células. Se observó un rápido incremento de la actividad degradadora de poliP cuando las células fueron expuestas a la sal de cobre, siendo el efecto más notorio a 100 mM CuSO_4 (Figura 12). A los 15 min después del traspaso a 100 mM CuSO_4 , la actividad tipo PPX aumentó alrededor de un 160 % con respecto al valor obtenido a tiempo cero (Figura 12) y este nivel se mantuvo por las siguientes 24 h (datos no mostrados). Para observar el posible efecto del sulfato sobre la actividad tipo PPX se traspasaron células de *S. metallicus* a 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y se observó que esta sal no tuvo efectos significativos sobre la actividad degradadora de poliP, manteniéndose valores de actividad entre 780 y 825 U/mg de proteína como se muestra en la Figura 12 (triángulos naranjos). Estos resultados muestran que la presencia de cobre y no de sulfato, generó un importante aumento en la actividad tipo PPX en *S. metallicus*. Este aumento presentó una buena correlación temporal con la rápida disminución observada en el nivel de poliP cuando se realizó el tratamiento similar (Figura 11), lo que sugiere que el efecto del cobre sobre el nivel de poliP sería el resultado de un aumento de la actividad degradadora de este polímero.

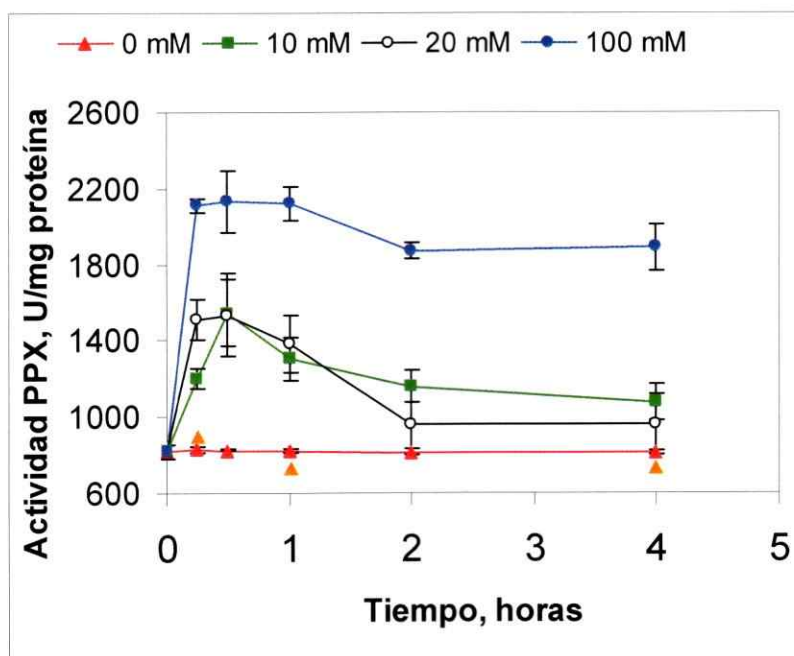


Figura 12. Actividad degradadora de poliP en células de *S. metallicus* expuestas a CuSO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Células de *S. metallicus* se crecieron en ausencia de CuSO_4 hasta fase estacionaria temprana (10^8 células/mL). Las células se traspasaron a medios frescos conteniendo distintas concentraciones de CuSO_4 o 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (triángulos naranjos). Se obtuvieron extractos libres de células a los tiempos indicados y se determinó la actividad tipo PPX como se describió en Materiales y Métodos.

3.2.1.5 Actividad tipo PPX en extractos libres de células después de la adición de diferentes concentraciones de metales

Un posible mecanismo para explicar la disminución de los niveles de poliP, cuando las células de *S. metallicus* se expusieron a cobre, es el incremento de la actividad degradadora de este polímero. Para analizar un poco más en profundidad el fenómeno descrito anteriormente se determinó el efecto *in vitro* de cobre y otros metales sobre la actividad tipo PPX presente en extractos libres de células provenientes de cultivos de *S. metallicus* no adaptado a metales. El cobre estimuló la actividad tipo PPX a concentraciones muy bajas (Figura 13). Se alcanzaron altos valores de actividad tipo

PPX tanto con cobre como con manganeso. Sin embargo, la concentración de metal requerida para esto fue de 10 μM para cobre (Figura 13) y sobre 500 μM para manganeso (resultados no mostrados). A concentraciones sobre 10 μM de cobre se produjo una disminución de la actividad tipo PPX (Figura 13). Cadmio y zinc también estimularon la actividad tipo PPX en un rango de concentraciones micromolares, aunque este efecto no alcanzó los valores obtenidos para cobre (datos no mostrados). Estos resultados sugieren un efecto directo de los iones de metales pesados sobre la actividad tipo PPX y la hidrólisis de poliP en *S. metallicus*.

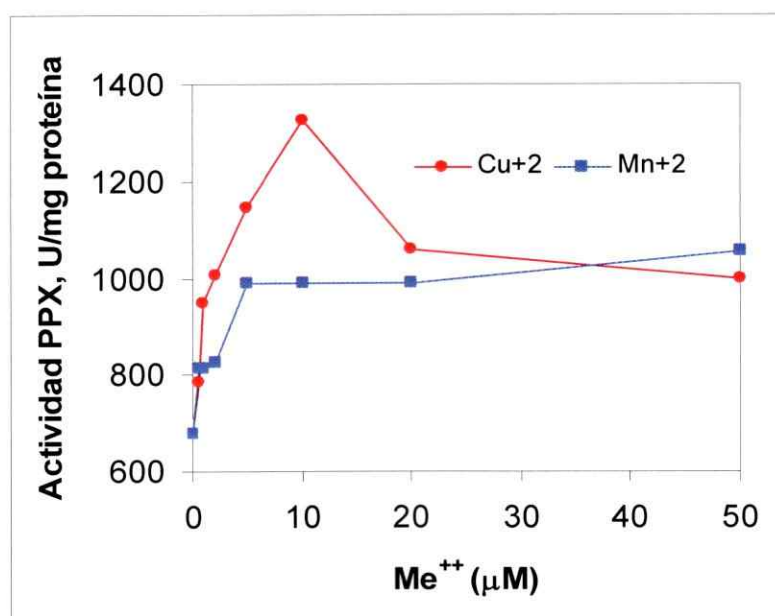


Figura 13. Respuesta de la actividad tipo PPX frente a cationes bivalentes *in vitro*. La actividad tipo PPX se determinó usando el ensayo descrito en Materiales y Métodos con extractos libres de células de *S. metallicus* crecido en ausencia de cobre. Las cantidades indicadas de CuSO_4 o MnSO_4 se agregaron a las mezclas de reacción de los ensayos.

3.2.1.6 Efecto del cobre sobre el eflujo de Pi desde células de *S. metallicus*

El mecanismo de tolerancia a iones de metales pesados propuesto, no sólo propone la degradación los poliP, sino que además propone el transporte hacia el espacio extracelular del Pi generado a partir del poliP junto al ión metálico (Figura 3). Por lo tanto, la disminución de los niveles de poliP en *S. metallicus* debido a cobre (Figuras 9 y 11) podría generar Pi libre. Para determinar si este Pi es transportado fuera de la célula, *S. metallicus* se creció hasta fase estacionaria temprana y se marcó *in vivo* con ^{32}P como se indicó en Materiales y Métodos. Posterior a un lavado exhaustivo de las células radiactivas para eliminar la marca no incorporada, éstas se resuspendieron en medio normal que contiene azufre con o sin iones Cu^{+2} y se determinó el eflujo de Pi (Figura 14).

Durante el tratamiento con cobre, se colectó muestras a distintos tiempos, las cuales se centrifugaron para eliminar las células y determinar la radiactividad presente en el sobrenadante. En la condición control se observó una continua liberación de Pi desde las células (Figura 14). Sin embargo, observamos un aumento sobre este nivel basal cuando las células se expusieron a cobre. La cantidad de marca liberada hacia el sobrenadante fue mayor cuando las células se expusieron a 200 mM cobre (Figura 14). Además se observaron diferencias entre las cinéticas de los poliP degradados (Figura 11) y el Pi liberado (Figura 14). También se analizó la naturaleza de la radiactividad presente en los sobrenadantes mediante TLC. Este análisis se realizó sólo con los sobrenadantes de los tiempos mayores de tratamiento para así facilitar la detección mediante Phosphorimager, ya que éstos tienen una mayor marca acumulada (Figura 14). Se encontró que la marca liberada hacia el medio parece ser principalmente Pi (datos no

mostrados) debido a que no se detectó la presencia de otros metabolitos, indicando que la marca liberada al medio no fue producto de lisis celular durante los tratamientos con cobre. Estos resultados sugieren fuertemente que al menos una parte del Pi generado por la hidrólisis de poliP en presencia de iones cobre se transportó fuera de las células.

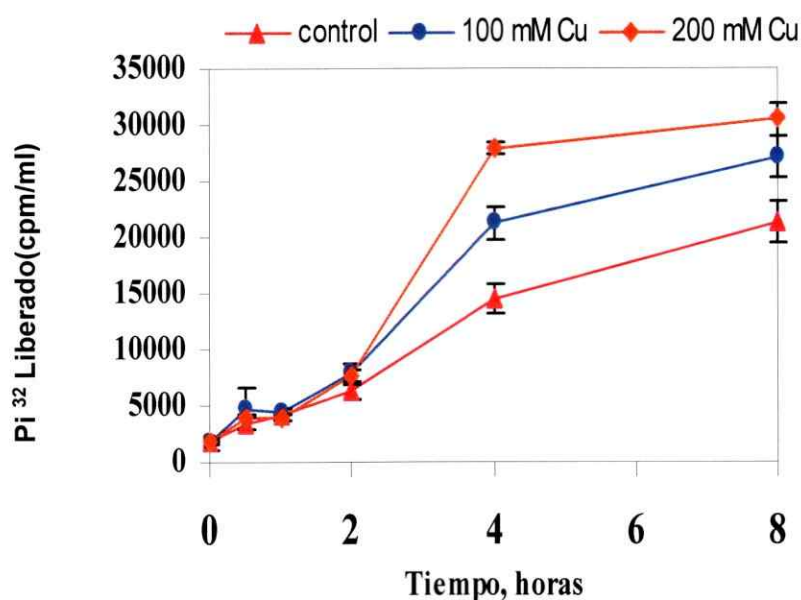


Figura 14. Efecto de CuSO_4 sobre el eflujo de Pi desde células de *S. metallicus*. Células de *S. metallicus* se marcaron *in vivo* con $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ durante 20 h en presencia de 0,2 mM Pi. Las células se lavaron exhaustivamente con el medio estándar y se traspasaron a un nuevo medio sin cobre, o conteniendo 100 o 200 mM CuSO_4 . En los tiempos indicados, las células se centrifugaron y se determinó el Pi radiactivo liberado al medio.

3.2.1.7 Marcación y captación de cobre en células de *S. metallicus*

Se trató de marcar células de *S. metallicus* con ^{64}Cu para determinar la formación de algún tipo de complejo metal-fosfato y su posible salida desde las células cuando estas fueran expuestas a cobre. Para lograr este objetivo se estimó la captación de ^{64}Cu

en células de *S. metallicus* según lo descrito en Materiales y Métodos. El ^{64}Cu incorporado en las células se determinó mediante centelleo líquido. *E. faecalis* se utilizó como control de marcaje que incorporó un total de 60.000 cpm (valores obtenidos desde células que captan cobre). En cambio, *S. metallicus* solamente incorporó 40 cpm. Por lo tanto, no se obtuvo resultados satisfactorios probablemente debido a la competencia con los protones presentes en el ambiente ácido en que vive este microorganismo. De esta manera no se pudo determinar el eflujo de cobre desde células de *S. metallicus*. Pero aunque la formación de complejos cobre-fosfato no se ha demostrado en *S. metallicus*, no se puede descartar que el cobre tenga efectos indirectos sobre los niveles de poliP.

3.2.2 Relación entre la tolerancia a cadmio y el metabolismo de los poliP en *S. metallicus*

3.2.2.1 Efecto de CdSO_4 en el crecimiento de *S. metallicus*

Previo a estudiar el efecto de cadmio sobre los poliP en *S. metallicus*, se quiso conocer qué efecto tiene este elemento sobre el crecimiento de este arqueón. El microorganismo se creció en medio 88 pero en presencia de 0,5, 1, 2, 3, 5 y 10 mM CdSO_4 o en ausencia de esta sal. Semejante al estudio realizado con cobre, las células utilizadas fueron previamente adaptadas a estas condiciones de crecimiento. Se observó que *S. metallicus* creció a concentraciones de hasta 1 mM CdSO_4 sin un efecto notable en las tasas de crecimiento y en los niveles de células alcanzados por las curvas en fase estacionaria comparado con el cultivo control sin metal (Figura 15). A concentraciones entre 2 y 3 mM CdSO_4 se observó un aumento en la fase lag de crecimiento y los cultivos sufrieron un efecto severo en el crecimiento con una disminución significativa

en el número de células (Figura 15). *S. metallicus* no creció a concentraciones por sobre 5 mM de CdSO₄ (Figura 15). Por otro lado, *S. solfataricus* no fue capaz de crecer en concentraciones sobre 10 μM de CdSO₄ (datos no mostrados).

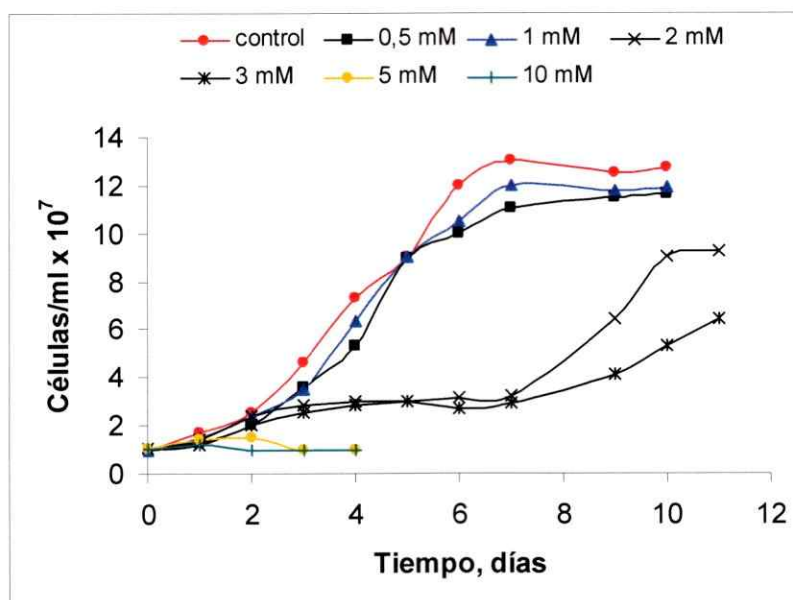


Figura 15. Crecimiento de *S. metallicus* en presencia de CdSO₄. Células de *S. metallicus* se inocularon en medio 88 en ausencia de CdSO₄, o fueron suplementados con 0,5, 1, 2, 3, 5 o 10 mM CdSO₄, y las células se contaron diariamente.

3.2.2.2 Efecto de CdSO₄ en los niveles de poliP en *S. metallicus*

Para investigar el efecto del cadmio sobre los niveles de poliP, en una primera aproximación se utilizó células adaptadas a crecer en esta sal. Para ello se creció *S. metallicus* en medio 88 con diferentes concentraciones de cadmio tal como se describió en el punto 3.2.2.1. Las células se colectaron en fase estacionaria y los niveles de poliP fueron cuantificados. Se observó que los niveles de poliP no cambiaron cuando las

células se expusieron a las concentraciones de cadmio a las que se adaptaron (Figura 16).

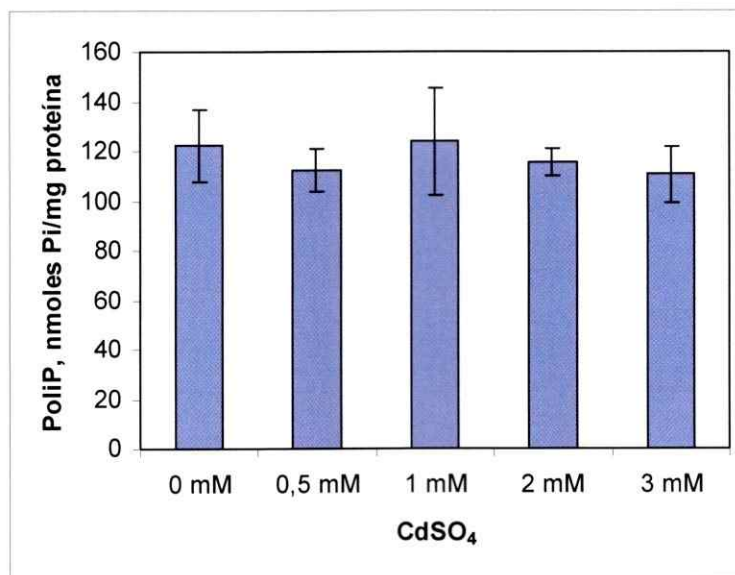


Figura 16. Niveles de poliP durante la exposición de *S. metallicus* a CdSO₄. Las células de *S. metallicus* se crecieron en ausencia o presencia de las concentraciones de CdSO₄ indicadas hasta fase estacionaria temprana y el poliP se cuantificó como se describe en Materiales y Métodos. La barra de error representa las desviaciones estándar.

En una segunda aproximación se investigó el efecto de iones de cadmio sobre los niveles de poliP en células no adaptadas a crecer en este elemento. Para ello células de *S. metallicus* se traspasaron a medio 88 conteniendo diferentes concentraciones de CdSO₄. Las células se colectaron en diferentes intervalos de tiempo y los niveles de poliP fueron cuantificados. No se observó un efecto sobre los niveles de poliP cuando las células se traspasaron hasta 10 mM CdSO₄ (Figura 17). En cambio una disminución de alrededor de un 20 % en el nivel de poliP con respecto al valor obtenido a tiempo cero, se determinó cuando las células fueron expuestas a 20 mM CdSO₄ (Figura 17). Es

importante destacar que trasposos a concentraciones mayores de 20 mM CdSO₄ no fue posible de realizar debido a lisis celular.

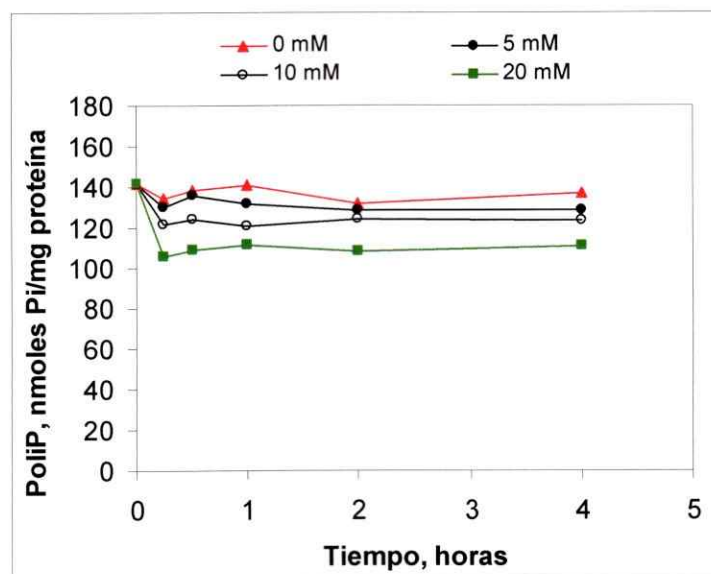


Figura 17. Contenido de poliP en células de *S. metallicus* expuestas a CdSO₄. Células de *S. metallicus* se crecieron en ausencia de CdSO₄ hasta fase estacionaria temprana, y se traspararon a medios conteniendo distintas concentraciones de CdSO₄. Alícuotas se tomaron en los tiempos indicados y se determinó los niveles de poliP como se describió en Materiales y Métodos.

3.3 Efecto de metales pesados en los cambios globales de expresión de proteínas en *S. metallicus*

A pesar que la mayoría de los microorganismos acidófilos pertenecientes al dominio *Archaea*, que actualmente se utilizan en procesos de biolixiviación, han sido aislados desde ambientes que contienen altas concentraciones de metales pesados, la información acerca de sus mecanismos de resistencia a metales pesados es limitada. Decidimos iniciar un estudio proteómico que pudiera dar cuenta de determinantes genéticos involucrados en la tolerancia a metales pesados, específicamente cobre y

cadmio, en *S. metallicus*. Por un lado, para aumentar el conocimiento acerca de la homeostasis de metales pesados en arqueas, y por sobre todo entender posibles mecanismos que presente este microorganismos para sobrevivir en ambientes biolixiviantes.

3.3.1. Efecto de CuSO_4 en el proteoma de *S. metallicus*

3.3.1.1 Cambios globales en la expresión de proteínas de *S. metallicus* debido a la presencia de CuSO_4

Para investigar el efecto de iones de cobre sobre los cambios de expresión de proteínas en *S. metallicus*, el cual toleró hasta 200 mM de CuSO_4 (Figura 8A), se utilizó células no adaptadas a crecer en esta sal. Para ello se creció *S. metallicus* en medio 88 hasta fase estacionaria temprana y posteriormente las células se traspasaron a 100 o 200 mM CuSO_4 durante 24 h. Se estudiaron los proteomas de las células en ausencia de cobre (Figura 18) y en presencia de 100 mM CuSO_4 (Figura 19) o 200 mM CuSO_4 (datos no mostrados). Para esto se analizaron comparativamente los mayores cambios observados mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Con la ayuda del programa computacional para el procesamiento de imágenes Delta 2D, se identificó y cuantificó los niveles de las proteínas que disminuyeron y aumentaron su expresión debido al efecto del cobre con respecto a la condición control sin el metal.

Se identificó un total de 23 proteínas cuya síntesis se reprimió en presencia de cobre (Figura 18). Dentro de este grupo, 11 proteínas desaparecieron completamente cuando las células fueron expuestas a cobre y 12 disminuyeron su expresión entre 1,5 y

5,1 veces (datos no mostrados) con respecto a la condición control sin cobre. Por el contrario, se identificó un total de 28 proteínas cuya síntesis aumentó en presencia de cobre (Figura 19). La mayoría de estas proteínas aparecieron sólo cuando las células se expusieron a cobre (Figura 19) y no se encontraron presentes en la condición control sin cobre. Solo tres proteínas tuvieron un aumento de expresión entre 2,6 y 5,5 veces (Tabla 4).

Sumado a lo anterior, se identificaron 3 proteínas de bajo peso molecular que aumentaron su expresión al exponer las células a cobre. Estas tres proteínas aparecieron cuando en la separación por peso molecular (SDS-PAGE) se utilizó 15 % de acrilamida (Figura 20). Todos los resultados anteriores se obtuvieron a partir de geles con gradiente de pH inmovilizado entre 3 y 10. Además, nuevas proteínas que aumentaron su expresión debido a la presencia de cobre, aparecieron cuando el rango de pH de de los geles inmovizados utilizados fué entre 5 y 8 (Figura 21). Estos resultados indican que al variar condiciones tales como el rango de pH del isoelectroenfoque y el porcentaje de acrilamida del SDS-PAGE, pueden aparecer nuevas proteínas de interés.

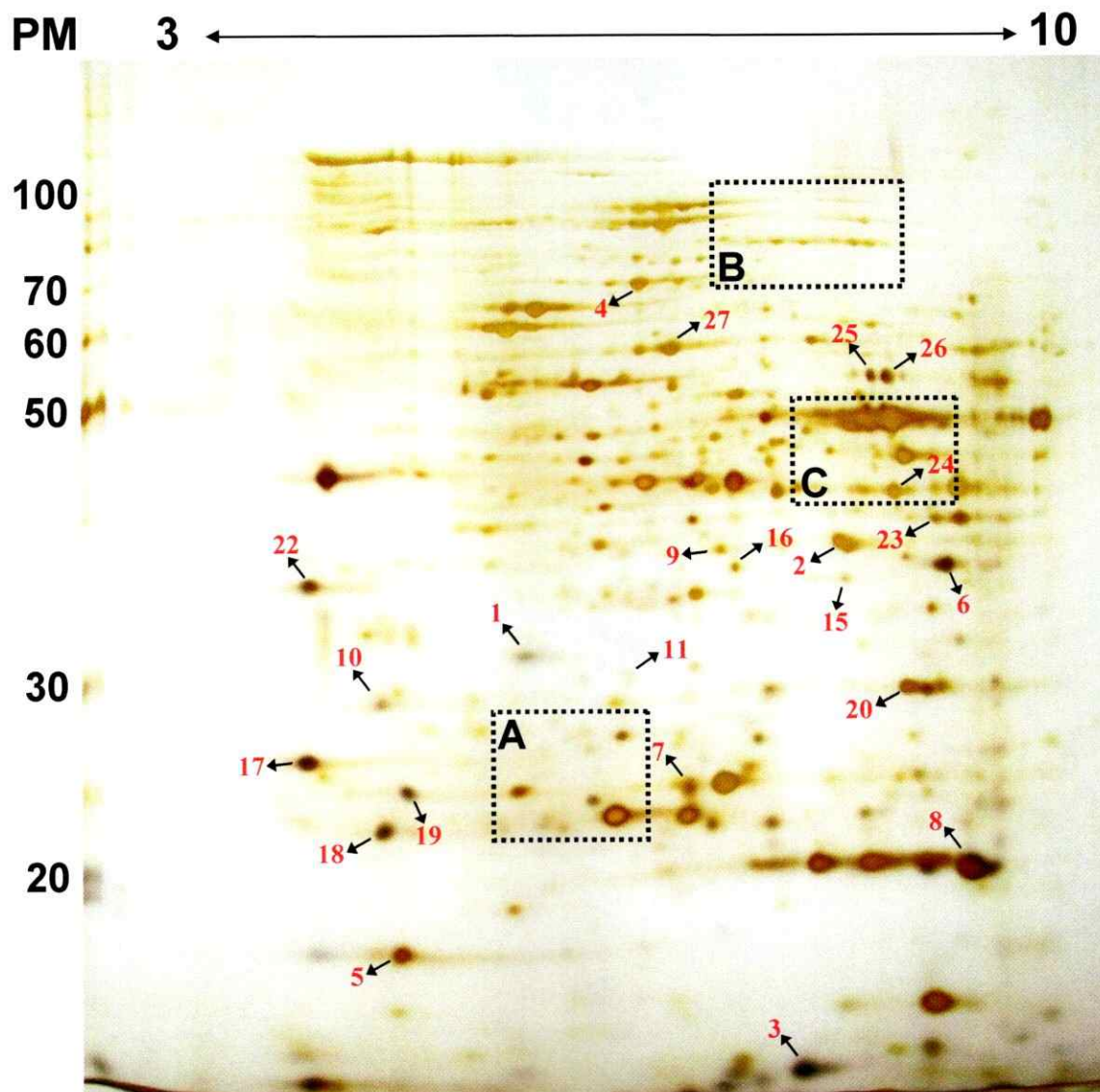


Figura 18. Proteoma de *S. metallicus* crecido en condiciones normales. Las proteínas totales obtenidas desde células de *S. metallicus* crecidas hasta fase estacionaria temprana se separaron mediante geles 2D con un gradiente de pH 3-10 no lineal y se tiñeron con plata. Los números rojos indican las proteínas que disminuyeron su expresión cuando las células se expusieron a cobre (Figura 19). Los cuadros punteados (A, B y C) se analizan con más detalles en la Figura 22.

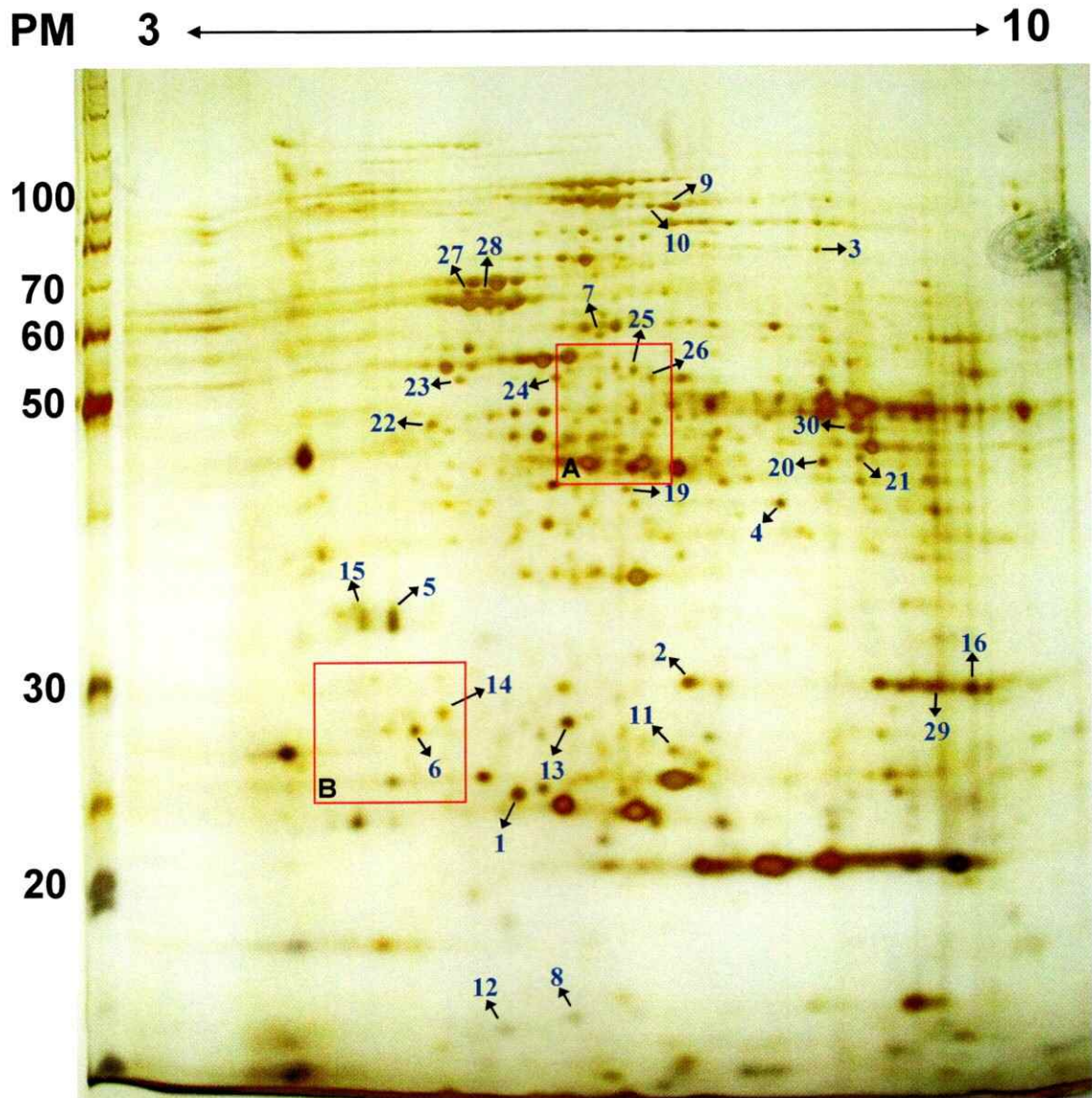


Figura 19. Proteoma de *S. metallicus* al exponerlo a 100 mM CuSO₄. Células de *S. metallicus* se crecieron hasta fase estacionaria temprana y se traspasaron a un medio nuevo con 100 mM CuSO₄. Las proteínas totales se separaron mediante geles 2D con un gradiente de pH 3-10 no lineal y se tiñeron con plata. Los números azules indican las proteínas que aumentaron su expresión cuando las células se expusieron a cobre. Los cuadros rojos (A y B) se analizan con más detalles en la Figura 21.

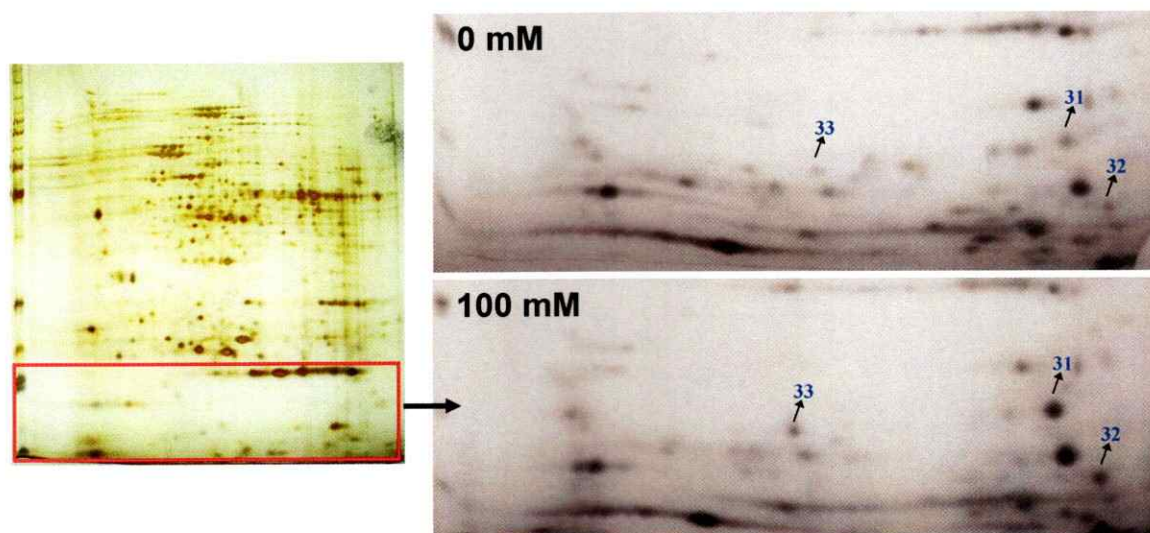


Figura 20. Efecto de la concentración de acrilamida en el proteoma de *S. metallicus* al exponerlo a 100 mM CuSO₄. El procedimiento fue idéntico al de la Figura 19, con la diferencia que las proteínas totales se separaron con acrilamida al 15 % mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie coloidal. Las fotos muestran las regiones de bajo peso molecular de los geles. Los números indican las nuevas proteínas que aumentaron su expresión cuando las células se expusieron a 100 mM CuSO₄.

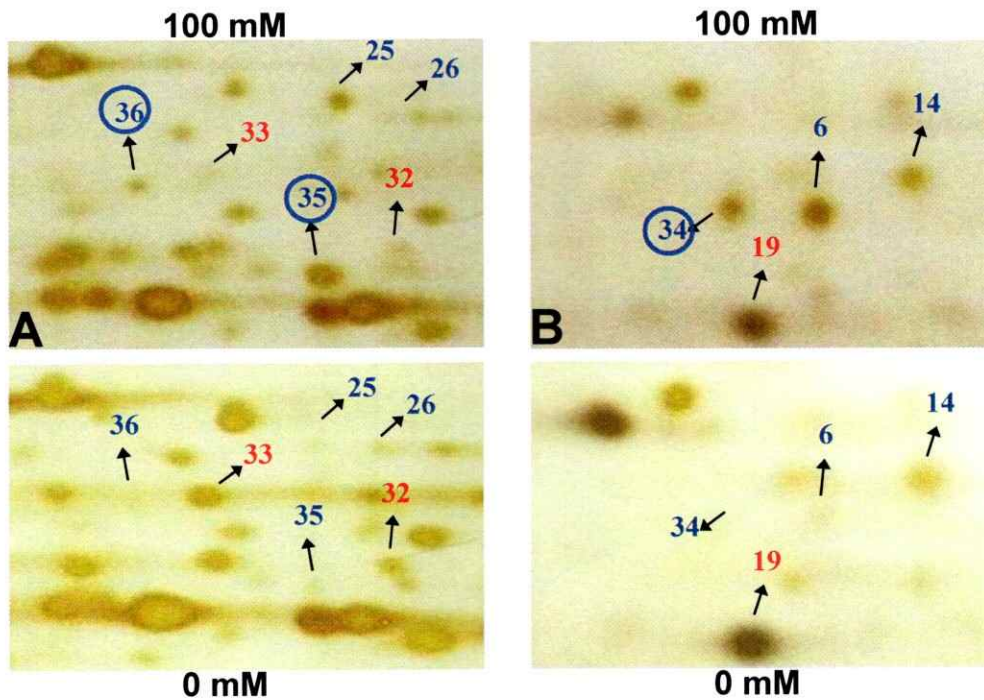


Figura 21. Efecto del gradiente de pH en el proteoma de *S. metallicus* al exponerlo a 100 mM CuSO_4 . El procedimiento fue idéntico al de la Figura 19, con la diferencia que las proteínas totales se separaron mediante geles 2D con un gradiente de pH 5-8 y se tiñeron con plata. Las fotos de arriba muestran los cuadros rojos A y B de la Figura 19. Las fotos de abajo muestran los mismos cuadros A y B pero desde geles que contienen las proteínas de *S. metallicus* crecido en ausencia de cobre. Los números azules en círculos indican las nuevas proteínas que aumentaron su expresión cuando las células se expusieron a 100 mM CuSO_4 .

3.3.1.2 Identificación de proteínas de *S. metallicus* que aumentaron su expresión debido a CuSO_4

Se eligieron 18 de las proteínas que aumentaron su expresión al exponer células de *S. metallicus* a cobre (Figura 19) y se aislaron desde geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie coloidal y SYPRO[®] (figuras no mostradas) para su identificación mediante espectrometría de masa (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masa que aumentaron su expresión al traspasar células de *S. metallicus* a CuSO_4 .

Proteínas	Mejor similitud	Microorganismo	Peso molecular (kDa)	Estimulación
1	Subunidad del proteosoma	<i>S. solfataricus</i>	26,6	∞
3	Ferridoxina oxidoreductasa	<i>S. solfataricus</i>	70,1	∞
4	Oxidoreductasa	<i>S. solfataricus</i>	42,9	∞
5	Desconocida	-	~35‡	2,6
6	Desconocida	-	~27‡	∞
9	Fosfoglicerato deshidrogenasa	<i>M. thermautotrophicus</i>	57,1	∞
13	Desconocida	-	~27‡	3,4
14	Desconocida	-	~28‡	∞
15	Desconocida	-	~35‡	5,5
20	Glutamato deshidrogenasa	<i>S. solfataricus</i>	46,1	∞
21	Desconocida	-	~45‡	∞
22	Desconocida	-	~49‡	∞
23	ATP sintetasa subunidad B	<i>S. solfataricus</i>	51,1	∞
24	HSP60 subunidad gamma	<i>S. shibatae</i>	58,5	∞
30	Desconocida	-	~48‡	∞
31	Desconocida	-	~16‡	ND
32	Regulador transcripcional	<i>S. solfataricus</i>	14,4	ND
33	Terminador transcripcional NusA	<i>S. solfataricus</i>	13,8	ND

‡ Peso molecular aproximado (kDa) obtenido por observación de los geles (Figura 18 y 19).

La inducción se determinó utilizando el programa Delta 2D. ND=inducción no determinada.

Los péptidos tripticos de las proteínas se analizaron por espectrometría de masa (ESI-QUAD-TOF). Debido a que el genoma de *S. metallicus* no se conoce, el análisis de los péptidos se realizó en una primera instancia comparándolos con las secuencias de los genomas de arqueas disponibles, y en una segunda comparándolos con las secuencias de todos los genomas de organismos disponibles.

Las proteínas identificadas se relacionaron con los siguientes procesos celulares: producción y conversión de energía, biosíntesis de aminoácidos, respuestas a estrés y regulación de la transcripción (Tabla 4). Entre las proteínas que tienen relación con la producción y conversión de energía, se identificó la cadena B de una ATP sintasa (proteína 23) que tiene relación directa con la síntesis de nucleótidos y particularmente de ATP; las otras dos proteínas son oxidoreductasas, una 2-oxoácido-ferridoxina oxidoreductasa (proteína 3) y una oxidoreductasa tipo alcohol deshidrogenada (proteína 4), que generalmente están involucradas en cadenas transportadoras de electrones y utilizan NAD^+ como aceptor de electrones. Interesantemente en los últimos años se les está asignando un importante papel en la respuesta celular al estrés oxidativo, posiblemente causado por metales pesados, en bacterias y arqueas (Sitthisak y col., 2005; Rodríguez-Montelongo y col., 2006; Kaur y col., 2006). Las proteínas involucradas en la síntesis de aminoácidos son una fosfoglicerato deshidrogenasa (proteína 9) que cataliza la oxidación dependiente de NAD^+ del 3-fosfoglicerato a 3-fosfohidroxipiruvato, la cual es un paso inicial en la síntesis de L-serina (Thompson y col., 2005) y una glutamato deshidrogenasa (proteína 20), que cataliza la interconversión dependiente de NAD^+ entre L-glutamato y 2-cetoglutarato, jugando de esta manera un papel importante en la asimilación de amonio por parte de las células (Consalvi y col.,

1991). Las proteínas que tienen relación con la respuesta a estrés son una subunidad del proteosoma (proteína 1), el cual es un complejo proteico degradador de enzimas no específico asociado con el catabolismo de las proteínas. Sin embargo, últimamente se le ha asignado un papel de controlador de procesos biológicos que pueden salvar a las células de la muerte, e interesantemente podrían jugar un papel muy estrecho con chaperonas en asegurar la calidad de las proteínas frente al estrés (Maupin-Furlow y col., 2006). La otra proteína es una subunidad de la HSP60 (proteína 24) la cual es una chaperona de estrés térmico, ampliamente estudiada en arqueas, involucrada directamente en el plegamiento de proteínas (Macario y col., 1999). Las dos últimas proteínas identificadas tienen relación con la regulación de la transcripción. Una de ellas es un regulador transcripcional putativo (proteína 32); la otra es el terminador transcripcional NusA (proteína 33), el cual es un factor transcripcional multifuncional involucrado en la terminación intrínseca de la transcripción (Shibata y col., 2007). Finalmente, las proteínas 5, 6, 13, 14, 15, 21, 22, 30 y 31, no mostraron un puntaje significativo con alguna proteína presente en la base de datos (Tabla 3), por lo tanto podrían ser proteínas que solo estén presentes en el genoma de *S. metallicus*.

3.3.2 Efecto de CdSO₄ en el proteoma de *S. metallicus*

3.3.2.1 Cambios globales en la expresión de proteínas de *S. metallicus* debido a CdSO₄

Para investigar el efecto de los iones cadmio sobre los cambios de expresión de proteínas en *S. metallicus*, el cual toleró hasta 1 mM de CdSO₄ (Figura 15), se utilizó células no adaptadas a crecer en esta sal. Para lograr este objetivo, se creció *S. metallicus* en medio 88 hasta fase estacionaria temprana y posteriormente las células se traspasaron

a 1 mM CdSO₄ durante 24 h. Se estudió los proteomas de las células en ausencia de cobre (Figura 18) y en presencia de 1 mM CdSO₄ (Figura 22), y se analizaron comparativamente los mayores cambios observados mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE).

En general observamos una disminución de la síntesis total de proteínas cuando *S. metallicus* se enfrentó a cadmio (datos no mostrados). Por el contrario, un total de 13 proteínas aumentaron su expresión en presencia de cadmio (datos no mostrados). Dentro de estas proteínas, 3 aumentaron su expresión sólo en cadmio y 10 aumentaron su expresión tanto en cadmio como en cobre (algunas de ellas se muestran en la Figura 22).

3.3.2.2 Identificación de proteínas de *S. metallicus* que aumentaron su expresión debido a CdSO₄

Las proteínas que aumentaron su expresión frente a cadmio en *S. metallicus*, no se aislaron de geles y por ende no fueron analizadas mediante espectrometría de masa. Sin embargo, se realizó un análisis comparativo con las proteínas identificadas que aumentaron su expresión frente a cobre (Tabla 3). En *S. metallicus* identificamos que las proteínas 1, 2, 3, 4, 9, 13, 20, 21, 23 y 30, las cuales aumentaron su expresión frente a cobre, también fueron sobreexpresadas en cadmio. Algunas de estas proteínas que aumentaron su expresión frente a los dos metales se muestran en la Figura 22. En *S. metallicus*, el cadmio aumentó la expresión de proteínas involucradas en la producción y conversión de energía (proteínas 3, 4, 23), las cuales podrían estar respondiendo al estrés oxidativo producido por el cadmio (Vido y col., 2001). Las mismas proteínas involucradas en la síntesis de aminoácidos que se detectaron en presencia de cobre

también se identificaron en la presencia de cadmio (proteínas 9, 20). Además, la proteína que tiene relación con la respuesta a estrés se indujo tanto en cobre como en cadmio (proteína 1). Finalmente, también se encontró proteínas con función desconocida (proteínas 13, 21, 30) y una proteína que también aumentó su expresión en cobre pero que no fue secuenciada por espectrometría de masa (proteína 2).

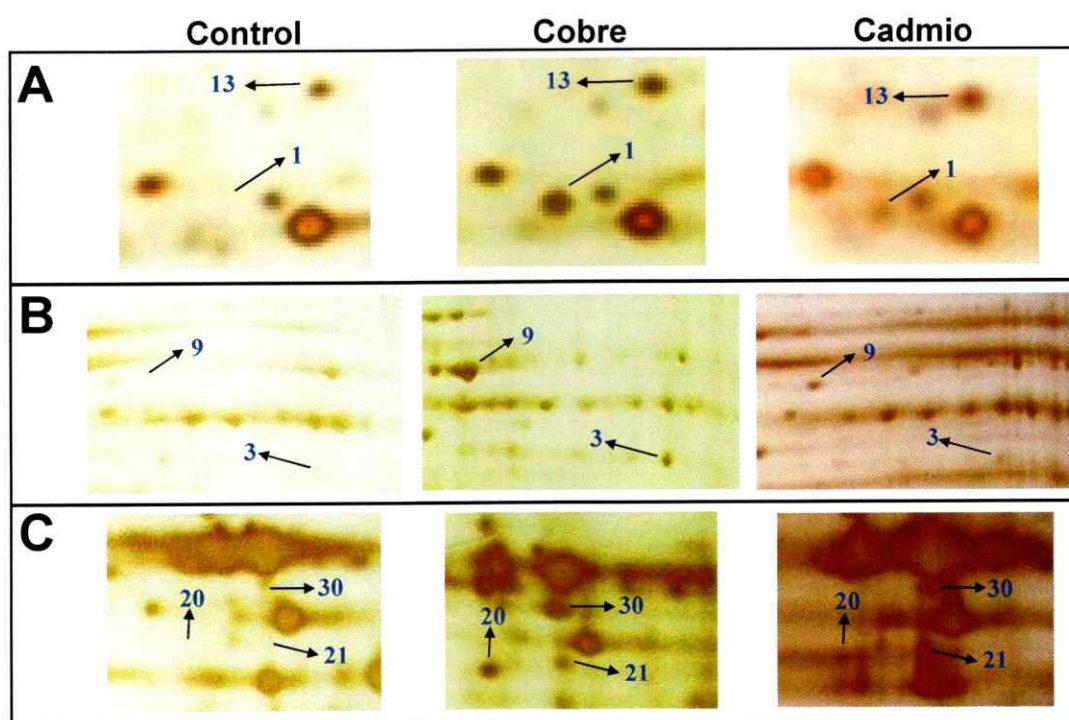


Figura 22. Efecto de 1 mM CdSO₄ sobre el proteoma de *S. metallicus*. Células de *S. metallicus* se crecieron hasta fase estacionaria temprana y se traspasaron a un medio nuevo con 1 mM CdSO₄. Las proteínas totales se separaron mediante geles 2D con un gradiente de pH 3-10 no lineal y se tiñeron con plata. Las fotos muestran ampliaciones de los cuadros punteados A, B y C de la Figura 18, y de las mismas regiones de los geles obtenidos con 100 mM CuSO₄ y 1 mM CdSO₄. Los números azules indican las proteínas que aumentaron su expresión cuando las células se expusieron a cobre y cadmio.

4.0 DISCUSIÓN

4.1 Metabolismo de los poliP en *S. metallicus*

Los poliP son moléculas ubicuas presentes en organismos de los tres dominios de la vida (Kornberg, 1999; Kornberg y col., 1999; Cardona y col., 2001). Hasta hace algunos años, no se tenía conocimiento acerca de este polímero en microorganismos acidófilos, excepto por algunas descripciones respecto a la presencia de gránulos densos a los electrones presentes en el citoplasma en algunas especies (Shively y col., 1970) los que son frecuentemente descritos como acumulaciones de poliP. Sin embargo, estos cuerpos densos al paso de los electrones pueden corresponder a otro tipo de compuestos.

En el desarrollo de esta Tesis se detectó la presencia de dos a tres grandes gránulos densos al paso de los electrones presentes en el citoplasma de *S. metallicus* (Figura 4B). Dos tipos de evidencia permitieron afirmar que estos gránulos son acumulaciones de poliP. Por una parte, el análisis mediante EELS mostró que los granulos están principalmente compuestos de fosfato (Figura 5) y probablemente corresponde a poliP. Los gránulos fueron más abundantes en *S. metallicus* que en *S. solfataricus* (Figura 4A) y *S. acidocaldarius* (datos no mostrados). Por otra parte, las observaciones anteriores se correlacionaron adecuadamente con la determinación cuantitativa de los niveles de poliP (Tabla 2), la cual mostró que los niveles de poliP en *S. metallicus* son aproximadamente 10 veces mayores que los niveles presentes en las otras dos especies del género *Sulfolobus*. El análisis enzimático específico constituye otra prueba de la existencia de poliP en *S. metallicus*.

S. metallicus presentó niveles de 180 nmoles de poliP/mg de proteína (expresado como residuos de Pi) cuando se creció medio 88. Estos niveles son mayores a los niveles

detectados en microorganismos que no acumulan altos niveles de poliP como *E. coli*, e incluso son mayores que los valores publicados para algunos microorganismos acumuladores de gránulos de poliP como *Vibrio cholerae* (Ogawa y col., 2000b), y además son cercanos a los niveles que presentan otros microorganismos que tienen la capacidad de acumular grandes cantidades de poliP (Tabla 5). La bacteria *A. johnsonii* presentó 300 nmoles de poliP/mg de proteína bajo condiciones de estrés nutricional. Es interesante destacar que *A. johnsonii* es capaz de acumular el 30 % de su masa como poliP, por lo que es utilizado en plantas de tratamientos de agua en procesos de remoción de fosfato (Kulaev y Kulakovskaya, 2000). Por otro lado, la bacteria capaz de degradar policlorobifenilos *Pseudomonas* sp. B4 presentó alrededor de 450 nmol de poliP/mg cuando se creció en bifenilo y clorobifenilo (Chávez y col., 2004). Los dos casos anteriores reflejan condiciones en las cuales se favorece la acumulación de poliP en estas bacterias, posiblemente como una respuesta a determinadas condiciones de estrés. Otro de los microorganismos que acumula gran cantidad de poliP es el acidófilo *A. ferrooxidans*, que presentó alrededor de 450 nmoles de poliP/mg de proteína (Álvarez y Jerez, 2004). Estos resultados indican claramente que los altos niveles de poliP presentes en algunos microorganismos se encuentran relacionados directamente con condiciones adversas de crecimiento. Lamentablemente, es difícil hacer comparaciones con otros sistemas, debido a la gran heterogeneidad de métodos utilizados en las determinaciones de poliP y el modo como se expresan los resultados.

Tabla 5. Comparación de los niveles de poliP presentes en diferentes microorganismos.

Microorganismo	PoliP (nmoles de Pi/mg proteína)	Referencia
Bacterias		
<i>Shigella flexneri</i>	21	Kim y col., 2002
<i>Salmonella typhimurium</i>	25	Kim y col., 2002
<i>E. coli</i>	25	Kim y col., 2002
<i>V. cholerae</i>	150	Ogawa y col., 2000b
<i>A. johnsonii</i> ‡	300	Ault-Riché y col., 1998
<i>Pseudomonas sp. B4</i>	450	Chávez y col., 2004
<i>A. ferrooxidans</i>	400	Álvarez y Jerez, 2004
Arqueas		
<i>S. metallicus</i>	180	Este estudio
<i>S. solfataricus</i>	20	Este estudio
<i>S. acidocaldarius</i>	15	Este estudio

‡ Determinado bajo condiciones de estrés nutricional de Pi.

Generalmente en el metabolismo bacteriano de poliP se ha descrito una actividad PPK que sintetiza este polímero y otra que lo degrada, denominada PPX (Kornberg y col., 1999). A pesar que se ha detectado la presencia de poliP en algunos microorganismos del dominio *Archaea* (Scherer y Bohem, 1983; Rudnick y col., 1990; Cardona y col., 2001), no existe mucho conocimiento acerca de la enzimología involucrada en el metabolismo de los poliP en este dominio. En este estudio encontramos una actividad tipo PPX en extractos crudos de *S. metallicus*, determinada a 65 °C, asociada principalmente a la fracción de membrana. Los valores de actividad tipo PPX determinados en este microorganismo fueron similares a los detectados en extractos crudos de *S. solfataricus* a 70 °C (Cardona y col., 2002). En *S. solfataricus* se demostró la presencia del gen que codifica para una PPX funcional de tipo bacteriano, y la actividad PPX recombinante purificada presentó los mayores valores de actividad entre 50 y 60 °C. Además, esta

actividad tuvo sus mejores valores a altas concentraciones de Mn^{2+} , comparado con su homólogo presente en la bacteria mesófila *E. coli*, la cual es funcional a bajas concentraciones tanto de Mn^{+2} como de Mg^{+2} (Cardona y col., 2002). El mismo efecto se observó al cuantificar la actividad tipo PPX *in vitro* en extractos crudos de *S. metallicus*, donde al aumentar la concentración de Mn^{+2} se obtuvo los mayores valores en la actividad tipo PPX (Figura 13 y datos no mostrados). Por lo tanto, posiblemente *S. metallicus* presenta una PPX homóloga a la descrita en *S. solfataricus*, pero aun no ha sido identificada debido a que no se encuentra secuenciado el genoma de *S. metallicus*.

Finalmente, a pesar que se han detectado y cuantificado los poliP en *S. metallicus*, *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*, no se ha encontrado genes que codifiquen para una polifosfato quinasa o PPK en los genomas disponibles de microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*. Es posible que las proteínas responsables de la síntesis de los poliP en estos microorganismos tengan una similitud muy baja con sus homólogos en bacterias o eucariontes. Por lo tanto, no es posible de identificar con métodos bioinformáticos. Una posibilidad sería identificar dominios funcionales o estructurales en las PPKs conocidas y otra es que la síntesis de poliP se deba a otra actividad enzimática como la PPK2 descrita en *P. aeruginosa* la cual convierte el GTP en poliP (Ishige y col., 2002).

4.2 Relación entre el metabolismo de los poliP y la tolerancia a iones de metales pesados en *S. metallicus*

Los poliP tienen la posibilidad de ser un fuerte quelante de iones metálicos debido su característica polianiónica. De tal forma, podrían ayudar a disminuir la toxicidad de algunos metales, como zinc, cobre, cadmio y hierro dentro de las células (Kornberg, 1999). Durante muchos años se ha propuesto que los poliP tienen la capacidad de detoxificar una gran diversidad de metales pesados (Keasling, 1997; Kornberg y col., 1999; Kulaev y Kulakovskaya, 2000) a través de su inmovilización, probablemente asociados directamente a los gránulos de poliP, como se ha demostrado, por ejemplo, en *S. aureus* (González y Jensen, 1998). En este sentido, existen evidencias que indican que células con un alto nivel de poliP muestran una mayor tolerancia a cadmio comparado con aquellas que presentan una reserva menor (Keasling, 1997). Sin embargo, evidencias más recientes señalan un papel más activo de los poliP en la tolerancia a iones metálicos, en la que estaría involucrada su degradación hasta Pi y el transporte de complejos metal-Pi hacia el espacio extracelular (Fig. 3). Este mecanismo constituye un sistema alternativo para tolerar metales pesados, el cual sería inespecífico al metal (Keasling, 1997; Keasling y Hupf, 1996).

Una manera directa de ensayar esta hipótesis es utilizando cepas modificadas genéticamente que presenten diferentes niveles de poliP, en que se encuentre afectada la actividad PPK o la actividad PPX. Lamentablemente, no existen actualmente herramientas genéticas reproducibles que permitan este tipo de modificación en *S. metallicus*. Recientemente se están comenzando a desarrollar métodos genéticos necesarios para la

expresión heteróloga y mutagénesis en *S. solfataricus* (Cannio y col., 1998; Jonuscheit y col., 2003; Albers y col., 2006). Sin embargo, en esta Tesis se obtuvo evidencias fisiológicas que permiten sostener que los poliP, y su degradación, serían parte de un mecanismo de destoxificación de cobre y posiblemente otros metales como cadmio en *S. metallicus*, las que se acercan al modelo hipotético propuesto por Keasling (1997).

En primer lugar, se determinó que *S. metallicus* toleró concentraciones de hasta 200 mM de cobre (Figura 8A), comparado con *S. solfataricus* (Figura 8B) y *S. acidocaldarius* (datos no mostrados), los cuales sólo fueron capaces de crecer en concentraciones menores a 1 mM de cobre. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que demostraron que *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* crecen en presencia de 0,1-1 mM de cobre (Miller y col., 1992). Se han descrito otros microorganismos acidófilos, tanto bacterias como arqueas, que toleran altas concentraciones de Cobre (Harvey y Crundwell, 1996; Baker-Austin y col., 2005), comparado con la mayoría de los microorganismos neutrófilos (Tabla 6). También se observó el mismo comportamiento para cadmio, donde el crecimiento de *S. metallicus* fue afectado por concentraciones entre 2 y 3 mM de esta sal (Figura 15), comparado con *S. solfataricus* cuyo crecimiento fue afectado por concentraciones de alrededor de 10 μ M cadmio (datos no mostrados).

Tabla 6. Tolerancia a cobre de algunos microorganismos acidófilos y neutrófilos.

Microorganismo	Concentraciones de cobre toleradas (mM)	Referencia
Acidófilos		
<i>A. ferrooxidans</i>	800	Harvey y Crundwell, 1996
<i>F. acidarmanus</i>	312	Baker-Austin y col., 2005
<i>S. metallicus</i>	200	Este estudio
<i>S. solfataricus</i>	1	Miller y col, 1992
<i>S. acidocaldarius</i>	1	Miller y col, 1992
Neutrófilos		
<i>E. hiriae</i>	8	Solioz y Stoyanov, 2003
<i>P. aeruginosa</i>	6	Treitzel y Parsek, 2003
<i>E. coli</i>	1	Niess, 1999
<i>S. cerevisiae</i>	0,2	Soares y col., 2003

Para evaluar la relación entre el metabolismo de los poliP y la tolerancia a cobre y cadmio en células de *S. metallicus*, se determinaron los niveles de poliP durante su crecimiento frente a distintas concentraciones de estos metales. Se determinó que los niveles de poliP fueron menores cuando *S. metallicus* se creció en altas concentraciones de cobre (Figura 9), lo cual fue corroborado con la desaparición de los gránulos de poliP (Figura 10). Estos resultados indican fuertemente la existencia de una relación entre los niveles de poliP y la adaptación de *S. metallicus* a crecer en presencia de cobre. Además, se estudió el efecto del cobre en los niveles de poliP en células no adaptadas a este metal. Observamos que altas concentraciones de cobre promovieron un rápido descenso en el nivel de poliP, alrededor de un 60 % de disminución en 15 min (Figura 11). No obstante, para afirmar que esta disminución se deba a que el poliP esté siendo hidrolizado hasta Pi en presencia de cobre, se determinó que la actividad tipo PPX aumentó en estas células expuestas a este metal (Figura 12). Además, este aumento de actividad se correlacionó temporalmente con el descenso en los niveles de poliP (Figura 23). Esta correlación entre

la disminución de los niveles de poliP y el incremento en la actividad PPX frente a cobre también ha sido descrita en la bacteria acidófila *A. ferroxidans* (Álvarez y Jerez, 2004). Las evidencias anteriores concuerdan con algunos pasos claves del modelo propuesto por Keasling (1997), ya que éste modelo supone como primer evento que los poliP se degradan hasta Pi, estimulado por la presencia del ion metálico tóxico. No obstante, las experiencias anteriores también fueron realizadas con cadmio, donde se observó que a pesar de que *S. metallicus* toleró altas concentraciones de este metal, los niveles de poliP no disminuyeron en células adaptadas a cadmio (Figura 16) y solo se observó una disminución de alrededor de un 20 % de los niveles de poliP cuando el microorganismo no adaptado se traspasó a 20 mM de cadmio (Figura 17). Esto sugiere que los niveles de poliP son afectados frente a altas concentraciones de metales pesados, a pesar que este fenómeno no fue observado claramente frente a cadmio debido a que experimentos con concentraciones superiores a 20 mM de este metal fueron imposibles de realizar a causa de la lisis de las células de *S. metallicus*.

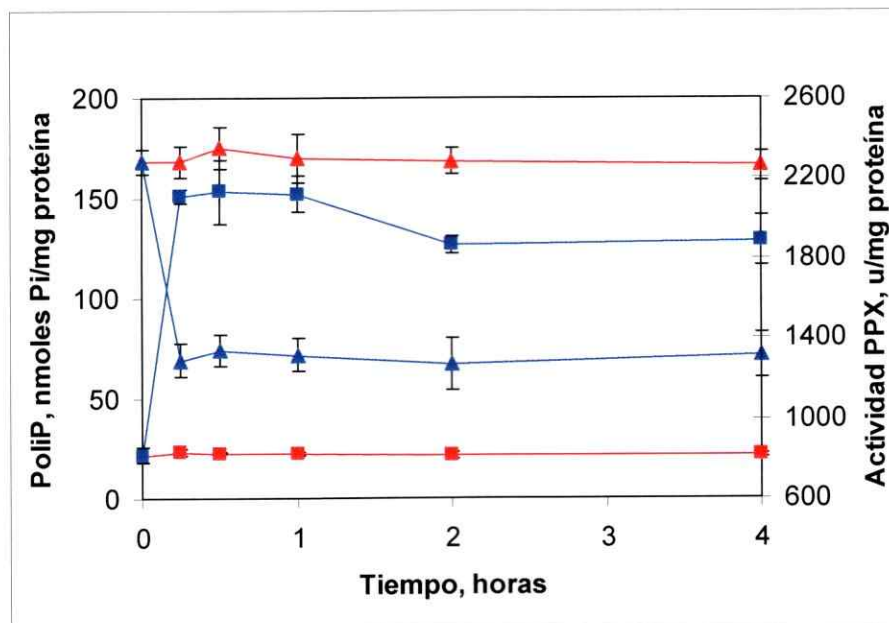


Figura 23. Curso temporal de los niveles de poliP y la actividad tipo PPX en células de *S. metallicus* expuestas a cobre. Los niveles de poliP se determinaron en células traspasadas a 0 mM (\blacktriangle) y 100 Mm (\blacktriangle) de CuSO_4 . La actividad tipo PPX se determinó en células traspasadas a 0 mM (\blacksquare) y 100 Mm (\blacksquare) de CuSO_4 .

Para explicar el posible mecanismo por el cual los iones de metales incrementan la actividad degradadora de poliP afectando el metabolismo de este polímero, se estudió el efecto *in vitro* de este ión sobre la actividad tipo PPX en extractos crudos de *S. metallicus*. Los resultados mostraron un efecto directo de los iones Cu^{2+} sobre la actividad tipo PPX, estimulándola en un rango de concentraciones micromolares (Figura 13). Otros iones como Cd^{2+} y Zn^{2+} también mostraron un efecto estimulador en este mismo rango de concentraciones (datos no mostrados). Interesantemente, en extractos crudos de la bacteria acidófila *A. ferroxidans*, la actividad PPX también fue estimulada por iones como Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} (Álvarez y Jerez, 2004). De esta manera la disponibilidad intracelular de estos iones sería la responsable del efecto que tienen sobre el metabolismo de los poliP. Estos

resultados sugieren entonces un efecto estimulador de algunos iones de metales pesados sobre la actividad tipo PPX en *S. metallicus*. Es interesante que el efecto de estos iones se observó en este nivel de concentraciones, ya que se ha demostrado que el nivel intracelular libre de ellos está fuertemente controlado y alcanza concentraciones de este orden (Finney y O'Halloran, 2003). Posiblemente, las concentraciones intracelulares de los iones metálicos se encuentran reguladas por efecto de metalochaperonas descritas recientemente, que guiarían a los metales a través del citoplasma hasta sus lugares de destino (Huffman y O'Halloran, 2000; Finney y O'Halloran, 2003).

4.3 Transporte de fosfato y cobre en el modelo de destoxificación de metales pesados en *S. metallicus*.

El aumento de la actividad tipo PPX de *S. metallicus* en respuesta a la presencia de cobre implica la generación de Pi. Para estudiar el destino de este Pi, se empleó una estrategia radiactiva midiendo la salida del fosfato desde células de *S. metallicus* marcadas *in vivo* con ^{32}P hacia el espacio extracelular. Se observó que la aparición de ^{32}P en el sobrenadante de los cultivos fue estimulada con la presencia de cobre de una manera dependiente de la concentración (Figura 14). Este aumento en la salida de Pi debido a la presencia de cobre también fue observada en la bacteria acidófila *A. ferroxidans* (Álvarez y Jerez, 2004). Además, demostramos mediante TLC que la marca liberada desde las células se debió principalmente a la liberación de Pi y no a productos de lisis celular (datos no mostrados). Sin embargo, no es posible afirmar concluyentemente cuál es el origen intracelular de este Pi liberado. No obstante, el efecto de Cu^{2+} sobre la salida de Pi fue posterior al momento en que se observó la

disminución del nivel celular de poliP (Figura 11), lo que sugiere fuertemente que al menos una parte del Pi generado debido a la hidrólisis de poliP en presencia Cu^{2+} fue transportado fuera de las células.

La formación y transporte de un complejo metal-fosfato ha sido demostrado en células o en vesículas de membrana aisladas de algunas bacterias mediante determinaciones de cambios en los potenciales de membrana (van Veen y col., 1994a y 1994b). Este tipo de sistema no se encuentra disponible en *S. metallicus* y la estrategia utilizada para tratar de determinar el eflujo de cobre en este microorganismo fue marcar las células con ^{64}Cu . No se obtuvo resultados satisfactorios en el marcaje de las células con ^{64}Cu para estudiar la salida del posible complejo metal-fosfato. La posible explicación de este resultado negativo en la marcación de las células de *S. metallicus* con ^{64}Cu es el ambiente ácido en el cual este microorganismo vive. Por un lado, existiría una competencia entre el cobre y los protones, y además, recientemente se ha descrito que generalmente los microorganismos acidófilos presentan una compleja homeostasis de pH debido a que presentan potenciales de membrana inversos y membranas celulares altamente impermeables (Baker-Austin y Dopson, 2007). Además, varios autores han dado explicación de la alta tolerancia a metales pesados que presentan los microorganismos acidófilos, debido al efecto que tiene la alta cantidad de protones en sus medios y se ha propuesto que un ambiente protonado es suficiente para proteger a las células de los metales tóxicos (Miller y col., 1992). Finalmente, no se pudo determinar el eflujo del metal desde las células, pero aunque la formación del complejo metal-fosfato no se demostró en *S. metallicus*, no se puede descartar que el cobre tenga un efecto indirecto que afecta los niveles de poliP.

Como el modelo propuesto para la destoxificación de iones metálicos involucra el transporte de complejos metal-fosfato hacia el exterior de las células. Se ha propuesto que un transportador de fosfato inorgánico tipo Pit, que transporta en forma reversible complejos metal-fosfato, sería el candidato para este propósito (Keasling, 1997; van Veen, 1997). De esta manera se realizó una búsqueda bioinformática de este transportador de fosfato tipo Pit en los genomas disponibles de *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* y *S. tokodaii*. No se encontró este transportador tipo Pit, pero por el contrario encontramos un marco de lectura abierto que codifica para un homólogo de la proteína Pho84, la cual es parte del sistema transportador de fosfato de la levadura *S. cerevisiae* (Remonsellez, 2004). Evidencias experimentales indican que la proteína Pho84 de *S. cerevisiae* transporta complejos metal-fosfato de forma similar al transportador tipo Pit (Persson y col., 1993). La proteína Pho84 pertenece a la familia de simporters Pi:H⁺ y además es miembro de la “Major facilitator superfamily” que se caracterizan por funcionar como sistemas bidireccionales (Pao y col., 1998). No obstante, es interesante que estas arqueas acidófilas presenten un transportador tipo Pho84, ya que este transportador es funcional en condiciones ambientales ácidas (pH 4,5) en la levadura (Persson y col., 2003). Lo discutido anteriormente no es evidencia de que *S. metallicus* presente un transportador de fosfato tipo Pho84, ya que no existe la secuencia del genoma de este microorganismo. Sin embargo, es interesante que la proteína tipo Pho84 esté presente en todos los genomas disponibles de arqueas acidófilas: *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius*, *S. tokodaii*, *M. sedula*, *Caldivirga maquilensis*, *F. acidarmanus*, *Picrophilus torridus*, *T. acidophilum* y *T. volcanium*; y también en la bacteria acidófila *A. ferroxidans* (Álvarez y Jerez, 2004). De esta manera, proponemos como candidato a transportar complejos metal-fosfato desde el

interior de las células de microorganismos acidófilos al transportador tipo Pho84, el cual participaría en el mecanismo de destoxificación de iones de metales pesados. Además, recientemente se han descrito en todos los genomas disponibles de microorganismos acidófilos putativos sistemas de eflujo de protones del tipo H⁺ ATPasas (antiporters y simporters), para remover el exceso de protones para de esta forma mantener su homeostasis (Baker-Austin y Dopson, 2007).

A pesar que el genoma de *S. metallicus* no se encuentra disponible y a no tener clara la existencia de mecanismos de captación y eflujo de cationes en este microorganismo, es posible que *S. metallicus* utilice un mecanismo de resistencia a metales pesados mediado por poliP tal como el que se describió para la bacteria acidófila *A. ferrooxidans* (Álvarez y Jerez, 2004), el cual tendría una gran significancia en la supervivencia de este tipo de microorganismos extremófilos que normalmente están expuestos a altas concentraciones de metales pesados y son utilizados en procesos de biominería (Dopson y col., 2003).

Finalmente, es posible que el modelo propuesto para la destoxificación de metales mediado por poliP también pueda operar en otros microorganismos del género *Sulfolobus*. Sin embargo, los bajos niveles de poliP que presentan estos microorganismos comparados con *S. metallicus* (Tabla 4), pueden hacer que este sistema sea de menos importancia en microorganismos que no son capaces de tolerar altas concentraciones de metales pesados (Dopson y col, 2003). Es importante destacar que los bajos niveles de poliP en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* no se deben a la ausencia de fosfato en sus medios de crecimiento, ya que en sus ambientes naturales de crecimiento el fosfato ha sido encontrado en diferentes formas iónicas dependiendo del pH del medio (Amend y Shock,

2001). Además, posiblemente estos microorganismos presentan una combinación de mecanismos de resistencia a metales pesados, incluyendo aquellos que son inducibles y específicos tales como los transportadores tipo CopB recientemente descritos en *S. solfataricus* y *F. acidarmanus* (Baker-Austin y col., 2005; Ettema y col., 2006).

4.4. Efecto de cobre y cadmio en el proteoma de *S. metallicus*

A pesar de algunos de los microorganismos actualmente utilizados en procesos de biolixiviación han sido aislados desde ambientes que contienen altas concentraciones de metales pesados (Dopson y col., 2003; Baker-Austin y Dopson, 2007), existen pocos trabajos enfocados al estudio de la resistencia a estos elementos en arqueas acidófilas. Por lo tanto, la mayoría de los mecanismos genéticos y bioquímicos responsables de la resistencia a metales pesados en este tipo de microorganismos son desconocidos (Baker-Austin y col., 2007). Basado en estos antecedentes se decidió estudiar la respuesta global del proteoma de *S. metallicus*, el cual toleró altas concentraciones de metales pesados (Figuras 8A y 15), con el objetivo de encontrar determinantes genéticos involucrados en tolerancia específicamente a cobre y cadmio.

Un comportamiento importante observado en este estudio es la gran cantidad de proteínas que desaparecen o disminuyen su expresión cuando *S. metallicus* se enfrentó a cobre, y especialmente a cadmio. Este comportamiento también ha sido observado en estudios similares en donde *F. acidarmanus* se enfrentó a [As(III)] y a cobre (Baker-Austin y col., 2005; Baker-Austin y col., 2007). Por otro lado, un gran número de proteínas aumentó su expresión en *S. metallicus*, en presencia de cobre y cadmio, y la mayoría de

estas proteínas aparecen solo frente a estas condiciones. Sólo se analizó por espectrometría de masa 18 de las proteínas que aumentaron su expresión en cobre y se determinó que están relacionadas con los siguientes procesos celulares: producción y conversión de energía, respuesta a estrés, biosíntesis de aminoácidos y regulación de la transcripción.

Entre las proteínas involucradas en la producción y conversión de energía se identificó la cadena B de una ATP sintasa. Generalmente, cuando las células son sometidas a alguna condición de estrés como la presencia de metales pesados, se produce una demanda energética mayor por parte de las células (Baker-Austin y col., 2005). Esta demanda energética podría relacionarse con la función energética que puede tener el poliP, debido a que cuando células de *S. metallicus* se traspasaron a cobre, observamos una disminución en los niveles de este polímero (Figuras 9 y 11), lo que puede reflejarse en una disminución de los niveles de ATP, y para poder restaurar sus niveles se debe producir una estimulación en la síntesis de nucleótidos. El aumento en la demanda energética debido a la presencia de metales pesados también puede ser motivo de la expresión de las dos oxidoreductasas identificadas en *S. metallicus* que utilizan NAD^+ como aceptor de electrones, las que están generalmente involucradas en cadenas transportadoras de electrones. Pero es interesante que, en los últimos años, a las oxidoreductasas de variados microorganismos se les esté asignando un importante papel en la respuesta celular al estrés oxidativo (Sitthisak y col., 2005; Rodríguez-Montelongo y col., 2006; Kaur y col., 2006). En *E. coli* se determinó que una deshidrogenasa dependiente de NADH disminuye la susceptibilidad de algunas cadenas respiratorias a ser dañadas por cobre, sugiriendo que esta proteína contribuye a la protección oxidativa y a la homeostasis del cobre (Rodríguez-Montelongo y col., 2006). En *S. aureus* se describió una oxidasa que une cobre y que tiene

un importante papel en la homeostasis del cobre y en la respuesta al estrés oxidativo (Sitthisak y col., 2005). El papel que juegan algunas deshidrogenadas dependientes de NADH en el estrés producido por metales de transición también ha sido descrita en Haloarqueas (Kaur y col., 2006). Mediante microarreglos de ADN se observó que el arqueón hipertermófilo *Pyrococcus furiosus* respondió al estrés oxidativo expresando dos complejos compuestos por oxidoreductasas (Williams y col., 2007). Sumado a lo anterior, algunas proteínas involucradas en reparar daño oxidativo, tales como oxidasas dependientes de NADH y tiorredoxinas reductasas, se expresaron en *F. acidarmanus* al exponerlo a [As(III)] (Baker-Austin y col., 2007); y la expresión de este tipo de proteínas también ha sido sugerida al exponer este microorganismos a altas concentraciones de cobre (Baker-Austin y col., 2005). Como conclusión podemos decir que las oxidoreductasas juegan un papel importante frente al estrés oxidativo y de esta manera eliminarían las especies reactivas de oxígeno, las cuales constituyen el mayor componente de estrés producido por los metales de transición (Gaetke y Chow, 2003; Davies, 2005; Kaur y col., 2006).

Entre las proteínas identificadas en *S. metallicus* que están involucradas en la respuesta a estrés se encuentra una subunidad de la chaperonina HSP60. Las proteínas pertenecientes a la familia HSP se encuentran presentes en todos los organismos vivos y son sintetizadas en altos niveles bajo condiciones de estrés como cambios de temperatura, pH, sal y estrés oxidativo. La gran función de estas proteínas es prevenir la agregación y mantener a las proteínas plegadas en su conformación nativa (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). De esta manera, la proteína de estrés térmico expresada en *S. metallicus*, en presencia de cobre y cadmio podría estar directamente relacionada con las alteraciones

conformacionales producidas en las proteínas. Hasta hace algunos años, la regulación de este tipo de proteínas debido al efecto de los metales pesados sólo estaba descrita en eucariontes y levaduras, y sólo en algunos procariontes y arqueas (Ferianc y col., 1998). Recientemente, mediante un análisis proteómico de *F. acidarmanus* expuesto a [As(III)] y a cobre, se observó la expresión de proteínas asociadas con el plegamiento de proteínas, incluyendo la chaperonina de la familia HSP60 y la proteína de estrés térmico DnaK (HSP70) (Baker-Austin y col., 2005; Baker-Austin y col., 2007). La otra proteína identificada, involucrada en la respuesta a estrés en *S. metallicus*, es una subunidad del proteosoma. El proteosoma es un complejo proteico presente en todos los organismos vivos y tiene la capacidad de degradar proteínas hasta aminoácidos, los cuales pueden ser utilizados en la síntesis de nuevas proteínas (Maupin-Furlow y col., 2005; Sun y col., 2007). En el arqueón termoacidófilo *T. acidophilum* se demostró que el proteosoma y chaperonas fueron muy inducidas frente a condiciones de estrés, indicando un alta tasa de renovación de proteínas (Sun y col., 2007) e interesantemente esta respuesta puede deberse a la gran producción de especies de oxígeno que afectan a algunos constituyentes celulares como proteínas (Davies, 2005). También se ha descrito que la subunidad $\beta 1$ del proteosoma del arqueón *P. furiosus* es expresada frente a condiciones de estrés como la temperatura (Madding y col., 2006). En los últimos años, se ha dado al proteosoma un papel de controlador de procesos biológicos que pueden salvar a las células de la muerte, e interesantemente podrían jugar un papel muy estrecho con chaperonas en asegurar la calidad de las proteínas frente a algún estrés (Maupin-Furlow y col., 2005). Esta puede ser una de las explicaciones del porqué se expresarían algunas chaperonas y subunidades del proteosoma en *S. metallicus* cuando se enfrentó a altas concentraciones de cobre.

Las proteínas involucradas en la síntesis de aminoácidos que se expresaron en *S. metallicus* frente a cobre y cadmio, son una fosfoglicerato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , involucrada en la síntesis de L-serina (Thompson y col., 2005) y una glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD, importante en la asimilación de amonio por parte de las células (Consalvi y col., 1991). La inducción del proteosoma en *S. metallicus* puede ser una señal que indique la necesidad de un aumento en la tasa de recambio de proteínas en estas células. Así sería normal que proteínas relacionadas con la biosíntesis de proteínas se expresen. Una explicación alternativa tiene referencia a que ambas proteínas expresadas frente a cobre y cadmio son deshidrogenasas dependientes de NAD^+ y tienen funciones de oxidoreducción. Como se discutió anteriormente, está demostrado que las oxidoreductasas jugarían un papel importante frente al estrés oxidativo producido por metales de transición (Gaetke y Chow, 2003; Davies, 2005; Kaur y col., 2006). En *Halobacterium halobium* se caracterizó una glutamato deshidrogenasa, cuya actividad fue estimulada por todos los aminoácidos con la excepción de L-glutamato (Bonete y col, 1996). En el hipertermófilo *Pyrobaculum islandicum* se purificó una glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ cuya actividad se incrementó por la adición de denaturantes de proteínas y además, presentó una alta estabilidad frente a estos compuestos (Kujo y Ohshima, 1998). Por otro lado, una glutamato deshidrogenasa descrita en plantas funciona como destoxicadora de amonio al aumentar la acumulación de este compuesto en las células frente a algunas condiciones de estrés como temperatura y salinidad, en las cuales se produce una degradación de proteínas. Interesantemente, esta proteína es termoestable y tiene una mayor homología con las glutamato deshidrogenasas de arqueas, comparado con las enzimas de origen eucarionte (Syntichaki y col., 1996). En *F. acidarmanus* se expresaron

dos proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas frente al estrés por arsénico, lo que puede tener como fin incrementar el recambio de proteínas frente al estrés celular (Baker-Austin y col., 2007). Por lo tanto, este tipo de proteínas podrían ser determinantes en la respuesta a condiciones celulares adversas. Es interesante comentar que en un estudio proteómico de *S. cerevisiae* en respuesta a cadmio, aumentaron su expresión proteínas involucradas en la biosíntesis de los aminoácidos que contienen un residuo de azufre. Esto sugiere un aumento en la síntesis de cisteína, y por lo tanto de glutatión, el cual es esencial en la desintoxicación celular debida a cadmio (Vido y col., 2001). El glutatión es un péptido formado por cisteína, ácido glutámico y glicina, el cual tiene propiedades antioxidantes. A pesar que el glutatión no ha sido descrito en arqueas, es interesante que proteínas relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos, que aumentaron su expresión frente a cobre y a cadmio en *S. metallicus*, sean parte de las vías metabólicas necesarias para la síntesis de dos aminoácidos que conforman el glutatión en eucariontes.

Las dos últimas proteínas identificadas tienen relación con la regulación de la transcripción, una de ellas es un regulador transcripcional putativo y la otra, el terminador transcripcional NusA, el cual es un factor de terminación intrínseca de la transcripción (Shibata y col., 2007). Los cambios en la expresión de proteínas producidos por la exposición de células a cobre puede deberse a la presencia de reguladores transcripcionales dependientes de metales, que estimulen o repriman la transcripción de genes específicos. En un estudio genómico, en el cual células *P. furiosus* se sometieron a estrés oxidativo, se encontró que dos reguladores transcripcionales aumentaron su expresión. Uno tenía relación con la síntesis de aminoácidos y el otro con la represión genética dependiente de iones metálicos (Williams y col., 2007). El terminador

transcripcional NusA también tiene funciones importantes en la respuesta celular a factores adversos. En *E. coli* se demostró que este factor transcripcional es sobreexpresado cuando las células son sometidas a condiciones de estrés como el frío (Bae y col., 2000). Por lo tanto, el aumento de la expresión de reguladores transcripcionales dependientes de metales sería clave para la respuesta celular a estrés.

Una gran cantidad de proteínas que aumentaron su expresión frente a cobre en *S. metallicus* presentaron funciones desconocidas al buscar homologías en las bases de datos. A pesar de esto, se observó un amplio espectro funcional de proteínas expresadas frente a cobre y cadmio. Estos resultados son consistentes con otros resultados de expresión global de proteínas en el arqueón *F. acidarmanus* (Baker-Austin y col., 2005; Baker-Austin y col., 2007), en comunidades naturales de drenajes ácidos de minas (Ram y col., 2005), y en otros microorganismos procariontes y eucariontes (Vido y col., 2001; Noel-Georis y col., 2003), los cuales sugieren una respuesta, de mecanismos celulares de estrés y en las cadenas respiratorias, para responder frente a los metales tóxicos. Por lo tanto, una expresión coordinada de distintos grupos de genes, sugiere la existencia de redes regulatorias que responderían ante la presencia del iones metálicos (Novo y col., 2000).

En el análisis proteómico desarrollado en esta Tesis no se detectó el incremento en la expresión de las posibles bombas de eflujo de cobre. Esto pudo deberse a que por un lado sólo se analizaron 18 proteínas que aumentaron su expresión frente a cobre y por otro lado, que las bombas de eflujo de metales son proteínas de membrana y no son fáciles de resolver en geles normales de poliacrilamida. Tampoco se observó este tipo de bombas de eflujo en análisis proteómicos realizados en *F. acidarmanus* frente a cobre y

arsenico (Baker-Austin y col, 2005; Baker-Austin y col., 2007). Esto puede deberse a que las proteínas de membrana presentan una solubilidad muy baja, y por lo tanto no pueden resolverse mediante electroforesis bidimensional. Además, las membranas de las arqueas se caracterizan por ser muy impermeables (Van de Vossenberg y col., 1998), por lo que se sugiere realizar fraccionamientos celulares para poder encontrar bombas de eflujo en trabajos futuros.

Finalmente, a pesar que no se cuenta con la secuencia del genoma de *S. metallicus*; este análisis preliminar, en cual identificamos algunas proteínas involucradas en la homeostasis de cobre y cadmio, es el primero realizado en una arquea termoacidófila involucrada en procesos de biolixiviación de minerales y abre una nueva ventana para posibles investigaciones enfocadas a la caracterización bioquímica y molecular de algunos de estos mecanismos de resistencia a metales pesados presentes en este microorganismo.



5.0 CONCLUSIONES

Comparado con otras especies del género *Sulfolobus*, *S. metallicus* acumula una elevada cantidad de poliP (180 nmol/mg de proteína, expresado como Pi) los que se pueden observar en la forma de abundantes gránulos densos a los electrones.

S. metallicus toleró altas concentraciones de cobre y cadmio con respecto a otras especies del género *Sulfolobus*.

La presencia de cobre en células no adaptadas, promueve la degradación de los poliP, mediada por una estimulación de la actividad hidrolizante tipo PPX, y el transporte de Pi hacia el exterior de la célula, probablemente en la forma de complejos metal-Pi.

La actividad tipo PPX en extractos libres de células desde *S. metallicus* es estimulada por concentraciones micromolares de varios metales como cobre, cadmio y zinc.

Sugerimos que los poliP constituyen un mecanismo de tolerancia transiente en *S. metallicus* para tolerar una alta concentración de cobre.

Mediante una aproximación proteómica se identificaron algunas proteínas que aumentaron su expresión frente a cobre y cadmio en *S. metallicus*. Las funciones posibles de estas proteínas están relacionadas con la producción y transporte de energía, la biosíntesis de aminoácidos, la respuesta a estrés, y la regulación de la transcripción.

Las proteínas inducidas frente a cobre y cadmio en *S. metallicus* indican que cuando estos metales están presentes en altas concentraciones producirían un estrés oxidativo en las células.

Debido al amplio espectro funcional de proteínas inducidas frente a cobre y cadmio, proponemos que *S. metallicus* podría presentar un sistema complejo de respuesta a metales pesados compuesto por una combinación de varios mecanismos de resistencia que estarían actuando a distintos niveles dentro de las células.

6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, F., Gentina, J. y Bustos S. 1993. Bioleaching of minerals -a valid alternative for developing countries. *J. Biotechnol.* **31**: 115-123.
- Aguilar, A. 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**: 89-92.
- Ahn, K. y Kornberg, A. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *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* CTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 374-377.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. 1992. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 22556-22561.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* **268**: 633-639.
- Albers, S.-V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampé, R., Driessen, A. J. M. y Schleper, C. 2006. Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 102-111.
- Álvarez, S. y Jerez, C. A. 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5177-5182.
- Amend, J. P. y Shock, E. L. 2001. Energetic of overall metabolic reactions of thermophilic and hyperthermophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**: 175-243.
- Aravalli, R. N. y Garrett, R. A. 1997. Shuttle vectors for hyperthermophilic archaea. *Extremophiles* **1**: 183-191.

- Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M. y Kornberg, A. 1998. A novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 1841-1847.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M y Severinov, K. 2000. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7784-7789.
- Baker-Austin, C., Dopson, M., Wexler, M., Sawers, R. G. y Bond, P. L. 2005. Molecular insight into extreme copper resistance in the extremophilic archaeon "*Ferroplasma acidarmanus*" Fer1. *Microbiology* **151**: 2637-2646.
- Baker-Austin, C., Dopson, M., Wexler, M., Sawers, R. G., Stemmler, A., Rosen, B. P. y Bond, P. L. 2007. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon "*Ferroplasma acidarmanus*" Fer1. *Extremophiles* **11**: 425-434.
- Baker-Austin, C. y Dopson, M. 2007. Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**: 165-171.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D. y Pace, N. R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9188-9193.
- Barreto, M., Quatrini, R., Bueno, S., Arraigada, C., Valdes, J., Silver, S., Jedliki, E. y Holmes, D. S. 2003. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from analysis of its partial genome sequence. *Hydrometallurgy* **71**: 97-105.
- Bathe, S. y Norris, P. R. 2007. Ferrous iron- and sulfur-induced genes in *Sulfolobus metallicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2491-2497.
- Baumann, P., Qureshi, S. A. y Jackson, S. P. 1995. Transcription: new insights from studies on *Archaea*. *Trends Genet.* **11**: 279-283.
- Bonete, M. J., Perez-Pomares, F., Ferrer, J. y Camacho, M. L. 1996. NAD-glutamate dehydrogenase from *Halobacterium halobium*: inhibition and activation by TCA intermediates and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**: 14-24.
- Boyer, A., Magnin, J. P. y Ozil, P. 1998. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass. *Biotechnol. Lett.* **20**:187-190.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brown, J. R. y Doolittle, W. F. 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 456-502.
- Bruins, M. R., Kapil, S. y Oehme, F. W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**:198-207.
- Cannio, R., Contursi, P., Rossi, M. y Bartolucci, S. 1998. An autonomously replicating transforming vector for *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **180**: 3237-3240.
- Cardona, S. T. 2001. Polifosfatos inorgánicos en el dominio *Archaea*: estudio en el género *Sulfolobus*. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Cardona, S., Remonsellez, F., Guiliani, N. y Jerez, C. A. 2001. The glycogen-bound polyphosphate kinase from *Sulfolobus solfataricus* is actually a glycogen synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4773-4780.
- Cardona, S. T., Chávez, F. P. y Jerez, C. A. 2002. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in *Archaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4812-4819.
- Chávez, F. P., Lünsdorf, H. y Jerez, C. A. 2004. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3064-3072.
- Chen, L., Brügger, K., Skovgaard, M., Redder, P., She, Q., Torarinsson, E., Greve, B., Awayez, M., Zibat, A., Klenk, H-P. y Garrett, R. A. 2005. The genome of *Sulfolobus solfataricus*, a model organism of the *Crenarchaeota*. *J. Bacteriol.* **187**: 4992-4999.
- Choe, L. H. y Lee, K. H. 2000. A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome análisis: The Multiphor, the IPGphor and the Protean IEF cell. *Electrophoresis* **21**: 993-1000.

- Ciaramella, M., Pisani, F. M. y Rossi, M. 2002. Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. A. van Leeuwenhoek **81**: 85-97.
- Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Gambacorta, A., De Rosa, M. y Scandurra, R. 1991. Glutamate dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Eur. J. Biochem. **196**: 459-467.
- Das, A., Modak, J. M. y Natarajan, K. A. 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. A. van Leeuwenhoek **73**: 215-222.
- Davies, M. J. 2005. The oxidative environment and protein damage. Biochim. Biophys. Acta **1703**: 93-109.
- Deigweiher, K., Drell IV, T. L., Prutsch, A., Scheidig, A. J. y Lübben, M. 2004. Expression, isolation, and crystallization of the catalytic domain of CopB, a putative copper transporting ATPase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. J. Bionerget. Biomem. **36**: 151-159.
- Dennis, P. P. 1997. Ancient ciphers: translation in *Archaea*. Cell **89**: 1007-1010.
- d'Hugues, P., Morin, D. y Fousher, S. 2001. HIOX project: a bioleaching process for the treatment of chalcopyrite concentrates using extreme thermophiles. En V. S. T. Ciminelli y O. Jr. Garcia (Eds.), Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development. Elsevier. Parte A, pp: 75-83.
- Doolittle, W. F. 1999. Phylogenetic classification and the Universal Tree. Science **284**: 2124-2128.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P. R., y Bond, P. L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. Microbiology **149**: 1959-1970.
- Ettema, T. J. G., Huynen, M. A., de Vos, W. M. y van der Oost, J. 2003. TRASH: a novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance. Trends Biochem. Sci. **28**: 170-173.
- Ettema, T. J. G., Brinkman, A. B., Lamers, P. P., Kornet, N. G., de Vos, W. M. y van der Oost, J. 2006. Molecular characterization of a conserved archeal copper resistance

- (*cop*) gene cluster and its copper-responsive regulator in *Sulfolobus solfataricus* P2. *Microbiology*. **152**: 1969-1979.
- Ferianc, P., Farewell, A. y Nystrom, T. 1998. The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **144**: 1045-1050.
- 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.
- Gaasterland T. 1999. Archaeal genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 542-547.
- Gaetke, L. M. y Chow, C. K. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* **189**: 147-163.
- Gentina, J. y Acevedo, F. 1985. Microbial ore leaching in developing countries. *Trends Biotechnol.* **3**: 86-89.
- Giavalisco, P., Nordhoff, E., Kreitler, T., Kloppel, K. D. Lehrach, H., Klose, J. y Gobom, J. 2005. Proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* by two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* **5**: 1902-1913.
- Gihring, T. M., Bond, P. L., Peters, S. C. y Banfield, J. F. 2003. Arsenic resistance in the archaeon "*Ferroplasma acidarmanus*": new insights into the structure and evolution of the *ars* genes. *Extremophiles* **7**: 123-130.
- González, H. y Jensen, T. E. 1998. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* **93**:179-185.
- Guiliani, N. y Jerez, C. A. 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2318-2324.
- Gupta, R. S. 1998. What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Mol. Microbiol.* **29**: 695-707.
- Harold, F. M. 1966. Inorganic polyphosphates in biology: Structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.* **30**: 772-794.
- Hartl, F. y Hayer-Hartl, M. 2002. Protein folding – molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852:1858.

- Harvey, P. I. y Crundwell, F. K. 1996. The effect of As(III) on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans* in an electrolytic cell under controlled redox potential. *Min. Engin.* **9**: 1059-1068.
- Hatzimanikatis, V., Choe, L. H. y Lee., K. H. 1999. Proteomics: Theoretical and experimental considerations. *Bitechnol. Prog.* **15**: 312-318.
- Horiike, T., Hamada, K., Kanaya, S. y Shinozawa, T. 2001. Origin of eukaryotic cell nuclei by symbiosis of *Archaea* in *Bacteria* is revealed by homology-hit analysis. *Nat. Cell Biol.* **3**: 210-214.
- Hsieh, P. C., Shenoy, B. C., Haase, F. C., Jentoft, J. E. y Phillips, N. F. 1993. Involvement of tryptophan(s) at the active site of polyphosphate/ATP glucokinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **32**: 6243-6249.
- Huber, G., Spinner, C., Gambacorta, A. y Stetter, K. O. 1989. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaebacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**: 38-47.
- Huffman, D. L. y O'Halloran, T. V. 2000. Energetic of copper trafficking between the Atx1 metallochaperone and the intracellular copper transporter, Ccc2. *J. Biol. Chem.* **275**: 18611-18614.
- Ishige, K., Zhang, H. y Kornberg, A. 2002. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16684-16688.
- Johnson, D. B. 1998. Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**:307-317.
- Jonuscheit, M., Martusewitsch, E., Stedman, K. M. y Schleper, C. 2003. A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Mol. Microbiol.* **48**: 1241-1252.
- Kaur, A., Pan, M., Meislin, M., Facciotti, M. T., El-Gewely, R., y Baliga, N. S. 2006. A systems view of haloarchaeal strategies to withstand stress from transition metals. *Genome Res.* **16**: 841-854.
- 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.

- 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. 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **829**: 242-249.
- Keasling, J. D., Van Dien, S. J. y Pramanik, J. 1998. Engineering polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*: implications for bioremediation of inorganic contaminants. *Biotechnol. Bioeng.* **58**: 231-239.
- Keasling, J., Van Dien, S., Trelstad, P., Renninger, N. y McMahon, K. 2000. Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)*. **65**: 324-331.
- Kim, K.S., Rao, N. N., Fraley, C. D. y Kornberg, A. 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7675-80.
- Kornberg, A. 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* **177**: 491-496.
- Kornberg, A.. 1999. Inorganic polyphosphate: A molecule of many functions. En H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Vol. 23, pp 1-17. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kornberg, A., Rao, N. y Ault-Riché, D. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 89-125.
- Kulaev, I. S., Kulakovskaya, T. V., Andreeva N. A. y Lichko L. P. 1999. Metabolism and function of polyphosphates in bacteria and yeast. En H.C. Schröder y W.E.G. Müller (eds.), *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, Vol. 23, pp 27-43. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kulaev, I., y Kulakovskaya, T. 2000. Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 709-734.
- Kujo, C. y Ohshima, T. 1998. Enzymological characteristics of the hyperthermoestable NAD-dependent glutamate dehydrogenase from the archaeon *Pyrobaculum islandicum* and effects of denaturants and organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2152-2157.

- Kumble, K. D., Ahn, K. y Kornberg, A. 1996. Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14391-14395.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. y Kornberg, A. 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *Escherichia coli*. Science **293**: 705-708.
- Lindström, E. B., Sandström, A. y Sundkvist, J-F. 2001. A combined two-step bioleaching process at moderately and extremely thermophilic temperatures. En V. S. T. Ciminelli y O. Jr. Garcia (Eds.), Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development. Elsevier. Parte A, pp: 55-65.
- Lindström, E. B., Gunneriusson, E. y Tuovinen, O. H. 1992. Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. Crit. Rev. Biotechnol. **12**: 133-155.
- Lünsdorf, H., Strömpl, C., Osborn, A. M., Bennasar, A., Moore, E. R. B., Abraham, W. R. y Kenneth, N. T. 2000. Approach to analyze interactions of microorganisms, hydrophobic substrates, biofilms and to study initial events in microbiogeological processes. Meth. Enzymol. **336**: 317-331.
- Macario, A. J. L., Lange, M., Ahring, B. K. y De Macario, E. C. 1999. Stress genes and proteins in archaea. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 923-967.
- Madding, L. S., Michel, J. K., Shockley, K. R., Conners, S. B., Epting, K. L., Johnson, M. R. y Kelly, R. M. 2006. Role of $\beta 1$ subunit in the function and stability of the 20S proteasome in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Bacteriol. **189**: 583-590.
- Mandal, A. K., Cheung, W. D. y Arguello, J. M. 2002. Characterization of a thermophilic P-type Ag^+/Cu^+ -ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. J. Biol. Chem. **277**: 7201-7208.
- Maupin-Furlow, J. A., Gil, M. A., Humbard, M. A., Kirkland, P. A., Li, W., Reuter, C. J. y Wright, A. J. 2005. Archaeal proteasomes and other regulatory proteases. Curr. Opin. Microbiol. **8**: 720-728.
- Miller, K. W., Risanico, S. S. y Risatti, J. B. 1992. Differential tolerance of *Sulfolobus* strains to transition metals. FEMS Microbiol. Lett. **93**: 69-74.

- Nemati, M., Lowenadler, J. y Harrison, S. T. L. 2000. Particle size effects in bioleaching of pyrite by acidophilic thermophile *Sulfolobus metallicus* (BC). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 173-179.
- Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 730-750.
- Noel-Georis, I., Vallaey, T., Chauvaux, R., Monchy, S., Falmagne, R., Mergeay, M. y Wattiez, R. 2004. Global analysis of the *Ralstonia metallidurans* proteome: prelude for the large-scale study of heavy metals response. *Proteomics* **4**: 151-179.
- Novo M. T. M., da Silva, A. C., Moreto, R., Cabral, P. C. P., Costacurta, A., Garcia Jr., O. y Ottoboni, L. M. M. 2000. *Thiobacillus ferrooxidans* response to copper and other heavy metals: growth, protein synthesis and protein phosphorylation. *A. van Leeuwenhoek.* **77**: 187-195.
- Ogawa, N., DeRisi, J. y Brown, P. O. 2000a. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 4309-4321.
- Ogawa, N., Tzeng, C. M., Fraley, C. D. y Kornberg, A. 2000b. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical and physiologic features. *J. Bacteriol.* **182**: 6687-6693.
- Olsen, G. J. y Woese, C. R. 1997. Archaeal genomics: an overview. *Cell* **89**: 991-994.
- Osorio, C. 1998. Caracterización de la respuesta del arqueón *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 frente a la hambruna de fosfato. Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Osorio, C. y Jerez, C. A. 1996. Adaptive response of the archaeon *Sulfolobus acidocaldarius* BC65 to phosphate starvation. *Microbiology* **142**: 1531-1536.
- Outten, F. W., Outten, C. E. y O'Halloran, T. 2000. Metalloregulatory systems at the interface between bacterial metal homeostasis and resistance. p. 145-157. En Storz, G. and Hengge-Aronis, R. (eds.). *Bacterial Stress Responses*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., y Saier Jr., M. H. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34.

- Persson, B. L., Lagerstedt, J. O., Pratt, J. R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S., y Lundh, F. 2003. Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **43**: 225-244.
- Pettersson A., Kunst, L., Bergman, B. y Roomans, G. M. 1985. Accumulation of aluminium by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: an X-ray energy-dispersive microanalysis study. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2545-2548.
- Peverly, J. H., Adamec, H. y Parthasarathy, M. V. 1978. Association of potassium and some other monovalent cations with occurrence of polyphosphate bodies in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant. Physiol.* **62**: 120-126.
- Rajagopal, N., Aravalli, Q. S. y Garrett, A. 1998. *Archaea* and the new age of microorganisms. *Tree* **13**: 190-194.
- Ram, R. J., VerBerkmoes, N. C., Thelen, M. P., Tyson, G. W., Baker, B. J., Blake, R. C., Shah, M., Hettich, R. L. y Banfield, J. F. 2005. Community proteomics of a natural microbial biofilm. *Science* **308**: 1915-1920.
- 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.
- Rawlings, D. E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 65-91.
- Remonsellez, F. 2004. Polifosfatos inorgánicos en el arqueón *Sulfolobus solfataricus*. Posible rol en la tolerancia a metales pesados. Tesis para optar al Título profesional de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Rodríguez-Montelongo, L., Volentin, S. I., Farías, R. N., Massa, E. M. y Rapisarda, V. A. 2006. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroxiperoxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **451**: 1-7.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. y Sand, W. 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanism of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 239-248.

- Rowlands, T., Baumann, P. y Jackson, S. P. 1994. The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science* **264**: 1326-1329.
- Rudnick, H., Hendrich, S., Pilatus, U. y Blotevogel, K. H. 1990. Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphate and cyclic 2,3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*. *Arch. Microbiol.* **154**: 584-588.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Scherer, P. A. y Bochem, H. P. 1983. Ultrastructural investigation of *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelike inclusion. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1190-1199.
- Sehlin, H. M. y Lindström, E. B. 1992. Oxidation and reduction of arsenic by *Sulfolobus acidocaldarius* strain BC. *FEMS Microbiol. Lett.* **93**: 87-92.
- Sethuraman, A., Rao, N. N. y Kornberg, A. 2001. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8542-8547.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W. y Van der Oost, J. 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7835-7840.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**: 850-858.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Mukenata, M., Rao, N. y Kornberg, A. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11210-11215.
- Shibata, R., Bessho, W., Shinkai, A., Nishimoto, M., Fusatomi, E., Terada, T., Shirouzu, M. y Yokohama, M. 2007. Crystal structure and RNA-binding analysis of the archaeal transcription factor NusA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**: 122-128.

- Shively, J. M., Decaer, G. L. y Greenwalt, J. W. 1970. Comparative ultrastructure of the Thiobacilli. *J. Bacteriol.* **101**: 618-627.
- Silver, S. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 753-789.
- Sitthisak, S., Howieson, K., Amezola, C. y Jayaswal, R. K. 2005. Characterization of a multicopper oxidase gene from *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5650-5653.
- Skórko, R., Osipiuk, J. y Stetter, K. O. 1989. Glycogen-bound polyphosphate kinase from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* **171**: 5162-5164.
- Soares, E. V., Hebbelinck, K. y Soares, H. 2003. Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Can. J. Microbiol.* **49**: 336-343.
- Solioz, M. y Stoyanov, J. V. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hiriae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 183-195.
- Stetter, K. O. 1995. Microbial life in hyperthermal environments. *ASM News* **61**: 285-290.
- Stetter, K. O. 1998. Hyperthermophiles: isolation, classification, and properties. *En K. Horikoshi y W. D. Grant (eds.), Extremophiles. Microbial life in extreme environments.* pp 19-24. Wiley-Liss, New York.
- Stott, M. B., Watling, H. R., Franzmann, P. D. y Sutton, D. C. 2001. The effect of solution chemistry on jarosite deposition during the leaching of chalcopyrite by the thermophilic archaeon, *Sulfolobus metallicus*. En V. S. T. Ciminelli y O. Jr. Garcia (Eds.) *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development.* Elsevier. Parte A, pp: 207-215.
- Sun, A., Beck, F., Knispel, R. W., Siedler, F., Scheffer, B., Nickell, S., Baumeister, W. y Nagy, I. 2007. Proteomics analysis of *Thermoplasma acidophilum* with a focus on protein complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **6**: 492-502.
- Syntichaki, K. M., Loulakakis, K. A. y Roubelakis-Angelakis, K. A. 1996. The amino-acid sequence similarity of plant glutamate deshydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. *Gene* **168**: 87-92.

- Tanaka, S., Lee, S. O., Hamaoka, K., Kato, J., Takiguchi, N., Nakamura, K., Ohtake, H. y Kuroda, A. 2003. Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microtholunatus phosphovorius*. *J. Bacteriol.* **185**: 5654-5656.
- Treitzel, G. M. y Parsek, M. R. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2313-2320.
- Thompson, J. R., Bell, J. K., Bratt, J., Grant, G. A. y Banaszak, L. J. 2005. V_{max} regulation through domain and subunit changes. The active form of phosphoglycerate dehydrogenase. *Biochemistry* **44**: 5763-5773.
- Tsutsumi, K., Munekata, M. y Shiba, T. 2000. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1493**: 73-81.
- Tzeng, C. y Kornberg, A. 2000. The multiple activities of polyphosphate kinase of *Escherichia coli* and their subunit structure determined by radiation target analysis. *J. Biol. Chem.* **275**: 3977-3983.
- Urech, K., Durr, M., Boler, T., y Wiemken, A. 1978. Localization of polyphosphates in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **116**: 275-278.
- Van de Vossenberg, J., Driessen, A. J. M. y Konings, W. N. 1998. The essence of being extremophilic: the role of the unique archaeal membrane lipids. *Extremophiles* **2**: 163-170.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Pereira, H., Konings, W. N. y Zehnder, A. J. B. 1994a. Generation of a proton motive force by the excretion of metal phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. *J. Biol. Chem.* **269**: 29509-29514.
- van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Konings, W. N. y Zehnder, A. J. B. 1994b. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**: 1766-1770.
- van Veen, H. W. 1997. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *A. van Leeuwenhoek.* **72**: 299-315.
- Vido, K., Espector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. B. y Labarre, J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 8469-8474.

- Wächtershäuser, G. 1992. Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **58**: 85-201.
- Williams, E., Lowe, T. M., Savas, J. y DiRuggiero, J. 2007. Microarrays analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* exposed to gamma irradiation. *Extremophiles* **11**: 19-29.
- Witschel, M., Egli, T., Zehnder, A. J., Wehrli, E. y Spycher, M. 1999. Transport of EDTA into cells of the EDTA-degrading bacterial strain DSM 9103. *Microbiology* **145**: 973-983.
- Wood, H. G. y Clark, J. E. 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 235-260.
- Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4576-4579.
- Woese, C. R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 8392-8396.
- Wurst, H. y Kornberg, A. 1994. A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **269**: 10996-11001.
- Wurst, H., Shiba, T. y Kornberg, A. 1995. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 898-906.
- Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M. y Namba, T. 1991. Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature* **352**: 516-519.
- Zhang, H., Ishige, K. y Kornberg, A. 2002. Polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16678-16683.