

UCH-FC
DOC- Microb
R.621
C.1



**ESTUDIO DE LA ENZIMA EXOPOLIFOSFATASA
(PPX) Y OTROS DETERMINANTES DE
RESISTENCIA A Cu^{2+} del *ARQUEÓN***

Metallosphaera sedula

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

Doctor en Ciencias
Mención en Microbiología

Facultad de Ciencias
Por

MATÍAS ALBERTO RIVERO JIMÉNEZ

Enero, 2016

Director de Tesis: Dr. Carlos Jerez Guevara

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

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

Matías Alberto Rivero Jiménez

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias (Mención Microbiología), en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 17 de Noviembre de 2015.

Director de Tesis: Dr. Carlos Jerez G.



Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Claudio Vásquez G (Presidente)

Dr. Francisco Chávez E.

Dr. Ricardo Cabrera P.



A mi amada esposa, por su confianza y coraje.

Y a la familia que hoy somos y hacemos crecer.

“Ser consciente de la propia ignorancia es un gran paso hacia el saber”

Benjamín Disraeli

BIOGRAFÍA



Muchos años después, frente a la comisión de evaluación, el candidato Matías Rivero había de recordar aquella tarde remota en que su padre (Luis) lo llevó a recorrer el bosque de Cartagena en bicicleta con su hermano Nicolás. Así, de manera apacible y demasiado rápida, pasé mi infancia veraneando en Cartagena, con mis hermanos (Nicolás y Alonso) y mi Madre (Raquel Verónica) en la casa de mis abuelos maternos (Raquel y Nibaldo, Q.E.P.D.) y a solo cuadras de la casa de mis abuelos paternos (Sylvia y Juan), entre primos y amigos. Forjando lazos indisolubles que hoy me hacen ser quien soy.

Como es lógico, entre veranos debía pasar una temporada en Santiago yendo al Colegio Santa Cruz, donde hice amigos que perduran hasta hoy y donde además, sin saberlo, conocería a la persona que más temprano que tarde, se transformaría en mi amada esposa (Virginia Carvajal San Martín), con quien hace ya tres años y medio nos mudamos a la ciudad de Los Andes y con quien hoy esperamos nuestro primer hijo(a).

Luego del colegio, había que hacer algo, y como lo de los estudios se me daba de manera casi natural, decidí estudiar Bioquímica en la Universidad de Chile, carrera que terminé con un título profesional y un nuevo gran amigo (Alonso Ferrer). Como el paso del tiempo no daba tregua y algo había que seguir haciendo, la opción fue comenzar los estudios en el programa de Doctorado en Ciencias con Mención en Microbiología de la Universidad de Chile. Sabiendo como eso empezaba, pero no donde terminaría, hoy me encuentro cerrando este proceso de una manera digna y con un nuevo gran amigo (Claudio).

Bueno, esperando que esta humilde biografía se pueda seguir escribiendo durante varios años más y que se vayan sumando cada vez más personas, como mis sobrinas (Amanda y Magdalena), mi ahijado (León Torres), mi sobrino (Pedro Fairlie) y todos los que puedan seguir llegando, como mi futuro hijo(a), a quien este 12 de Junio, cuando celebre mi cumpleaños número 32 estaré a semanas de conocer.

Matías Alberto Rivero Jiménez

Santiago de Chile, Enero 2016.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de corazón a las siguientes personas, que me ayudaron – cada una en su estilo y forma – a la realización de este trabajo:

Virginia Carvajal San Martin: "...When everything I do is wrong, you give me hope and consolation, you give me strength to carry on...that's the wonder, the wonder of you..."

Elvis Presley

A mi futuro hijo(a): "...I really wanna be with you...I really wanna know you...Oh, it takes so long..."

George Harrison

Raquel Verónica Jiménez López: "...Here comes the sun, and I say It's all right... the smiles returning to the faces. Little darling, it seems like years since it's been here, here comes the sun... and I say It's all right..."

The Beatles

Luis Alberto Rivero Giralt: "...When the night has come and the land is dark and the moon is the only light we see, no I won't be afraid no I won't be afraid Just as long as you stand, stand by me..."

Ben E. King

Nibaldo Jiménez Santibáñez (QEPD), Raquel López Galleguillos, Sylvia Giralt Poc y Juan Rivero Araya: "Time is on my side, yes it is... You're searching for good times, but just wait and see...Remember, I'll always be around...Like I told you so many times before..."

The Rolling Stones

Virginia y Pedro San Martin: "La Gloria de Chile queda en la otra esquina...Cantando en coro lo mejor de la vida.... Recuerda que donde hay fe, hay esperanza..."

Joe Vasconcellos

Luis Alonso Rivero Jiménez: "...I never wanted to kill, I am not naturally evil. Such things I do just to make myself more attractive to you. Have I failed?...The last of the famous..."

Morrissey

Amanda Rivero Santana: "Never seen such a beautiful girl, got me shaking inside, calling on me from deep within her eyes...not the kind that is lost or is found, she has always been there..."

George Harrison

Magdalena Rivero Santana: "...One soul, one prize...One golden glance of what should be...One shaft of light that shows the way...The bell that rings inside your mind, it's a challenging the doors of time...Its a kind of magic..."

Queen

Carla Santana: "...Yo no sé lo que es el destino, caminando fui lo que fui. Allá dios, que será divino. Yo me muero como viví...."

Silvio Rodríguez

Nicolás Rivero Jiménez: "...Caminito al costado del mundo por ahí he de andar buscándome un rumbo ser socio de esta sociedad me puede matar..."

La Renga

Don Juan Araos, Alejandro Araneda y Ricardo Reyes: "...Tú que manejas el curso de los ríos, tú que sembraste el vuelo de tu alma..."

Víctor Jara

Compañeros: "...Es fácil vegetar, dejar que otros hablen y decir -ellos saben más que yo- ponerse una insignia marchar detrás de un líder y dejar que nos esgriman con razón..."

Los Prisioneros

Dr. Claudio Navarro: "...Es mi vida un crucigrama no sé cómo resolverlo por eso voy a la barra y allí me pongo a cantar y a beber para olvidar..."

Compay Segundo

De manera algo más formal, quisiera agradecer a los miembros de la comisión, presidida por el Dr. Claudio Vásquez y completada por el Dr. Francisco Chávez y Dr. Ricardo Cabrera, por su ayuda y crítica constructiva hacia mi trabajo.

De manera especial quisiera agradecer al Dr. Ricardo Cabrera y Rodrigo Muñoz, por su ayuda en la expresión y purificación de la enzima exopolifosfatasa de *Metallosphaera sedula*.

Finalmente, pero de manera no menos importante, agradecer al Dr. Carlos Jerez, por permitirme trabajar junto con su equipo, por la paciencia y la libertad de pensamiento y de acción que se vive en su laboratorio, en post del desarrollo científico y personal.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT 1110214 y parcialmente por FONDECYT 1150791 (I.R. Dr. Carlos Jerez Guevara)

La manutención del tesista fue efectuada por el Programa de Formación de Capital Humano avanzado año 2010, a través de la Beca CONICYT 21100092 y su correspondiente extensión.

AGRADECIMIENTOS.....	III
FINANCIAMIENTO.....	V
INDICE GENERAL.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE TABLAS.....	XIII
ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMEN.....	XVI
SUMMARY.....	XX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 El dominio <i>Archaea</i>	1
1.2 Microorganismos en biominería.....	3
1.3 Métodos de biolixiviación.....	3
1.4 Polifosfatos y resistencia a metales.....	6
1.5 <i>Metallosphaera sedula</i>	10
1.6 Investigación en el laboratorio.....	12
2. HIPÓTESIS.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIALES Y METODOS.....	18
4.1 Cepas y condiciones de cultivo.....	18
4.1.1 Cepa de <i>M. sedula</i>	18
4.1.2 Cepas de <i>E. coli</i> y plasmidios.....	18
4.1.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	18

4.1.4 Tipos de cultivo.....	19
4.2 Biología molecular.....	19
4.2.1 Extracción de DNA genómico.....	19
4.2.2 Extracción de DNA plasmidial.....	20
4.2.3 Cuantificación de DNA.....	21
4.2.4 Digestión de DNA.....	21
4.2.5 Preparación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes.....	21
4.2.6 Transformación de <i>E. coli</i> quimiocompetentes.....	22
4.2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
4.2.8 Método de generación de mutantes.....	22
4.2.9 Secuenciación.....	23
4.2.10 Electroforesis de ácidos nucleicos.....	23
4.2.11 Método de clonación y expresión de proteínas.....	23
4.2.12 Cuantificación de proteínas.....	24
4.2.13 Purificación de proteínas.....	24
4.2.14 Electroforesis de proteínas.....	25
4.2.15 Western blot.....	25
4.2.16 Extracción de RNA total.....	25
4.2.17 Retrotranscripción (síntesis de cDNAs).....	26
4.2.18 PCR en tiempo real y análisis de datos.....	27
4.3 Polifosfatos (poliP).....	28
4.3.1 Extracción de poliP.....	28
4.3.2 Cuantificación de poliP.....	29
4.3.3 Visualización de poliP.....	29
4.4 Microscopía.....	30
4.4.1 Preparación de muestras para TEM.....	30
4.4.2 Preparación de muestras para inmuno detección por TEM.....	30

4.4.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microanálisis por análisis de energía de dispersión de rayos X (EDX).....	31
4.5 Análisis de la enzima.....	31
4.5.1 Modelo y alineamientos de la enzima.....	31
4.5.2 Actividad enzimática.....	31
4.6 Proteómica diferencial cuantitativa.....	32
4.6.1 Preparación muestras para iTRAQ.....	32
4.6.2 iTRAQ.....	32
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Análisis y comparación bioinformática de las enzimas PPX de <i>M. sedula</i> , <i>S. solfataricus</i> y <i>E. coli</i>	34
5.2 Cuantificación de poliP	39
5.3 Cuantificación de poliP en <i>M. sedula</i> en presencia de cobre en el medio.....	43
5.4 Caracterización de la enzima PPX de <i>M. sedula</i>	46
5.5 Ubicación subcelular de la enzima PPX de <i>M. sedula</i>	56
5.6 Análisis de la expresión de probables determinantes de resistencia a cobre por qRT-PCR.....	59
5.7 Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas en condiciones de ausencia y presencia de cobre en <i>M. sedula</i>	68
6. DISCUSIÓN.....	74
6.1 Análisis bioinformático.....	74
6.2 Identificación y cuantificación de poliP.....	76
6.3 PoliP en presencia de cobre.....	78

6.4 Actividad de la enzima PPXr de <i>M. sedula</i>	80
6.5 Ubicación sub celular de la PPX de <i>M. sedula</i>	84
6.6 Expresión de probables determinantes de resistencia a cobre en <i>M sedula</i>	85
6.7 Proteómica cuantitativa en ausencia y presencia de cobre en <i>M. sedula</i>	91
6.7.1 Proteínas que aumentan su nivel	92
7. CONCLUSIONES	97
8. MODELO	98
9. BIBLIOGRAFÍA	100
10. ANEXOS	109
10.1 Partidores.....	109
10.2 Alineamiento de genes.....	110
10.3 Hidrólisis ácida del poliP 700.....	111
10.4 Determinación de la temperatura óptima de reacción de la PPXr de <i>M. sedula</i>	112
10.5 Actividad del mutante E112A como control positivo de reacción.....	113
10.6 Análisis de proteómica cuantitativa.....	114

Figura 1. Métodos de biolixiviación.....	5
Figura 2. Representación esquemática de las actividades de las enzimas PPK y PPX.....	7
Figura 3. Granulos de poliP en diferentes arqueas y su MIC 50 de cobre.....	8
Figura 4. Modelo de trabajo de los posibles sistemas existentes en <i>M. sedula</i> , para la resistencia a metales.....	13
Figura 5. Esquema explicativo de la técnica de iTRAQ.....	33
Figura 6. Alineamiento de las secuencias de las enzimas PPX de <i>S. solfataricus</i> , <i>M. sedula</i> y <i>E. coli</i>	34
Figura 7. Estructura tridimensional de la PPX de <i>E. coli</i>	36
Figura 8. Modelo por homología de la PPX de <i>M. sedula</i>	37
Figura 9. Gránulo de poliP de <i>M. sedula</i> obtenido por microscopía electrónica de transmisión.....	39
Figura 10. Análisis elemental de diferentes áreas en una célula de <i>M. sedula</i> mediante EDX.....	41
Figura 11. Concentración de poliP a distintos tiempos de la curva de crecimiento de <i>M. sedula</i>	42
Figura 12. Curvas de crecimiento de <i>M. sedula</i> en ausencia y en presencia de cobre.....	43
Figura 13. Determinación de los niveles de poliP en <i>M. sedula</i> crecida en ausencia y presencia de cobre.....	44
Figura 14. Efecto del Cu en los niveles de poliP en <i>M. sedula</i>	45
Figura 15. Alineamiento de las secuencias de DNA mutantes de PPX de <i>M. sedula</i> insertadas en el vector de expresión utilizado.....	47
Figura 16. Purificación de la PPXr de <i>M. sedula</i> sobreexpresada en <i>E. coli</i>	47
Figura 17. Determinación de la temperatura óptima para la hidrólisis enzimática <i>in vitro</i> de poliP por la PPXr de <i>M. sedula</i>	48

Figura 18. Determinación del efecto de Mn^{2+} y Mg^{2+} en la reacción <i>in vitro</i> de la PPXr de <i>M. sedula</i>	50
Figura 19. Análisis cualitativo de la degradación enzimática del poliP 700 mediada por la PPXr de <i>M. sedula</i>	51
Figura 20. Reacción <i>in vitro</i> de PPXr con diferentes sustratos.....	52
Figura 21. Actividad de los mutantes E111A y E113A.....	53
Figura 22. Curvas de progreso de la reacción enzimática de la PPXr de <i>M. sedula</i>	54
Figura 23. Comportamiento sigmoideo de la enzima PPXr de <i>M. sedula</i>	55
Figura 24. Efecto inhibitorio del Pi sobre la PPXr de <i>M. sedula</i>	55
Figura 25. Reacción del anticuerpo Anti PPXr, con PPXr purificada mediante Western blot.....	56
Figura 26. Localización subcelular de la PPX de <i>M. sedula</i>	58
Figura 27. Expresión cuantitativa de los transcritos de los genes homólogos a <i>Pho84</i> de <i>M. sedula</i>	62
Figura 28. Expresión cuantitativa de los transcritos del gen que codifica la PPX de <i>M. sedula</i>	63
Figura 29. Expresión cuantitativa de los transcritos de los genes que conforman el operón <i>cop</i> de <i>M. sedula</i>	64
Figura 30. Expresión cuantitativa de los transcritos de los genes homólogos a <i>pho84</i> en <i>M. sedula</i> en condiciones de “shock” de cobre.....	65
Figura 31. Expresión cuantitativa del transcrito del gen que codifica la PPX en <i>M. sedula</i> en condiciones de “shock”.....	66

Figura 32. Expresión cuantitativa del transcrito de los genes pertenecientes al operón Cop de <i>M. sedula</i> en condiciones de “shock” de cobre.....	67
Figura 33. Categorías funcionales de las proteínas que varían significativamente en células de <i>M. sedula</i> adaptadas a Cu 16 mM.....	69
Figura 34. Esquema explicativo del mecanismo de reacción más probable en la catálisis efectuado por la PPXr de <i>M. sedula</i>	82
Figura 35. Modelo propuesto para el sistema de resistencia a cobre de <i>M. sedula</i>	99
Figura 36. Alineamiento completo del gen Msed_0981 (PPX Msed) y los clones utilizados insertos en el vector de expresión pET-TEV28a.....	110
Figura 37. Hidrólisis ácida del sustrato utilizado en la reacción enzimática de la PPX.....	111
Figura 38. Actividad de PPXr en un rango amplio de temperatura.....	112
Figura 39. Actividad enzimática de PPXr mutada en E112A.....	113
Figura 40. Vía metabólica de la síntesis de leucina.....	123

Tabla 1. Comparación MIC de Cu y eficiencia en la oxidación de diferentes microorganismos.....	11
Tabla 2. Genes de <i>M. sedula</i> analizados por qRT-PCR.....	59
Tabla 3. Proteínas de <i>M. sedula</i> que varían significativamente sus niveles en presencia de cobre.....	68
Tabla 4. Proteínas que aumentan su nivel en células adaptadas a cobre.....	70
Tabla 5. Proteínas que disminuyen su nivel en células adaptadas a cobre.....	71
Tabla 6. Análisis de enriquecimiento para las proteínas que aumentan su nivel de manera significativa en un cultivo de <i>M. sedula</i> adaptado a cobre.....	72
Tabla 7. Análisis de enriquecimiento para las proteínas que disminuyen su nivel de manera significativa en un cultivo de <i>M. sedula</i> adaptado a cobre.....	73
Tabla 8. Partidores utilizados.....	109

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ATCC	Colección celular estadounidense (del inglés: "American Type Culture Collection")
cDNAs	DNAs complementarios
Da	Dalton, unidad de peso atómico
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotidos
DSMZ	Colección celular alemana (del alemán: "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen")
EDX	Del inglés: Energy-dispersive X-ray spectroscopy
Fw	Partidor sentido
GITC	Isotiocianato de guanidina
iTRAQ	Técnica de cuantificación de proteínas (del inglés: "Isobaric tags for relative and absolute quantitation")
MESG	2-amino 6-mercapto metilpurina 7-ribosa
MFS	Dominio proteico (del inglés: major facilitator superfamily)
MIC	Concentración inhibitoria mínima

PBS	Tampón fosfato salino (del inglés: phosphate buffered saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNP	Fosforilasa de purina
poliP	Polifosfato
PPK	Polifosfatoquinasa
PPX	Exopolifosfatasa
PPXr	Exopolifosfatasa recombinante
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RNR	Ribonucleotido difosfato reductasa
RT o TR	Retrotranscriptasa
Rv	Partidor antisentido
SLIM	Técnica de mutagénesis (del inglés: site directed, ligase-independent mutagenesis)
TBE	Tampón tris borato
TEM	Microscopia electrónica de transmisión (del inglés: transmission electron microscopy)

RESUMEN

El cobre es un elemento esencial para el desarrollo celular. Sin embargo, a concentraciones elevadas se vuelve tóxico. Por esta razón, los microorganismos han desarrollado mecanismos moleculares que les permiten disminuir el impacto provocado por la presencia de concentraciones elevadas de este metal en su entorno. Entre los posibles mecanismos de resistencia se ha planteado la idea que la presencia de los polifosfatos inorgánicos intracelulares (poliP) constituyen uno de los determinantes de resistencia a metales en bacterias y arqueones.

Se ha descrito un modelo en *Escherichia coli* para la resistencia a cadmio, en el que se vinculan los poliP a la resistencia a metales, involucrando su hidrólisis mediada por la enzima exopolifosfatasa (PPX) y la posterior eliminación del metal, unido al fosfato liberado desde el poliP. Pese al modelo existente, el entendimiento de los mecanismos y los factores genéticos que determinan la resistencia a los metales en el medio de crecimiento en los miembros del dominio *Archaea* es insipiente. Por ello, la determinación de estos determinantes de resistencia es de mucho interés. En la presente Tesis se estudió el vínculo entre la presencia de poliP y la resistencia a cobre en el arqueón termoacidófilo *Metallosphaera sedula*, que es miembro del denominado “consorcio biominero” (nombre que se les da a los microorganismos presentes en ambientes biomineros). Este arqueón puede crecer en medios de bajo pH y a temperaturas que oscilan en un rango de 60 y 75 °C. Entre las características que posee este arqueón y que lo hace un sujeto interesante de estudio, está su potencial en el uso de sistemas de biolixiviación mediante reactores, ya que posee una alta eficiencia en la oxidación de minerales como pirita. Debido a su eventual importancia en el uso biotecnológico, es necesario comprender los mecanismos que este arqueón posee para

resistir cobre para que en el futuro, cuando se posea una forma eficiente de manipulación genética para estos microorganismos, sean sujetos de mejoras genéticas que apunten a optimizar los sistemas de resistencia hoy estudiados.

Con la idea de determinar cómo *M. sedula* es capaz de resistir a la presencia de cobre en el medio, se llevó a cabo el trabajo de tesis bajo la Hipótesis de que “*El gen Msed_0981 de M. sedula codifica para la enzima PPX. Esta enzima junto a ortólogos de pho84 y del sistema cop son parte de los mecanismos de resistencia a cobre en esta célula*”.

Para comprobar la Hipótesis uno de los elementos de resistencia a cobre estudiados fue la presencia y dinámica de los gránulos de poliP observados en *M. sedula*. Se logró determinar su composición química y los niveles de poliP intracelulares de este arqueón tanto en condiciones control como en diversas condiciones de exposición a cobre, ya fuese en células adaptadas al metal o en células no adaptadas a cobre y en células expuestas a un “shock” de cobre. Se observó que la presencia de cobre provoca una disminución en la cantidad intracelular de poliP, de manera similar a lo descrito en otros microorganismos.

Según lo observado la degradación de los poliP en *M. sedula* no es exhaustiva, lo que sugiere la posible presencia de algún sistema regulador de la degradación de los poliP. Como se mencionó, la degradación de los poliP es efectuada por la enzima exopolifosfatasa (PPX), en *M. sedula* esta enzima aún no se ha caracterizado. Pero mediante un análisis bioinformático se determinó que el producto del gen Msed_0981 codifica esta proteína.

Se determinó la ubicación subcelular de la enzima en células de *M. sedula* usando inmunomicroscopía electrónica empleando anticuerpos contra la PPX de *M. sedula*. Se observó que la PPX se distribuye en agrupaciones en células de *M. sedula* expuestas o no a cobre; además, en las células expuestas se ve un aumento en el número de anticuerpos que reconocen la enzima.

Se observó que la enzima PPX de *M. sedula*, a la que se midieron *in vitro* sus parámetros de funcionamiento, tales como temperatura óptima, concentración y necesidad de cationes divalentes, sustrato óptimo de reacción, cinética de reacción y el efecto del sustrato. Tiene una temperatura óptima de 65 ° C, una necesidad de Mg para el mejor funcionamiento, un poliP de 700 residuos de fosfato inorgánico (Pi) como sustrato óptimo, una cinética de carácter sigmoideo y una disminución en la actividad de la enzima en presencia de Pi. También se diseñó y generó mutantes para comparar el efecto de las mutaciones sitio dirigidas sobre la enzima, mostrando una nula actividad enzimática al mutar el amino ácido E113A.

Los niveles de transcritos de genes involucrados en la respuesta a cobre que están presentes en el genoma de este arqueón se determinaron por qRT-PCR. Entre los genes estudiados se encuentran homólogos del transportador de Pi Pho84, el gen que codifica a la enzima PPX y los componentes del sistema Cop. Lo primero que se realizó fue una medición en diferentes puntos de la curva de crecimiento de *M. sedula* de los diferentes genes en diferentes condiciones: presencia, ausencia, adaptación, no adaptación y “shock” de cobre, con lo que se logró tener un panorama del dinamismo de los diferentes genes estudiados. Se observó diferencias en la expresión de los genes en las distintas etapas del crecimiento celular, pareciendo ser muy importante tener siempre presente algún transportador de Pi cuando la célula es expuesta a cobre.

Adicionalmente frente a un “shock” de cobre se activa la expresión de los genes relacionados con la resistencia a este metal.

Finalmente, para tener una visión más global de lo que le sucede en la célula en presencia de cobre, se efectuó un análisis cuantitativo de expresión de proteínas, el que se llevó a cabo por la técnica de iTRAQ. Los datos de este experimento, sometidos a un análisis de enriquecimiento, mostraron que existe una respuesta general de la célula ante la presencia de cobre. Se observaron cambios en muchos procesos celulares y en forma notoria la sobreexpresión de proteínas involucradas en la respuesta a estrés oxidativo, el que estaría vinculado directamente a la presencia del metal.

En resumen, se determinó el efecto que causa el cobre en el arqueón *M. sedula* al exponerlo a cobre. La respuesta a cobre involucra desde la degradación de los poliP de forma parcial por la PPX hasta el montaje de sistemas específicos de respuesta a metal como el sistema Cop y la respuesta global de la célula a la respuesta a cobre mediante una respuesta a estrés oxidativo.

SUMMARY

Copper is an essential metal for cell development. However, at high concentrations they become toxic. Therefore, microorganisms have developed molecular mechanisms that allow them to reduce the impact caused by the presence of high concentrations of these metal in the environment. One of the possible mechanism for metal resistance that have been proposed, is the idea that the presence of intracellular inorganic polyphosphate (polyP) a determinant for metal resistance in bacteria and arqueones.

The model described in *Escherichia coli* for cadmium resistance, is linked to the polyP metal resistance mechanism, involving the enzymatic hydrolysis of polyP mediated by exopolyphosphatase (PPX) and subsequent removal of metal, attached to the phosphate released from the polyP. Despite the existing model, understanding of the mechanisms and genetic determinants for metal resistance in archaea is poorly understood. Therefore, the determination of these resistance determinants is a matter of great interest. In this thesis we have studied the link between the presence of polyP with copper resistance in the thermoacidophile archaeon *Metallosphaera sedula*, a member of the so called "biominer consortium" (the name given to the microorganisms presents in biominers environments). This archaeon is able to grow in low pH media and temperatures varying in the range of 60 to 75 ° C. Among the features that have this archaeon and make it an interesting subject of study, is the potential to be used in bioleaching reactors, since it has a high efficiency in the oxidation of minerals such as pyrite. Due to its eventual importance in the biotechnologyc use, it is necessary to understand the mechanisms that this archaeon has to withstand copper, so if in the future we possess an efficient form to handling genetics of these microorganisms, they

will be subjects to genetic improvements aimed to optimize resistance systems studied today.

To determine how *M. sedula* is able to resist the presence of copper in the medium, the hypothesis is that "The *Msed_0981* gene actually encode the PPX enzyme. This enzyme with orthologs of *cop* system and *pho84* are part of the mechanisms of resistance to copper in this cell. "

To test the hypothesis, one of the copper resistance mechanism studied was the presence and dynamic of the PolyP granules observed in *M. sedula*. It was possible to determine the chemical composition and levels of polyP in this archaeon under control conditions and in various conditions of exposure to copper, adapted to metal or not adapted to copper cells and in cells exposed to a "shock " of copper. It was observed that the presence of copper causes a decrease in the intracellular amount of polyP, similar to that described in other micro-organisms.

As noted the degradación of polyP in *M. sedula* is not exhaustive, suggesting the possible presence of a regulatory system degradation of polyP. As mentioned, the degradation of polyP is made by the exopolyphosphatase enzyme (PPX). In *M. sedula* this enzyme has not been characterized yet, but by a bioinformatic analysis we determine that the product of *Msed_0981* gene encoding this protein.

Within the observed results we see a similar behavior seen in other microorganisms of various genres, where the presence of copper induces a decrease in the intracellular amount of polyP. In addition we determined that the degradation of poliP mediated by exopilifosfatasa (PPX) is not exhaustive, so arises the idea of a regulatory system for polyP degradation. Within the scope of studying the relationship of PPX and poliP

granules, using immuno electron microscopy the subcellular localization of the enzyme in *M. sedula* was determined. Also the *M. sedula*'s PPX was studied, it has been measured its operating parameters *in vitro*, such as optimum temperature, concentration and necessity of divalent cations, optimal substrate for reaction, reaction kinetics, product effect in the reaction. Finding an optimum temperature of 65 ° C, need of Mg for better functioning, polyP 700 as optimal substrate, a sigmoidal kinetic curve and a decrease in activity in presence of Pi. We also generated mutants to compare the effect of site-directed mutations, showing no enzyme activity by mutating the E113A.

On a molecular level analysis, by qRT-PCR technique we measured the transcript levels of genes presents in the genome of *M. sedula* and that are involved in the response to copper. The studied genes include phosphate (Pi) transporter ortologus of Pho84, the gene encoding the PPX enzyme and components of Cop system. To have an outlook of the dynamic of the different genes studied, the first thing done was a measurement at different points of the growth curve of *M. sedula* of the different genes in conditions of presence, absence, adaptation, not adapted and shock of copper. A different expression in transcripts levels are observed in the growth stages of cell. And it is seems to be very important to keep allways some Pi transporter active when the cell is exposed to copper. Furthermore we see that the answer to a shock of copper activates the expression of genes involved in this response.

Finally it was made a quantitative analysis of protein expression, to find new determinants to copper resistance or have a more comprehensive view of what happens to the cell in the presence of copper. This analysis was made by the iTRAQ technique. The enrichment analysis made it to the data from this experiment, showed that in the

presence of copper there is a general response of the cell involving many cellular processes, but assembly of oxidative stress response, which would be linked directly to the presence of metal seems to be the most huge global response of the cell.

As it can be seen in the development of this study we have determined the effect of copper in the archaeon and the response of *M. sedula* by exposing the cell to copper in different ways, either adapted to the presence of copper, cells not adapted and in a shock of copper. Copper response is far from unique, involves the partial degradation of polyP by PPX to an installation of a specific response systems such as Cop and an overall system response like the response to oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El Dominio *Archaea*

Las arqueas fueron descritas por primera vez en 1977 por Carl Woese (Woese y col. 1977). En aquel trabajo, mediante el análisis filogenético basado en la secuencia de RNA ribosomal se llegó a la caracterización de tres líneas de descendencia celular: I) Las eubacterias, formada por todas las bacterias típicas, II) Las archaeobacterias, conformada por bacterias metanogénicas y III) Los eucariontes, representados por las células con compartimentos intracelulares definidos. Con el tiempo, la implementación de la biología molecular en la taxonomización de los microorganismos, permitió, mediante la comparación de secuencias de los genes de rRNAs 16S y 18S, dividir a los organismos vivos en tres dominios: *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea* (Woese y col. 1990). Si bien este tipo de taxonomización es aceptada por la mayoría de la comunidad científica, es un hecho que es una cuestión en constante cambio y cada cierto tiempo surgen voces disidentes en cuanto a lo propuesto.

Ya en los años noventa el profesor emérito de la Universidad de Harvard Ernst Mayr, (Mayr. 1990; Mayr. 1998) propuso retornar a la clasificación procarionte (*Archaea* y *Bacteria*) vs. eucarionte (*Eukarya*) basándose en las semejanzas fenotípicas de *Archaea* y *Bacteria* y en el mayor porcentaje en el número de proteínas similares (aproximadamente 42%) entre *Archaea* y *Bacteria* comparado con *Archaea* y *Eukarya* (13%). Hoy en día se ha vuelto a pensar que quizás el modelo del árbol de la vida con tres dominios es incorrecto, ya que mediante el uso de nuevas técnicas de secuenciación se ha logrado descubrir genes eucariontes en las arqueas, dándole sustento a la hipótesis de que un arqueón participó en la endosimbiosis mitocondrial. Esta hipótesis daría cuenta de la existencia de solamente dos dominios *Archaea* y *Bacteria* ya que el

dominio Eukarya sería producto de la colaboración de los dos anteriores (Williams y col. 2013).

Dentro del dominio *Archaea* existen múltiples organismos capaces de vivir en condiciones extremas tanto de temperatura como de pH (Stetter. 1995. Auernik y col. 2008). El dominio *Archaea* se divide a su vez en tres reinos: *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Korarchaeota*. Dentro del reino *Crenarchaeota* está el género de los sulfolobales. Los representantes de este género corresponden a organismos termoacidófilos (pueden crecer a pH inferiores a 4 y temperaturas mayores a 60 °C) (Ciaramella y col. 2002).

El modelo de este estudio será el arqueón *Metallosphaera sedula*, miembro del género de los *Sulfolobus* (Hubert y col. 1989) y es parte de los microorganismos que se encuentran de manera natural en ambientes biomineros (Orell y col. 2010).

El género de los sulfolobales pertenece al reino *Crenarchaeota*. Este género comprende especies termoacidófilas aisladas de hábitats geotermales como las fuentes solfatáricas. Estos hábitats 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). La facultad de estos microorganismos de resistir condiciones de pH bajos y temperaturas altas los hacen candidatos únicos para su utilización en procesos biotecnológicos como la biominería.

1.2 Microorganismos en biominería

La lixiviación corresponde al proceso de solubilización de los solutos presentes en un sólido mediante el uso de disolventes principalmente ácidos.

El uso de microorganismos ha permitido la extracción de minerales a partir de fuentes refractarias a los tratamientos convencionales de lixiviación. La biolixiviación es el uso de procesos biológicos en diferentes aplicaciones en la industria minera (Shekhar Thakur 2006; Brierley 2008.). Esta definición un tanto amplia, se puede especificar como el uso de procesos biológicos en la oxidación de minerales sulfurados (como por ejemplo calcopirita), lo que permite la solubilización y posterior recuperación de los metales contenidos en ellos. La biolixiviación implica el uso de microorganismos, los que aportan mediante su metabolismo los procesos biológicos necesarios para la oxidación de los minerales sulfurados.

Si bien el proceso de biolixiviación posee grandes ventajas, sobre todo en el ámbito ambiental y en la simpleza de su utilización, posee la desventaja del tiempo que tarda en llevarse a cabo el proceso, que es mayor a los procesos químicos de lixiviación.

1.3 Métodos de biolixiviación

El proceso de biolixiviación se puede realizar de dos maneras: en pilas y en reactores.

En la biolixiviación en pilas el mineral triturado se apila y se irriga con una solución de ácido sulfúrico y microorganismos que llevaran a cabo el proceso. El líquido inoculado drena a través de la pila y los microorganismos van efectuando la solubilización del metal. El drenado se recupera y se vuelve a irrigar en la pila para efectuar la solubilización exhaustiva del metal. Una vez que se considera que el irrigado es suficientemente rico en el metal se recupera el drenado y se efectúa la extracción del metal. La desventaja

principal de este tipo de biolixiviación es el tiempo que tarda, ya que el proceso completo de biolixiviación de una pila puede tardar hasta 6 meses. Otra de las desventajas de este método es que las condiciones en las que se encuentran los microorganismos en la pila no se pueden controlar y fluctúan mucho entre el día y la noche lo que disminuye la eficiencia de la biolixiviación (Shekhar Thakur 2006).

En la biolixiviación en reactores, el mineral se agrega molido en un reactor al que se agrega posteriormente los microorganismos. Este proceso de biolixiviación se hace normalmente de manera secuencial. Es decir, se utiliza una serie de reactores a los que se agrega como sustrato para la biolixiviación el producto del reactor anterior. De esta manera se asegura un proceso continuo, en el que el último reactor es el que posee mayor cantidad de mineral soluble y es tratado de manera inmediata. Esto permite que este método de biolixiviación sea más rápido, y además permite controlar las condiciones ambientales en las que se encuentran los microorganismos. Aunque requiere de la implementación de los tanques y la molienda del mineral (Shekhar Thakur 2006; Norris y col. 2000).

En la figura 1 se muestra una imagen de los dos métodos de biolixiviación.

1.4 Polifosfatos y resistencia a metales

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son cadenas de cientos de residuos de fosfato (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido. Este polímero se encuentra presente en todos los tipos celulares conocidos (Kornberg y col. 1999).

La primera descripción de la presencia de polifosfatos se hizo a principios del siglo XX, al describir lo que en ese momento se nombró como “volutina” (Meyer 1904). La volutina correspondía a gránulos metacromáticos presentes en microorganismos que se teñía de color rosa en presencia de colorantes básicos. Con el desarrollo de la microscopía electrónica estos gránulos se observaron al microscopio electrónico como gránulos densos al paso de los electrones que desaparecían bajo el haz de éstos, lo que los diferenció de la cromatina (Wiame 1947). Una vez estandarizado el sistema para visualizar los gránulos de poliP, éstos se encontraron en todos los seres vivos en que se han buscado: bacterias, hongos, protistas, plantas, animales y arqueas (Wood y col. 1988; Scherer y Bochem 1983).

El carácter ubicuo de los poliP sugiere una multiplicidad de funciones dependiendo del organismo o de la localización subcelular. Entre las funciones propuestas se encuentran la de sustituto de ATP en reacciones de fosforilación, reserva de fosfato, quelante de metales y tampón para álcalis (Kornberg, 1995). Además, y como se tratará más adelante los poliP al parecer cumplen un rol importante en la respuesta a metales.

En bacterias, los poliP son principalmente citoplasmáticos y se encuentran como gránulos o en forma soluble (Rao y col. 1998). También existen pequeñas cantidades de poliP en la membrana plasmática, en complejo con poli- β -hidroxibutirato (PHB) y calcio (Reusch y Sadoff 1988). En eucariontes, los poliP se encuentran en distintos compartimentos celulares como vacuolas, pared celular y núcleo (Kulaev y col. 1999)

En procariontes, el modelo mejor estudiado de la función de los poliP es *Escherichia coli*, en la que se han caracterizado dos enzimas importantes en su metabolismo (Kornberg y col. 1999). Estas corresponden a la enzima encargada de su síntesis a partir de ATP, la polifosfato quinasa (PPK) (Kornberg y col. 1956), y la enzima exopolifosfatasa (PPX), responsable de la hidrólisis de los poliP y la liberación de Pi (Akiyama y col. 1993) (Figura 2).

La enzimología de los poliP en el dominio arquea es poco conocida. La actividad enzimática que sintetiza los gránulos de poliP en arqueones del filo Crenarquea no ha sido descrita (Orell y col. 2012). Pero sí se ha detectado la presencia de gránulos de poliP en miembros de este grupo (Remonsellez y col. 2006; Orell y col. 2010).

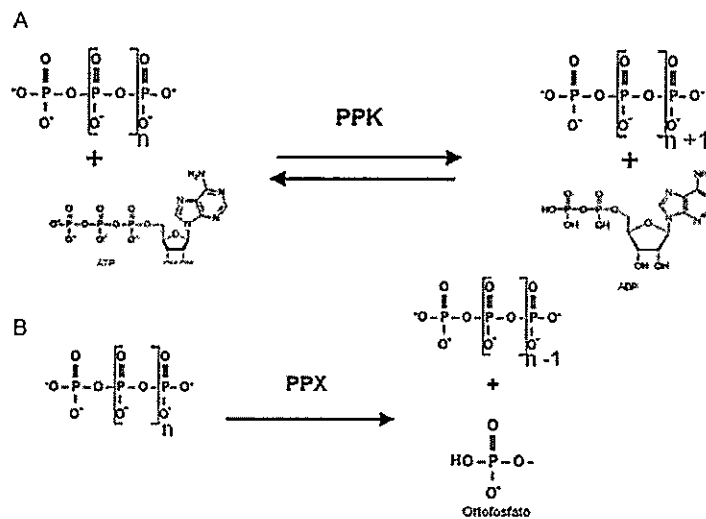


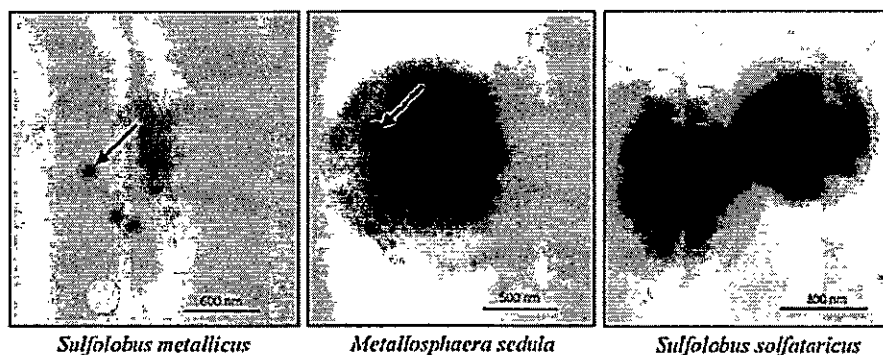
Figura 2. Representación esquemática de las actividades de las enzimas PPK y PPX. A) Esquema de la reacción enzimática catalizada por la polifosfato quinasa (PPK). B) Reacción enzimática de la exopolifosfatasa (PPX).

Entre las funciones de los poliP, se propuso que los microorganismos son capaces de utilizarlos para detoxificar la célula de metales pesados. En *E. coli* se ha propuesto un modelo que explica la relación, planteando que: I) la concentración intracelular de

cationes regula la actividad de la polifosfatasa, II) el fosfato liberado desde los poliP es transportado al exterior de la célula y III) el transporte de los fosfatos al exterior celular es acompañado por los cationes, los que en muchos casos son metales tóxicos para las células de *E. coli* (Keasling 1997).

En los microorganismos extremófilos esta hipótesis se sustenta principalmente en evidencia experimental que muestra la desaparición de los gránulos de poliP intracelulares cuando se expone *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Álvarez y Jerez 2004) o *Sulfolobus metallicus* (Remonsellez y col. 2006) a la presencia de cobre en el medio (Orell y col. 2012).

Mediante microscopía electrónica, en arqueas se ha visto la presencia de gránulos densos al paso de los electrones (atribuibles a gránulos de poliP), los cuales parecieran tener una correlación entre su cantidad y la resistencia a cobre (Figura 3), por lo que estudiar el efecto de estos en *M. sedula* es significativo.



PoliP nmol Pi/mg prot.	180	Indeterminado	20
MIC 50 Cu. (mM)	200	16	5

Figura 3. Granulos de poliP en diferentes arqueas y su MIC 50 de cobre. Adaptado de Orell y col. 2010.

Con respecto a la enzima PPX, ésta se ha identificado en *S. solfataricus* (Cardona y col. 2002) y en *M. sedula* se ha descrito un posible gen que codifica para la enzima PPX. El gen Msed_0981 (Auernik y col. 2008) comparte una identidad de 37% con el gen de la PPX de *S. solfataricus*. Tomando en cuenta los antecedentes descritos para la actividad PPX en *S. solfataricus* (Cardona y col. 2002), es posible que la PPX esté involucrada en la respuesta al cobre u otros metales. Así, el producto del gen Msed_0981 puede estar involucrado en la degradación de los poliP en *M. sedula*. Entre los determinantes de resistencia a metales descritos para arqueones del género *Sulfolobus* se mencionan diversos elementos genéticos encontrados básicamente por comparación de secuencias con determinantes descritos en otros organismos. Así por ejemplo se menciona para el caso de *M. sedula* la presencia de genes con alta homología de secuencia para proteínas que en otros sistemas ayudan a la resistencia a metales. Como ejemplo, se puede mencionar la posible ATPasa encontrada en el genoma de *M. sedula* que posee homología significativa con la ATPasa CopA de *S. solfataricus* (Auernik y col. 2008), la que está involucrada en el eflujo de cobre desde el interior de la célula (Ettema y col. 2006; Völlmecke y col. 2012). En el sistema de eflujo de cobre descrito para *S. solfataricus* participa además una metalochaperona denominada CopM y el regulador transcripcional CopT, para los que también se han encontrado secuencias con homologías significativas en el genoma de *M. sedula* (Auernik y col. 2008). Dentro del genoma de *M. sedula* se encontraron secuencias de DNA con una homología de 25 a 30% con los transportadores de metal-fosfato Pho84 de *S. cerevisiae* y *A. ferroxidans*. Se ha propuesto que estos transportadores podrían estar involucrados en la expulsión de metales asociados a fosfato en *A. ferroxidans* (Álvarez y col. 2004) y posiblemente en *M. sedula* (Auernik y col. 2008). Es muy probable que la expresión del transportador putativo de metal fosfato se induzca cuando *M. sedula* se encuentra en presencia de metales. Esta expresión

aumentada ayudaría a la célula a resistir las concentraciones elevadas de cobre en el medio.

1.5 *Metallosphaera sedula*

M. sedula es un arqueón del filo crenarqueota. Su forma es esférica lobular y posee un diámetro aproximado de 0,8 a 1,2 μm . Es un microorganismo termoacidófilo cuyo crecimiento óptimo es a pH 2,0 y a una temperatura de 75 °C. Su metabolismo es aeróbico, quimiolitotrófico facultativo (Hubert. 1989). Debido a que este microorganismo se encuentra presente de manera natural en relaves biomneros (Orell y col. 2010), será importante realizar estudios para lograr determinar cuál o cuáles son los eventuales factores que le otorgan la capacidad de resistir las condiciones de concentración de metales pesados (Orell y col. 2010). Se ha determinado que la concentración inhibitoria mínima del 50% del crecimiento (MIC 50) es de 16 mM cobre (Hubert 1989).

Comparativamente con otros microorganismos para los cuales se han descrito concentraciones inhibitorias mínimas de hasta 200 mM de Cu en el medio (ver Tabla 1), *M. sedula* no posee una MIC 50 de cobre demasiado elevada. Pero su importancia radica en la alta eficiencia en la oxidación de pirita (Clarck y col. 1993), lo que hace de este microorganismo un muy buen candidato para ser utilizado en biolixiviación de mineral.

Tabla 1. Comparación MIC de Cu y eficiencia en la oxidación de diferentes microorganismos.

Microorganismo	MIC de Cu (mM)	Tª de crecimiento	Capacidad oxidativa	
			Fe ²⁺	S ⁰
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ^{2*}	800	30-35	+	+
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> ³ isolate N39-30-03	≥786	45-50	+	+
<i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i> isolate N19-45-01 ⁴	786	45-50	+	+
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> ^{5**}	393	28-30	+	-
<i>Ferroplasma acidimanus</i> ^{6***}	312	42	+	-
<i>Sulfobacillus thermosulfidoxidans</i> DSM 9293 ^{7D}	300	45-50	+	+
<i>Sulfobacillus metallicus</i> ⁸	200	65	+	+
<i>Sulfobacillus montserratensis</i> ⁹	100	37	+	+
<i>Acidithiobacillus caldus</i> DSM5584 ^{10**}	24	45	-	+
<i>Thiobacillus prosperus</i> ¹¹	16	33-37	+	+
<i>Metallosphera sedula</i> ¹²	16	75	+	+
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i> DSM 10331 ^{13D}	9.4	45-50	+	+
<i>Thiomonas cuprina</i> ¹⁴	7.9	30-36	-	+
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> ^{15**}	ND	28-30	-	+
<i>Leptospirillum ferritulum</i> ^{16**}	ND	30-37	+	-
<i>Acidianus infernus</i> ¹⁷	ND	-90	+	+

Adaptada de Orell y col. 2010.

Es importante determinar cuáles son los mecanismos que posee *M. sedula* para resistir la presencia de cobre en el medio. Y así eventualmente mejorar su capacidad de resistencia, mediante la futura modificación de estos sistemas, para lograr tener un microorganismo altamente eficiente en la oxidación de pirita y que logre resistir concentraciones más elevadas de metal.

Aunque los determinantes de resistencia a metales pesados en *M. sedula* aun no se han caracterizado, en nuestro laboratorio se ha identificado la presencia de gránulos de poliP en el interior de las células, lo que podría dar indicios de por qué estas células son capaces de adaptarse a ambientes con concentraciones de metales elevadas.

En el genoma de *M. sedula* se ha identificado la presencia de genes que poseen homología con: ATPasa de eflujo de metales pesados (Msed_0490), chaperona de metales (Msed_0491) y un regulador transcripcional (Msed_0492). Estos tres genes serían parte de un sistema de eflujo de metales en *M. sedula*, similar al sistema *cop* descrito para *S. solfataricus* (Thijs y col. 2006).

1.6 Investigación en el laboratorio

Una de las líneas de investigación del laboratorio está centrada en los mecanismos de adaptación de los microorganismos biomineros a su entorno extremo. Uno de los posibles determinantes en la resistencia a metales pesados en el medio de crecimiento es la acumulación de gránulos de poliP intracelulares. Anteriormente, en el laboratorio se ha determinado la importancia de la presencia de los gránulos de poliP para la resistencia a metales en otro miembro del consorcio biominero, el arqueón *S. metallicus* (Remonsellez y col. 2006). Si bien *S. metallicus* posee una concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) de 200 mM cobre (Orell y col. 2012), su secuencia genómica no está disponible, por lo que el estudio y caracterización de las enzimas involucradas en el metabolismo de poliP resulta impracticable.

Resultados observados con anterioridad en el laboratorio muestran que *A. ferroxidans*, *S. metallicus* y *M. sedula* poseen gránulos de poliP en su citoplasma (Orell y col. 2010). Si se correlaciona la presencia de poliP y su degradación al ser expuesta la célula a metal, se puede pensar en estos polímeros como un mecanismo asociado a la resistencia a metal. Los determinantes de resistencia a metales de *M. sedula* sólo han sido propuestos por su homología de secuencia con otros determinantes ya conocidos en otros organismos (Auernik y col. 2008). Por ello, es de importancia determinar cuáles son los determinantes de resistencia a cobre y en qué condiciones se expresan en *M. sedula*. El modelo de trabajo que se ha planteado para *M. sedula* en el laboratorio se muestra en la figura 4. La hidrólisis de los poliP mediada por la PPX permitiría la unión del Pi al metal y su posterior eliminación, a través de un sistema de exportación de complejos metal-fosfato tipo Pho84. Además se muestra el posible sistema CopA presente en la célula. El sistema constaría además de una chaperona de metales (tipo CopM), la cual transportaría el metal hasta la

ATPasa (tipo CopA), para eliminar el metal del medio intracelular con la correspondiente hidrólisis de ATP.

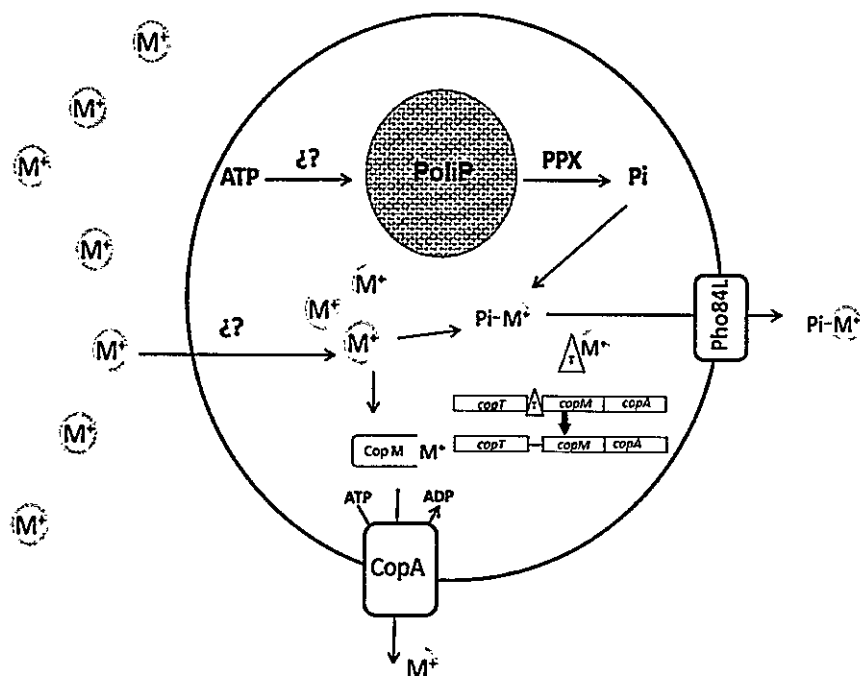


Figura 4. Modelo de trabajo de los posibles sistemas existentes en *M. sedula* para la resistencia a metales. El modelo propuesto en el laboratorio se basa principalmente en la hidrólisis de poliP mediada por la enzima PPX, lo que facilitaría la salida del metal asociado a Pi, basado en los trabajos de Keasling. (1997), Cardona y col. (2002), Álvarez y Jerez. (2004), Remonzellez y col. (2006) y Orell y col. (2012).

El trabajo de Tesis que se propone a continuación se enmarca dentro del estudio de los determinantes de resistencia a metales en arqueones, específicamente en *M. sedula*, perteneciente al género de los *Sulfolobus* y además miembro del consorcio de organismos biomineros. Se centra en la caracterización de la enzima PPX de *M. sedula* y en la cuantificación de la expresión de los genes que están implicados en la resistencia a cobre en este arqueón.

2. HIPÓTESIS

El gen Msed_0981 de *M. sedula* codifica para la enzima PPX. Esta enzima junto a ortólogos de *pho84* y del sistema *cop* son parte de los mecanismos de resistencia a cobre en esta célula.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Caracterización bioquímica de la proteína PPX del arqueón *M. sedula* e identificación por proteómica cuantitativa de posibles nuevos determinantes de resistencia a cobre en este microorganismo.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Análisis y comparación bioinformática de las enzimas PPX de *M. sedula*, *S. solfataricus* y *E. coli*

Para determinar las regiones conservadas y la posible estructura de la PPX putativa de *M. sedula*, se comparó la enzima PPX de *M. sedula* y las PPX de *E. coli* y *S. solfataricus*, ya caracterizadas en la literatura (Akiyama y col. 1993; Cardona y col. 2002; Rangarajan y col. 2006) de manera de determinar las similitudes o diferencias a nivel de secuencia aminoacídica y estructural entre ellas.

3.2.2 Cuantificación de poliP en *M. sedula* con y sin cobre en el medio

Se determinará la composición química y la concentración intracelular de los poliP de *M. sedula*, los que han sido descritos anteriormente por microscopía electrónica (Orell y col. 2010), pero nunca se han determinado cuantitativamente.

Además se determinará los niveles de poliP en *M. sedula* sometidas a la presencia de cobre a distintos tiempos.

3.2.3 Caracterización y determinación de la ubicación subcelular de la PPX de *M. sedula*

Para comprender el funcionamiento bioquímico de la enzima PPX se realizará ensayos con la enzima para determinar su actividad óptima *in vitro*. Además se cuantificará los niveles de mRNA expresados del gen *ppx* por PCR en tiempo real, en condiciones de ausencia y presencia de cobre en el medio.

Para determinar en qué zona de la célula se encuentra la enzima PPX en ausencia o presencia de cobre, se llevará a cabo microscopía electrónica con las células previamente tratadas con anticuerpos anti-PPX de *M. sedula*, seguido de un segundo anticuerpo asociado a partículas de oro.

3.2.4 Análisis de la expresión de probables determinantes de resistencia a cobre por qRT-PCR

Para determinar la posible implicancia de los genes Msed_1512, Msed_1094, Msed_0866 y Msed_0846 homólogos a Pho84, además de Msed_0491 homólogo a CopA, Msed_0491 homólogo a CopM y Msed_0492 homólogo a CopT y el gen Msed_0981 que codifica la PPX de *M. sedula*, se efectuará mediciones cuantitativas de sus transcritos por qRT-PCR, para determinar si su eventual aumento o disminución se relacionan con la presencia del metal en el medio.

3.2.5 Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas en condiciones de ausencia y presencia de cobre en *M. sedula*

Para determinar posibles nuevos determinantes de resistencia a cobre, se analizará los extractos totales de *M. sedula* crecidos en presencia y ausencia de cobre. Para ello se empleará la técnica iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation), la que

permite identificar y cuantificar cientos de proteínas dentro de una mezcla compleja, como por ejemplo un extracto celular.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas y condiciones de cultivo

4.1.1 Cepa de *Metallosphaera sedula*

La cepa de *Metallosphaera sedula* utilizada en este estudio corresponde a la descrita por Hubert y col, 1989 y se encuentra anotada en la colección ATCC con el Numero 52363 también se designa por el Numero DSM 5348.

4.1.2 Cepas de *Escherichia coli* y plasmidios

Se utilizaron dos cepas de *Escherichia coli* diferentes, una para clonar los plasmidios y otra para la expresión de las proteínas. La cepa utilizada para el clonamiento de plasmidios fue la cepa TOP-10 (Invitrogen) y la cepa utilizada para la expresión de proteínas fue la BL21 (DE3).

4.1.3 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio Luria Bertani (Medio LB, triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L).

Para la selección de clones, las células se crecieron en placas de LB agar al 1%. El medio utilizado y definido por la DSMZ para el crecimiento de *M. sedula* corresponde al M88: ((NH₄)₂SO₄ 1,3 g/L, KH₂PO₄ 0,28 g/L, MgSO₄ x 7H₂O 0,25 g/L, CaCl₂ x 2H₂O 0,07 g/L, FeCl₃ x 6H₂O 0,02 g/L, MnCl₂ x 4H₂O 1,8 mg/L, Na₂B₄O₇ x 10H₂O 4,5 mg/L, ZnSO₄ x 7H₂O 0,22 mg/L, CuCl₂ x 2H₂O 0,05 mg/L, Na₂MoO₄ x 2H₂O 0,03 mg/L, VOSO₄ x 2H₂O 0,03 mg/L, CoSO₄ 0,01 mg/L, Extracto de levadura 0,1 %), suplementado con 1% de pirita.

4.1.4 Tipos de cultivo

En los experimentos de extracción de poliP y también en las extracciones de RNA total se utilizaron cuatro tipos de cultivos:

Células control: Fueron aquellas a las que no se les agregó cobre en ninguna etapa del crecimiento. En los ensayos de “shock” de cobre a este tipo de cultivo sólo se le agregó medio de crecimiento sin cobre.

Células en shock: Las células expuestas a un “shock” de cobre fueron aquellas que se crecieron en medio de crecimiento de manera normal, hasta el momento en el que se les agregó una determinada cantidad de cobre al medio en forma de sulfato de cobre.

Células adaptadas al metal: Este tipo de cultivo corresponde al cultivo final de una sucesión de trasposos generacionales, a los cuales se le aumentó de manera progresiva la cantidad de cobre cada vez que se volvía a inocular el cultivo, hasta llegar a 16 mM.

Células no adaptadas a la presencia de metal: Estas células corresponden a un cultivo al que desde su inoculación se le agregó un cantidad de cobre en el medio necesaria para que el cultivo creciera hasta la mitad de su capacidad en relación a las células control.

4.2 Biología Molecular

4.2.1 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó mediante el método de Fenol-Cloroformo. Se tomaron dos mL de cultivo celular en la fase media de crecimiento y se centrifugaron a 7.500 x g durante 10 min. El pellet celular se resuspendió en 60 µL de tampón TEN (20 mM TRIS-HCl pH 8.00, 1 mM EDTA y 100 mM NaCl) y a las células resuspendidas se les agregaron 60 µL de tampón TENST (20 mM TRIS-HCl pH 8.00, 1 mM EDTA, 100

mM NaCl, 1,6 % de lauroylsarcosilato de sodio y 0,2 % de Tritón X-100) y se mezclaron mediante agitación durante 1 min. Las células lisadas se incubaron con RNAsa durante 1 h a 30 °C. Luego, a las células lisadas se les agregó 600 µL de Fenol – Cloroformo Alcohol isoamílico saturado básico, mezclando mediante agitación y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min. Luego se recuperó la fase acuosa y se le agregó 600 µL de cloroformo seguido de agitación y posterior centrifugación a 12.000 x g durante 10 min. Para precipitar el DNA se agregaron 600 µL de isopropanol a la fase acuosa y se dejó incubando 1 h a -20 °C. Posteriormente se centrifugó a 13.000 x g durante 20 min, para recuperar el DNA precipitado. Este se lavó dos veces con 750 µL de etanol al 75 % y finalmente se resuspendió en 50 µL de agua libre de nucleasas.

4.2.2 Extracción de DNA plasmidial

La extracción de DNA plasmidial se realizó con el método de la lisis alcalina. Se crecieron las cepas de *E.coli* que contiene el plasmidio de interés en medio líquido LB por 16 h a 37 °C. Para la obtención de DNA plasmidial a pequeña escala se incubó un inóculo de 4 a 10 mL de bacterias en medio LB con antibiótico. Las células se centrifugaron 5 min a 7.000 x g, a 4 °C, se removió el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 0,25 mL de solución I (50 mM glucosa, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA (pH 8,0). Posteriormente se agregaron 0,25 mL de solución II (20 mM NaOH, 1% SDS). Seguido de 0,25 mL de solución III (5 M acetato de potasio, ácido acético glacial). Se centrifugó durante 15 min a 16.000 x g a 4 °C para luego transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Para separar las proteínas se agregó 1 volumen de fenol y se mezcló por vortex, se centrifugó 5 min a 16.000 x g, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y luego se agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Nuevamente el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y el DNA se precipitó con 0,7 volúmenes de isopropanol, seguido de incubación por 20 min a 4 °C y luego se centrifugó 30 min a 16.000 x g a 4

°C. El sobrenadante se removió y se agregó 1 mL de etanol 70 %. Luego se centrifugó 30 min a 16.000 x g a 4 °C. Finalmente se removió el sobrenadante, se secó el sedimento y el DNA se resuspendió en 100 µL de agua.

4.2.3 Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA genómico se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm (A260) en el espectrofotómetro de multi-volúmenes Epoch (Biotek, USA). Como medida de pureza se consideró una razón $A_{260}/A_{280} > 1,8$.

4.2.4 Digestión de DNA

Se incubó el DNA (0,2 a 1,0 µg) con 1-10 U de la enzima de restricción en un volumen final de 20 µL, durante 1 h a 37 °C y en presencia del tampón correspondiente. Los fragmentos de DNA obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa.

4.2.5 Preparación de *Escherichia coli* quimiocompetentes

Se inoculó la cepa de *E. coli* Top-10 en 10 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó durante 16 h a 37 °C con agitación constante. Luego se inocularon 100 mL de medio LB sin antibiótico con 5 mL del cultivo inicial, y se incubó bajo las mismas condiciones hasta que el cultivo alcanzó una DO_{600nm} de 0,5. Se centrifugó el cultivo a 2.000 x g por 10 min a 4 °C, y se resuspendió el sedimento en 20 mL de CaCl₂ 0,1 M estéril y frío. Se incubó en hielo entre 30 min a 1 h y se centrifugó a 2.000 x g 10 min a 4 °C. Se resuspendió el sedimento en 2 mL de CaCl₂ 0,1 M y las células se guardaron a -80 °C hasta ser utilizadas.

4.2.6 Transformación de *Escherichia coli* quimiocompetentes

Se mezclaron 100 µl de células quimiocompetentes recién preparadas en hielo con 10 a 50 ng de plásmido o la mezcla completa de la ligación y se incubó en hielo por 30 min. Se dio un “*shock*” térmico a 42 °C por 45 seg y se incubó en hielo 2 min. Se agregaron 500 µl de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37 °C con agitación por 1 h. Las bacterias se centrifugaron 3 min a 2.000 x g y el sedimento se resuspendió en 100 µl de medio LB. Se sembraron las bacterias en placas de LB-agar con el antibiótico adecuado. Se incubaron las placas a 37 °C 16 h, o hasta que las colonias alcanzaron un tamaño adecuado.

4.2.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para cada reacción se usaron 5 µL de amortiguador 5X “Green Go taq buffer” (Promega), 1/10 de DNA, 0,5 µM de cada partidor, 0,2 mM de dNTPs, 3 mM de MgCl₂ y 0,5 U de Taq DNA polimerasa “Go Taq” (Promega). Para la amplificación se utilizó un programa con desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, 30 ciclos con 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 0,5 min de extensión a 72 °C y finalizando con un paso de 10 min a 72 °C. En la tabla 6 en la sección anexos, se muestra el detalle de los partidores utilizados.

4.2.8 Método de generación de mutantes

Los mutantes se generaron por el método SLIM (Site-Directed, Ligase-Independent Mutagenesis) descrito por Chiu y col. 2004. El método consiste en amplificar completamente el plásmido que contiene el gen a expresar, mediante la amplificación con partidores que poseen las mutaciones puntuales. Según lo descrito, el método utiliza la amplificación inversa por PCR del DNA molde mediante el uso de dos partidores largos y dos partidores cortos en una reacción única. Los partidores largos están diseñados para dejar la mutación en extremos cohesivos una vez finalizado el PCR. Una vez que se ha

hecho la amplificación, un paso de desnaturalización y apareamiento permite la formación del vector adecuado para clonar.

4.2.9 Secuenciación

Los plásmidos con las mutaciones generadas se secuenciaron en la empresa Macrogen.

4.2.10 Electroforesis de ácidos nucleicos

La electroforesis de ácidos nucleicos se realizó en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 0,5 X (20 mM Tris-acetato pH 8,0, 0,5 mM EDTA). Todas las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6 X (0,25 % de bromofenol, 40 % sacarosa) utilizando GelRed Nucleic Acid Gel Stain (10.000 X) como tinción del gel. La electroforesis se realizó a 100 V durante 15 a 30 min. Las muestras se visualizaron por la fluorescencia emitida bajo luz ultravioleta de 320 nm.

4.2.11 Método de clonación y expresión de proteínas

El gen Msed_0981 de *M. sedula* se amplificó desde el DNA genómico de *M. sedula* con los partidores MRJ Fw3 y MRJ Rv3, los que poseen los sitios de corte para las enzimas *NdeI* y *XhoI* respectivamente. El fragmento amplificado se clonó en el vector comercial pGEM-T easy vector (Promega) y se transformó en *E. coli* TOP-10. Posteriormente se aisló el DNA plasmidial con el gen de interés y se escindió con las enzimas *NdeI* y *XhoI*. Este fragmento se clonó en el sitio de múltiple clonamiento del vector de expresión pET-TEV 28a, entre los sitios de corte de las mismas enzimas. Este vector corresponde a un derivado del vector pET 28a, al que se agregó el sitio de reconocimiento y corte de la proteasa TEV del Virus del mosaico del Tabaco en el extremo amino terminal. La cepa utilizada para clonar el vector fue *E. coli* TOP-10 y la cepa utilizada para expresar la proteína fue *E. coli* BL21 (DE3).

4.2.12 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Las proteínas se cuantificaron agregando 10 μ L de muestra a 200 μ L de agente de Bradford de la empresa sigma y midiendo la absorbancia a 595 nm.

4.2.13 Método de purificación de proteínas

Para la purificación de la proteína PPXr de *M. sedula*, se creció 5 mL de cultivo de la cepa BL21 (DE3) (con el vector para expresar la proteína, de aquí en adelante BL21 (DE3) PPX Msed) durante la noche. Las células se centrifugaron y suspendieron en 1 mL de LB fresco y utilizado como inóculo para 200 mL de cultivo. El cultivo de 200 mL de la cepa BL21 (DE3) PPX Msed, se creció hasta una DO_{600} nm de 0,6 y se adicionó IPTG 1 mM. Luego de 4 h, las células se colectaron por centrifugación durante 20 min a 4.000 x g y el pellet se suspendió en 30 mL de amortiguador de unión 1 X que contenía imidazol 40 mM, NaCl 0,5 M, Tris-Acetato 20 mM, pH 7,0, $MgCl_2$ 20 mM y KCl 175 mM. Las células se lisaron por sonicación en el sonicador Qsonica sonicators modelo CL-334, por 20 min, con intervalos de sonicación de 20 s separados por 40 s de descanso a una potencia de 30 %. Luego de separar el pellet por centrifugación (16.000 x g por 15 min), el sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22 μ m. Seguidamente se aplicó sobre una columna que contenía 1 mL de resina his-NTA, previamente equilibrada con el buffer de unión. La proteína PPXr se eluyó con 1mL de amortiguador de elución que contenía imidazol 600 mM, NaCl 0,5 M, Tris-Acetato 20 mM, pH 7,0, $MgCl_2$ 20 mM y KCl 175 mM. Las fracciones colectadas (0,5 mL) se analizaron por SDS-PAGE.



4.2.14 Electroforesis de proteínas

Para analizar las muestras de proteínas en geles unidimensionales SDS-PAGE, se mezcló 2 volúmenes de la solución que contenía 5-20 µg de proteínas más un volumen de amortiguador de carga 4X (Tris-HCl 0,187 M pH 6,8, SDS 6 %, glicerol 30 %, β-mercaptoetanol 15 % y azul de bromofenol 0,06 %). Las muestras se calentaron a 95 °C por 5 min y 1 a 5 µL se aplicaron en los pocillos de geles de poliacrilamida al 12,5 %. La electroforesis se corrió a 80 V por 30 min y luego a 120 V hasta que el colorante indicador alcanzó el borde inferior del gel. Posteriormente, los geles se fijaron en una solución de 45 % metanol y 1 % ácido acético por 30 min y posteriormente se lavó con agua bidestilada y se tiñeron con azul de Comassie G-250 (0,1 % de azul de Comassie G-250 en metanol 34 %, ácido acético 0,5 % y sulfato de amonio al 17 %) durante la noche. Al día siguiente el gel se destiñó con agua bidestilada.

4.2.15 Western blot

La expresión de la proteína PPXr en *E. coli* se detectó por “Western-blotting”. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se aplicó una corriente constante de 80 mA por 60 min. La eficiencia de la electrotransferencia se confirmó usando marcadores moleculares preteñidos (New England Biolabs) y tiñendo el gel después de la electro transferencia con azul de Comassie G-250.

4.2.16 Extracción de RNA total

El RNA total de *M. sedula* se extrajo con el método de TRIzol® Reagent de Ambion, Este reactivo es una mezcla de Fenol ácido e isotiocianato de guanidinio propuesto como una mejora del método original de Chomczynski & Sacchi, 1987. El fenol ácido permite la partición del RNA en la fase acuosa y el isotiocianato de guanidinio la

desnaturalización de proteínas como las RNAsas. Para la extracción de RNA primero se colectó las células por centrifugación a 4.000 x g por 15 min, luego se suspendió en 10 mL de M88 y se volvieron a centrifugar como antes. Este proceso de lavado de las células se repitió una vez más. El pellet celular se suspendió en 60 µL de tampón TEN (20 mM TRIS-HCl pH 8.00, EDTA 1 mM y NaCl 100 mM) y se agregó 60 µL de tampón TENST (20 mM TRIS-HCl pH 8.00, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, lauroylsarcosil de sodio 1,6 % y Tritón X-100 0,2 %) para romper las células y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se agregó 1 mL de reactivo Trizol y se mezcló bien, dejándose a temperatura ambiente por 5 min. Luego se agregó 200 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente mediante inversión del tubo durante 30 s y se centrifugó a 13.000 x g por 15 min a 4 °C. Al sobrenadante se agregó un volumen de isopropanol, seguido de mezclado e incubación a -20 °C durante 1 h para precipitar el RNA, posteriormente se centrifugo a 13.000 x g por 15 min a 4 °C y el pellet de RNA se lavó dos veces con etanol 75 %. Finalmente se suspendió en 40 µL de agua libre de nucleasas.

4.2.17 Retro transcripción (síntesis de cDNAs)

Para la obtención del cDNA en cada condición de estudio se realizó una transcripción inversa del RNA extraído. Se ocupó 0,8 µg del RNA y 0,5 µg de hexadesoxinucleótidos al azar (Random hexamer primer, Promega). Primero se incubó una mezcla de 5 µl que contiene el RNA y los partidores a 70 °C por 5 min para la desnaturalización de las estructuras secundarias del RNA y facilitar la hibridización de los partidores. Posteriormente, se incubó en hielo por 5 min y se agregó 15 µl de una mezcla de amortiguador "ImProm-II" 5x (Promega), dNTPs 0,5 mM cada uno, MgCl₂ 3mM, y 1 U de la transcriptasa reversa (TR) "ImProm-II" (Promega). La reacción de síntesis incluyó una incubación inicial por 10 min a 25 °C para inducir la unión de los partidores y luego

la síntesis se realizó por 1 h a 42 °C para luego finalizar con un paso para lograr la desnaturalización de la transcriptasa reversa por 15 min a 70 °C.

4.2.18 PCR en tiempo real y análisis de datos

Para el análisis de la transcripción de los determinantes de resistencia al Cu, se cuantificó la expresión total de los transcritos por PCR en tiempo real. Este método se basa en la relación que existe entre el aumento de la fluorescencia en las reacciones de PCR que usan el fluoróforo SYBR GREEN. Esta molécula se intercala en las moléculas de doble hebra, de manera que a medida que aumenta el número de éstas en una reacción de PCR, también lo hará la fluorescencia. El equipo de PCR en tiempo real detecta el ciclo en el cual la fluorescencia de una reacción sobrepasa el nivel basal. Este ciclo se llama “cycle treshold” o CT, y es el valor que se utilizó en los cálculos posteriores. En este trabajo se utilizó el método de cuantificación relativa para la cuantificación de transcritos. Este método consiste en la razón de los transcritos de la muestra de estudio versus una muestra control (Pfaffl y col. 2002). En este caso es la razón entre las muestras expuestas a CuSO₄ con la muestra control correspondiente a la cepa crecida sólo en medio M88. Para normalizar tanto las muestras de estudio como el control se utilizó un gen de referencia o “housekeeping” que en este caso fue el rRNA 16S. La expresión relativa de un gen de la muestra de estudio sobre la muestra control se expresa de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Muestra 1}}{\text{Muestra 2}} = \frac{(1 + E_B)^{CT_{B1} - CT_{B2}}}{(1 + E_A)^{CT_{A1} - CT_{A2}}}$$

E_A = Eficiencia partidor gen de normalización

E_B = Eficiencia partidor gen de interés

CT_{A1} = Ciclo Umbral muestra control (gen de normalización)

CT_{A2} = Ciclo Umbral muestra (gen de normalización)

CT_{B1} = Ciclo Umbral muestra control (gen de Interés)

CT_{B2} = Ciclo Umbral muestra (gen de Interés)

Para medir la eficiencia de los partidores (E) se realizó 5 diluciones seriadas desde 10 ng de DNA hasta 1 pg de DNA genómico de *M. sedula*. Se consideró una eficiencia óptima entre un 85-100% para todos los partidores a ocupar. Finalmente, se supuso una eficiencia de un 100% (E=1), para todos los partidores que cumplieron con el requisito anterior, lo que dejó la fórmula de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Muestra 1}}{\text{Muestra 2}} = \frac{2^{\text{CT}_{B1}-\text{CT}_{B2}}}{2^{\text{CT}_{A1}-\text{CT}_{A2}}}$$

4.3 Polifosfatos (poliP)

4.3.1 Extracción de poliP

Se realizó según Ault-Riché y col. (1998), para lo que se coleccionó alícuotas de 1 ml de los cultivos, y se centrifugaron por 5 min a 4.500 x g. Los sedimentos se suspendieron en 0,3 ml de isotiocianato de guanidina 4 M (GITC), Tris-HCl 50 mM pH 7,0 precalentado a 95 °C. La suspensión se mezcló por agitación en un vórtex y se incubó a 95 °C durante 3 min. Se reservó una alícuota de 20 µl de esta fracción para determinar la concentración de proteínas. A cada muestra se agregó 30 µl de SDS 10 % y luego de una incubación a 95 °C por 5 min, se agregó 300 µl de etanol absoluto (100 %) y 5 µl de una suspensión de dióxido de silicio (Glassmilk). Luego de agitación en vórtex e incubación por 30 s a 95 °C, los tubos se centrifugaron a 13.000 x g por 1 min y el sedimento de Glassmilk se resuspendió por vórtex en 200 µl de tampón "New Wash" frío (Tris-HCl 5 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, etanol 50 %) y se centrifugó a 13.000 x g por 30 s. El sedimento que contenía el poliP, DNA y RNA unido a las perlas de vidrio se suspendió en 100 µl de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,0, MgCl₂ 5 mM, DNasa 5 µg/ml y RNasa 5 µg/ml y se incubó a 37 °C por 30 min. Luego el sedimento se lavó dos veces con 200 µl del amortiguador "New Wash" frío para eliminar los productos de la degradación de los ácidos nucleicos. El poliP unido a Glassmilk se eluyó en dos pasos

suspendiendo el sedimento por vórtex en 50 μ l de agua cada vez, incubando 2 min a 95 °C y centrifugando a 13.000 x g para luego recuperar el sobrenadante. El poliP soluble recuperado en esta fracción (100 μ l) se congeló a -20 °C hasta su cuantificación.

4.3.2 Cuantificación de poliP

La cuantificación de los poliP se realizó midiendo su contenido de fosfato inorgánico (Pi). Para ello, 30 μ L de cada una de las muestras de poliP obtenidas se sometieron a una hidrólisis ácida con 30 μ L de HCl 2N a 95 °C por 30 min para provocar la liberación de Pi de las cadenas de poliP. Para la cuantificación de Pi se utilizó el sistema comercial EnzChek Phosphate Assay kit de Invitrogen. Este kit comercial es un método espectrofotométrico de detección de Pi basado en un método originalmente descrito por Webb, (1992). En presencia de Pi, el sustrato 2-amino 6-mercapto metilpurina 7-ribosa (MESG) se convierte enzimáticamente por la fosforilasa de purina (PNP) a 1-fosfato ribosa y 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina. El producto formado tiene una absorbancia máxima a 360 nm, la que es cuantificable por espectrofotometría y se asocia a una concentración de Pi a través de una curva de calibración.

4.3.3 Visualización de poliP

La electroforesis y posterior visualización de los poliP se realizó con una variación del protocolo descrito por Lichko y col, (2006). El gel de bis-acrilamida al 20 % en tampón Tris borato (TBE) 900 mM pH 8,3, EDTA 27 mM y urea 7 M, se corre a 300 V durante 1 h en tampón de corrida del gel (TBE 1 X y 7 M de urea). Luego la muestra de poliP se mezcló con tampón de carga de poliP (50 % sacarosa, 0.125 % azul de bromofenol y 900 mM Tris borato a pH 8.3, 13.5 mM EDTA) y se aplicó en los pocillos del gel. Luego se corrió el gel durante 1 h 30 min a 300 V. Para la visualización de los poliP el gel se tiñó directamente con una solución al 0,05 % de azul de toluidina, 25 % de metanol y 5 % de

glicerol durante 30 min, para luego desteñirlo en una solución de 25 % de metanol y 5 % de glicerol.

4.4 Microscopía

4.4.1 Preparación de muestras para TEM

Se colectó células de *M. sedula* y se lavaron con M88. Luego se suspendieron en el mismo medio hasta obtener una concentración de 1×10^9 cel/mL y 10 μ L de esta suspensión se montaron sobre grillas de níquel. El exceso de líquido se absorbió con papel filtro y las grillas se secaron al vacío.

4.4.2 Preparación de muestras para inmuno detección mediante TEM

Se colectó mediante centrifugación durante 10 min a $7.000 \times g$ 15 mL de células. Luego se lavaron dos veces con tampón fosfato 0,1 mM (KH_2PO_4 0,1 M y Na_2HPO_4 0,1 M, pH 7,4) y se colectaron en un tubo Eppendorf de 2 mL. Luego se agregó 2 mL de solución para fijar (tampón fosfato 0,1M, paraformaldehído 5% y glutaraldehído 2%) y se dejó incubando 18 h a 4 °C. Luego de la fijación se elimina la solución fijadora y se agrega tampón fosfato. Luego, las células se deshidrataron con una serie de lavados con etanol y luego se infiltraron con una solución de unicriyl-etanol en una proporción de 1:1 por 24 h. Las muestras se colocaron en cápsulas y se polimerizaron durante 72 h a 45 °C. Los cortes de las muestras se realizaron en un ultramicrotomo y los cortes se depositaron sobre grillas de níquel cubiertas con FORMVAR. Las muestras se bloquearon por 2 h con una solución de BSA al 5% y luego se lavaron con tampón PBS/tween - 20 al 0,05% y se incubaron durante la noche con el anticuerpo anti PPXr diluido 1/100. Al día siguiente, las grillas se lavaron con PBS/tween 20 al 0,05% y se incubaron 2 h con el anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado a las esferas de oro de 5 nm de diámetro.

Finalmente, las muestras se lavaron con PBS/tween 20 al 0,05% y se visualizaron en el microscopio electrónico de transmisión Phillips Tecnai 12.

4.4.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microanálisis mediante análisis de energía de dispersión de rayos X (EDX)

Se realizó según González y Jensen, (1998). Se colectó células de *M. sedula* y se lavaron con M88. Luego se suspendieron en el mismo medio hasta obtener una concentración de 1×10^9 cel. /mL y 10 μ L de esta suspensión se montaron sobre grillas de níquel. El exceso de líquido se absorbió con papel filtro y las grillas se secaron al vacío. Las células se observaron sin tinción con un microscopio electrónico de transmisión Titan 80-300 kV S/TEM. Las células montadas para TEM se analizaron mediante EDX, para la determinación de la composición elemental de una región celular específica. Estas mediciones se realizaron en el Electron Imaging Center for Nanomachines de la Universidad de Los Ángeles California.

4.5 Análisis de la enzima

4.5.1 Modelo y alineamiento de la enzima

El modelo por homología de la enzima PPX de *M. sedula* se realizó utilizando el programa PyMOL y los alineamientos de las secuencias se realizaron en el programa Geneious.

4.5.2 Actividad enzimática

El ensayo de actividad enzimática se realizó en volúmenes de reacción de 50 μ L y en las condiciones óptimas encontradas para la PPXr de *M. sedula*, las que fueron determinadas experimentalmente y se detallan en la sección 5.4. La cuantificación del producto generado en la reacción enzimática se realizó con el uso del sistema comercial EnzChek

Phosphate Assay kit de Invitrogen, descrito anteriormente en la sección 4.3.2. De esta manera se logró determinar la liberación de producto (Pi), en función de las distintas condiciones probadas.

4.6 Proteómica diferencial cuantitativa

4.6.1 Preparación de muestras para iTRAQ

Se recolectó las células de *M. sedula* por centrifugación a 7.500 x g por 15 min y luego se lavaron en M88 dos veces. Luego de esto las células se resuspendieron en el tampón de sonicación (50 mM TRIS-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 µg/mL) y se sonicaron con el sonicador Qsonica sonicators modelo CL-334, por 20 min, con intervalos de sonicación de 20 s separados por 40 s de descanso a una potencia del 30 %. El lisado celular se centrifugó a 10.000 x g por 15 min para remover los restos celulares y células no rotas. Luego se cuantificó el extracto celular en alícuotas de 150 µg de proteína total y se liofilizaron durante 48 h a -40 °C.

4.6.2 iTRAQ

La técnica que se utilizó para los análisis de proteómica cuantitativa fue iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantitation). Esta técnica se basa en la utilización de extractos celulares totales provenientes de diferentes condiciones de cultivo. El primer paso para realizar la cuantificación es digerir los extractos celulares. Luego se marcan los péptidos generados con la molécula marcadora denominada “*isobaric tag*”. Los péptidos provenientes de una condición se marcan con un determinado marcador y los de las demás condiciones se marcan con otros. Los marcadores constan de un grupo reportero, de masa variable (formado por diferentes isótopos) y un grupo denominado de “*balance de masa*”, el que tiene la función de igualar las masas de las moléculas marcadoras a pesar que están formadas por diferentes isótopos. Además, este marcador está unido a un grupo NHS, el

cual reaccionará y se unirá al extremo amino terminal de los péptidos (Figura 5A). Existen cuatro tipos de moléculas marcadoras y todas poseen la misma masa, pero los isótopos que la componen son diferentes. Esto permite que cada péptido sea identificado con sólo una señal en la espectrometría de masa. Posteriormente por espectrometría de masa en tándem se detectan los iones provenientes de los distintos isótopos, con lo cual se puede cuantificar el péptido que estaba en mayor abundancia, ya que la molécula marcadora para cada uno de los distintos cultivos celulares es única. La figura 5 muestra un esquema explicativo de esta técnica (Ross y col. 2004).

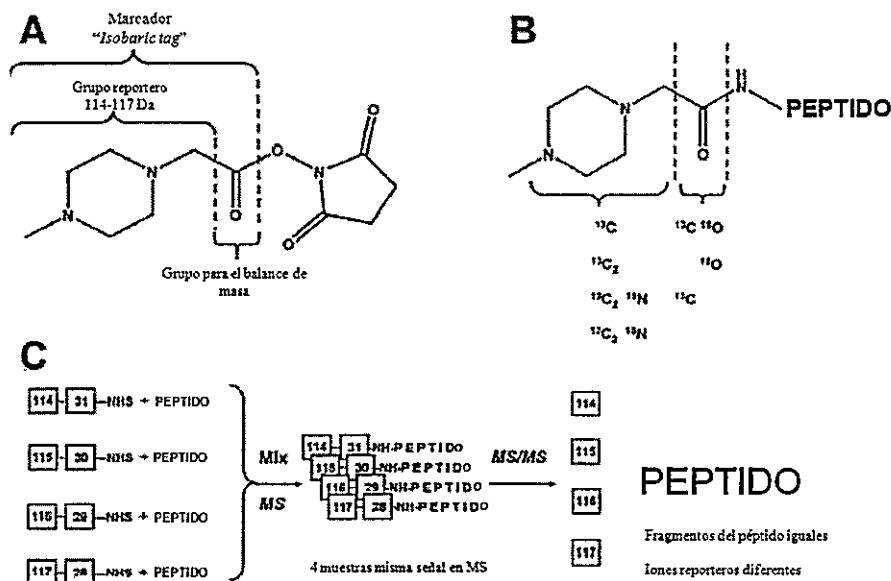


Figura 5. Esquema explicativo de la técnica de iTRAQ, adaptado de Ross y col. (2004). A) Diagrama que muestra los componentes que se utilizan en la técnica iTRAQ. El marcador se compone del grupo reportero y el grupo para el balance de masa del marcador. B) La masa total de la molécula marcadora se mantiene constante utilizando diferentes enriquecimientos con los isótopos ^{13}C , ^{15}N y ^{18}O . El peso del grupo reportero oscila entre 114 y 117 Da mientras que el peso del grupo para el balance de masa va de 28 a 31 Da. C) Se muestra la combinación hecha para tener 4 péptidos con reporteros diferentes, pero de igual masa. Esta mezcla aparecerá como una sola señal en una espectrometría de masa. Luego de la espectrometría de masa en tándem se aprecian los iones provenientes del marcador como señales múltiples de diversas intensidades dependiendo de la cantidad presente en la muestra, lo que indica el péptido más abundante y cuál es su procedencia. El resto de los iones correspondientes al péptido permanecen como una sola señal.

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo Específico 1

Análisis y comparación bioinformática de las enzimas PPX de *M. sedula*, *S. solfataricus* y *E. coli*

La comparación a nivel de secuencias de la proteína PPX de *E. coli*, *S. solfataricus* y *M. sedula* se muestran en la figura 6. Al comparar de manera independiente, por alineamiento de las secuencias de las proteínas PPX de *M. sedula* y PPX de *S. solfataricus* contra la PPX de *E. coli*, se observan porcentajes de identidad de 19,6 % en ambos casos. Al comparar la enzima PPX de *M. sedula* contra la de *S. solfataricus* se observa que el porcentaje de identidad entre ambas secuencias es de 37,4 %.

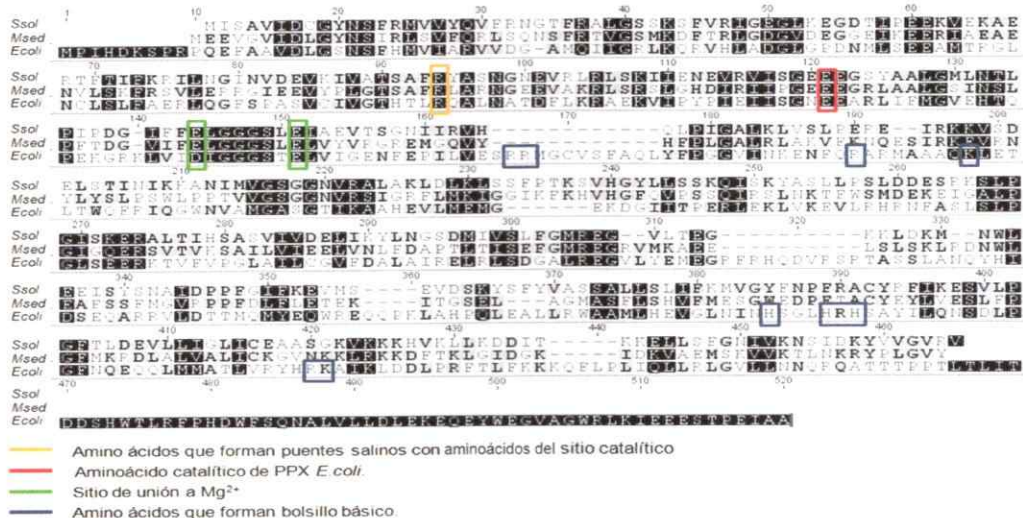


Figura 6. Alineamiento de las secuencias de las enzimas PPX de *S. solfataricus*, *M. sedula* y *E. coli*. Se destacan los sitios que según la estructura cristalográfica de la PPX de *E. coli* (Erumbi et al. 2006) corresponderían a las regiones funcionales de la enzima.

Según la estructura cristalina de la PPX de *E. coli* (Rangarajan y col. 2006), existen al menos cuatro regiones de importancia para la actividad de la enzima. Estas son: el aminoácido catalítico putativo formado por Glu121, el sitio de unión a Mg²⁺ por

Asp143 y Glu150, el aminoácido Arg 93 que forma un puente salino con el sitio catalítico constituido por Arg165, Arg166, Arg189, Lys197, His378, His384, Arg413, Lys414 y Lys488 donde eventualmente se posicionaría el sustrato.

Se puede apreciar que el probable aminoácido catalítico se encuentra conservado en las tres secuencias. Además el sitio de unión a Mg^{2+} , que posee un carácter ácido, se encuentra a su vez bien conservado, con la salvedad del residuo Asp143 que es reemplazado por Glu, lo cual no cambia el carácter ácido de los residuos presentes en esta región. El otro residuo conservado corresponde a la Arg93. Este residuo, según los autores del trabajo en que se determinó la estructura cristalográfica de la PPX de *E. coli* (Rangarajan y col. 2006), está implicado en la formación de un puente salino con el residuo Glu121 perteneciente al sitio catalítico.

La estructura tridimensional obtenida por cristalografía disponible para la enzima PPX de *E. coli* se muestra en la figura 7 (Rangarajan y col. 2006).

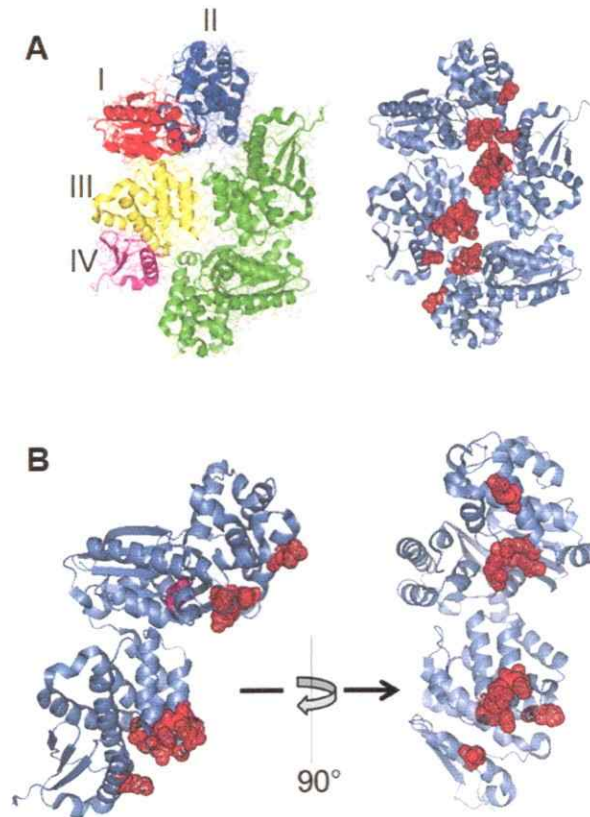


Figura 7. Estructura tridimensional de la PPX de *E. coli*. A) Estructura dimérica de la proteína. En el panel izquierdo, se aprecia en color rojo el dominio I, en color azul el dominio II, en color amarillo el dominio III y en color rosa el dominio IV, los que conforman un monómero de la proteína. El otro monómero se destaca en verde en su globalidad. En el lado derecho se grafica la proteína en su forma dimérica, indicando en rojo el bolsillo básico de unión al sustrato. B) Se aprecia el monómero de la proteína con los residuos que forman el bolsillo básico en rojo y en rosa el posible aminoácido catalítico.

Utilizando como modelo la estructura cristalográfica de la PPX de *E. coli*, se realizó un modelo de la estructura más probable de la enzima PPX de *M. sedula*. Para el modelamiento de la estructura tridimensional de PPX de *M. sedula* se utilizó la página web www.swissmodel.expasy.org y para visualizar los modelos obtenidos se utilizó el programa PyMol. La probable estructura tridimensional de la PPX de *M. sedula* se muestra en la figura 8A.

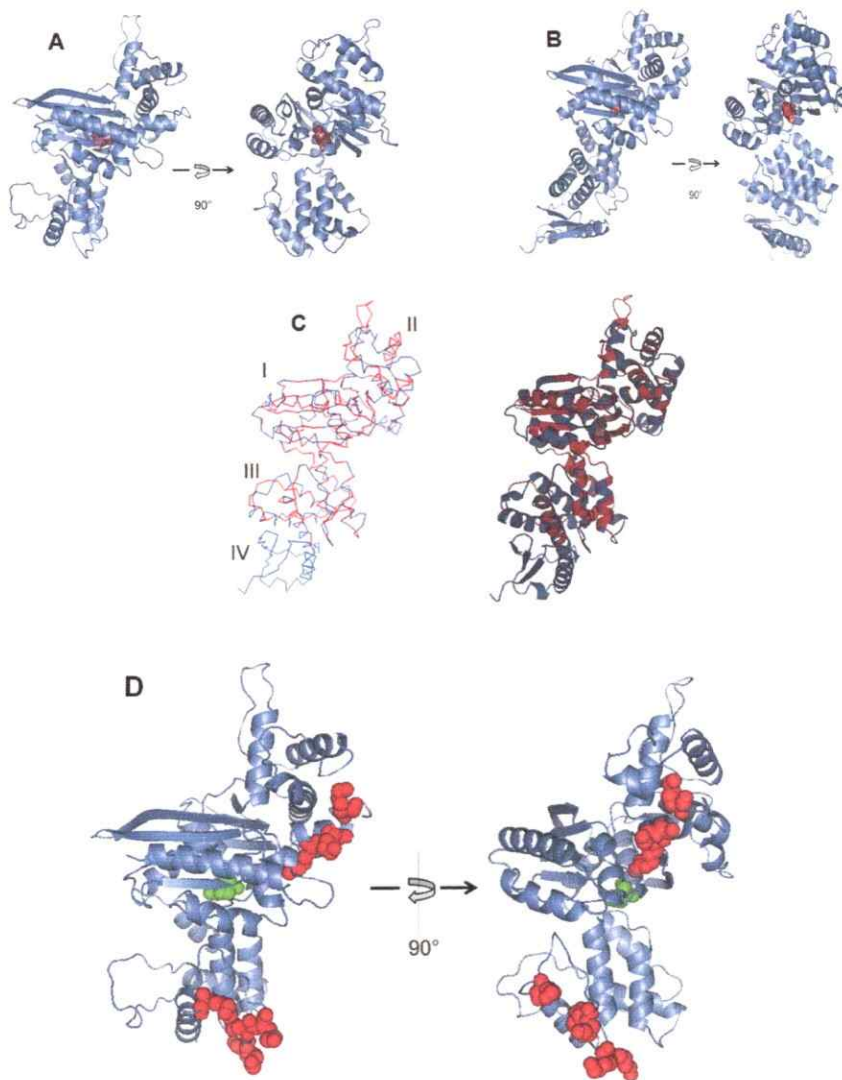


Figura 8. Modelo por homología de la PPX de *M. sedula*. A) Vista del modelo estructural más probable de la PPX de *M. sedula* desde dos posiciones espaciales tomadas con un ángulo de 90° una con respecto a la otra. El posible aminoácido catalítico se destaca en rojo. B) Misma vista que en A de la estructura del monómero de PPX de *E. coli* con el aminoácido catalítico en rojo. C) Superposición de los monómeros de PPX de *E. coli* (azul) y de *M. sedula* (rojo). D) Probable estructura de la PPX de *M. sedula*, con los aminoácidos con carga positiva que formarían el bolsillo donde se posiciona el sustrato, marcados en rojo y el aminoácido catalítico marcado en verde.

Se puede apreciar una vista del monómero de la PPX de *E. coli* (Figura 8B) y *M. sedula* (Figura 8A) con el aminoácido catalítico marcado en rojo, para ambas estructuras. Al superponer las estructuras tridimensionales de ambas observa que la

localización del aminoácido catalítico es similar en ambas estructuras. Además, se aprecia que el modelo generado para la PPX de *M. sedula* carece del dominio IV, el cual se puede apreciar tanto en la secuencia (Figura 6), como en la estructura de la PPX de *E. coli* (Figura 8C). Se puede ver que los aminoácidos implicados en la formación del bolsillo básico, en el que eventualmente se posiciona el sustrato cargado negativamente en la enzima, no se encuentran exactamente conservados. Sin embargo, al analizar la estructura modelada para la posible PPX de *M. sedula*, los aminoácidos que permanecen en la zona donde eventualmente se formaría el bolsillo básico, se puede apreciar la presencia de aminoácidos con carga positiva (Figura 8D), estos aminoácidos corresponden a Lys168, Arg162, Lys165, Lys382, Lys383, Lys386, Lys387 y Lys397.

5.2 Objetivo Especifico 2

Cuantificación de poliP en *M. sedula*

Anteriormente se había descrito la presencia de gránulos densos al paso de los electrones en *M. sedula* utilizando la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Orell y col. 2012). Según estos resultados y los obtenidos en *A. ferrooxidans* y *S. metallicus*, se supuso que los gránulos observados correspondían a polifosfato. Para determinar de manera fehaciente la presencia y composición de estos gránulos se realizó microscopía electrónica de transmisión y microanálisis de energía de dispersión de rayos X (EDX, por sus siglas en inglés). La figura 9A muestra una célula de *M. sedula* con un gránulo denso al paso de los electrones en su centro y la figura 9B muestra los distintos puntos donde se realizó el análisis de composición elemental.

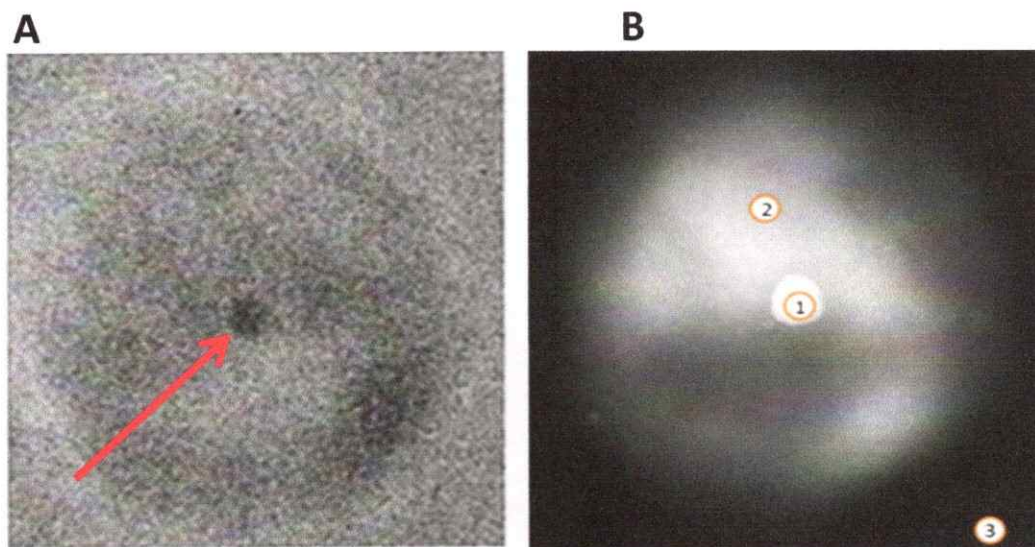
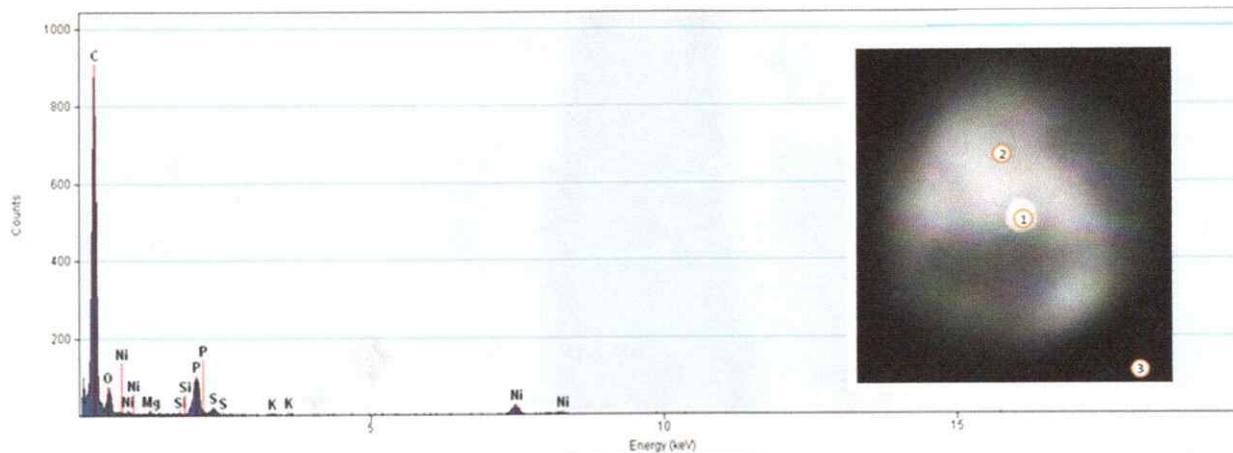


Figura 9. Gránulo de poliP de *M. sedula* obtenido por microscopía electrónica de transmisión. A) Célula de *M. sedula* en la que se aprecia un gránulo denso al paso de los electrones en su centro (flecha). B) La célula mostrada en A, en la que se indican los puntos de análisis de la composición elemental: Punto 1: centro del gránulo, punto 2: citoplasma celular y punto 3: exterior de la célula.

En la figura 10 se puede apreciar el análisis de la composición de los distintos puntos analizados. El punto 1 corresponde al centro del gránulo y muestra un porcentaje de fósforo de 20,72 % (Figura 10A). El punto 2 muestra un porcentaje de fósforo del 0,18% (Figura 10B) y el punto 3 que se encuentra fuera de la célula indica una composición porcentual de fósforo de 2,8% (Figura 10C). En conjunto estos datos indican que el gránulo que se observa al centro de la célula contiene un elevado porcentaje de fósforo entre sus componentes, lo que sugiere que el gránulo podría estar formado en su mayor parte por fosfato en forma de poliP.

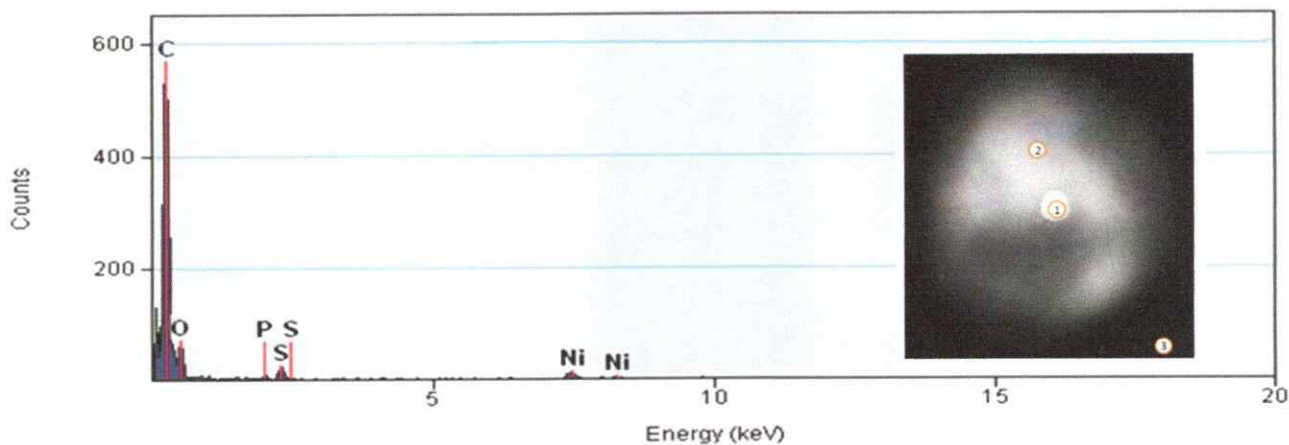
Punto 1: Porcentaje de fósforo: 20,72%

A



Punto 2: Porcentaje de fósforo: 0,18%

B



Punto 3: Porcentaje de fósforo: 2,8%

C

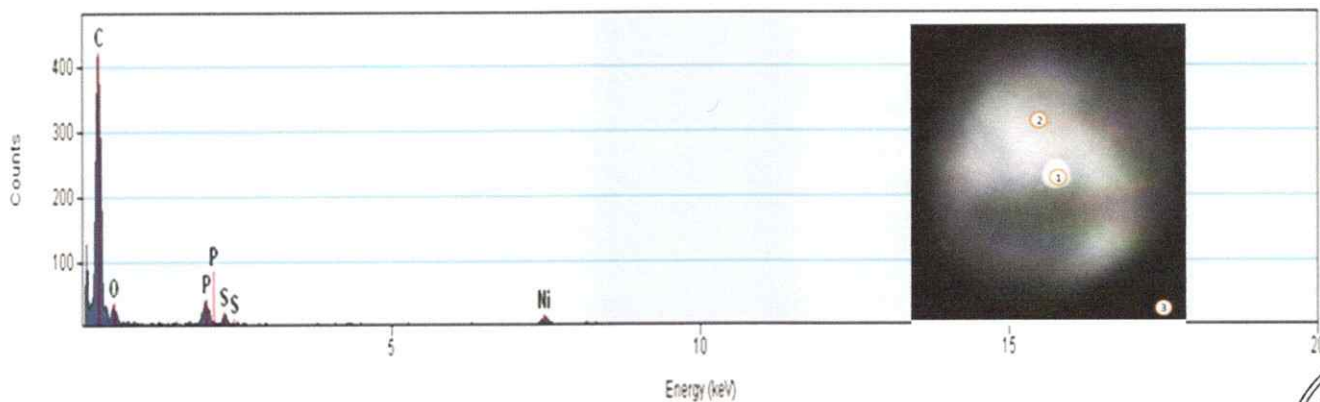


Figura 10. Análisis elemental de diferentes áreas en una célula de *M. sedula* mediante EDX. Composición elemental de A) gránulo denso al paso de los electrones. B) Región citoplasmática y C) Exterior de la célula.



El siguiente paso fue medir la concentración intracelular de poliP en *M. sedula*. Luego de extraerlos (como se indicó en la sección 4.3.1), los poliP se hidrolizaron con HCl durante 30 min a 95 °C, para finalmente determinar la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) generado. Para vincular la cantidad de Pi liberado en la hidrólisis con la cantidad de masa celular, se expresó el Pi liberado por mg de proteína del extracto celular. En la figura 11 A se puede apreciar una curva de crecimiento de *M. sedula* y la concentración intracelular de poliP expresado como los nmoles de Pi por mg de proteína en un cultivo de *M. sedula* a diferentes tiempos de su curva de crecimiento (Figura 11 B).

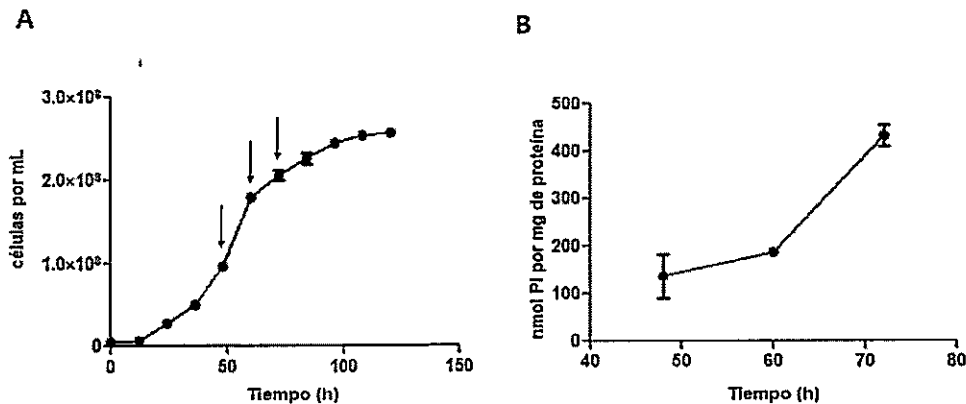


Figura 11. Concentración de poliP a distintos tiempos de la curva de crecimiento de *M. sedula*. A) Curva de crecimiento, en donde se indican con flechas los puntos cuantificados en B. B) Cuantificación de poliP.

La concentración máxima de poliP en *M. sedula* se alcanza en la fase exponencial tardía, tal como se había descrito para otros microorganismos (Remonsellez y col. 2006). La concentración intracelular de poliP en *M. sedula* fluctúa entre ~100 nmoles de Pi/mg de proteína en la fase exponencial temprana y aproximadamente 400 nmoles de Pi / mg de proteína en la fase exponencial tardía.

5.3 Objetivo Especifico 3

Determinación del efecto del Cu en *M. sedula*

En otros microorganismos acidófilos se ha observado una disminución de los gránulos de poliP cuando éstos se exponen a cobre (Álvarez y Jerez. 2004; Remonsellez y col. 2006). Por ello se estudió la dinámica de síntesis y degradación de los gránulos de poliP, a través de la curva de crecimiento de *M. sedula* crecida en presencia del metal. Para ello, se realizó dos tipos de experimento. Uno en el que se agregó cobre al medio de crecimiento de células que no habían sido expuestas al metal y otro en el que las células se adaptaron a la concentración inhibitoria mínima del 50% de cobre (MIC 50). En la figura 12 se ven las curvas de crecimiento de los cultivos adaptados a 16 mM de CuSO₄ como la de aquellos no adaptados, pero expuestos a CuSO₄ 8 mM.

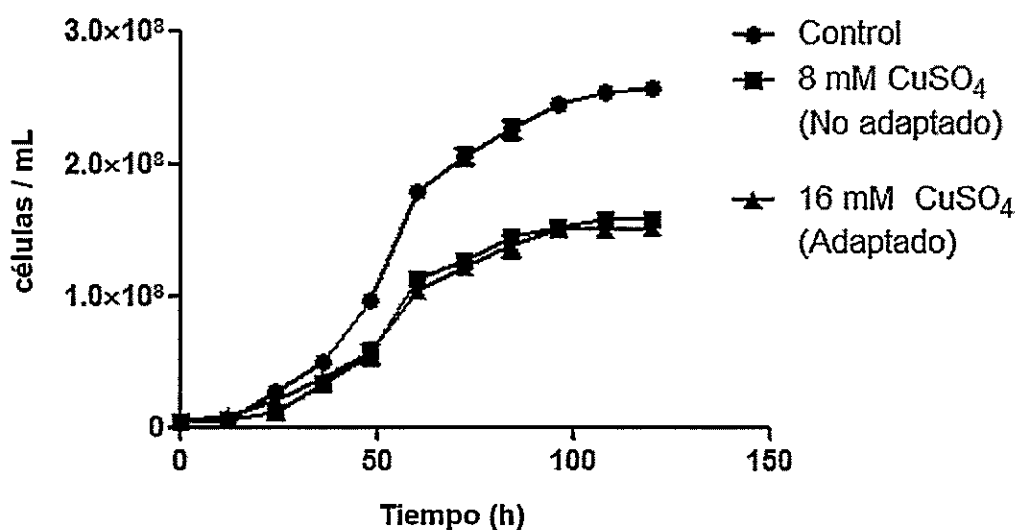


Figura 12. Curvas de crecimiento de *M. sedula* en ausencia y en presencia de cobre. Se utilizó una concentración no letal de cobre que permitiera alcanzar un 50 % del crecimiento. Esta concentración fue 8 mM para los microorganismos no adaptados y 16 mM para los adaptados. El análisis estadístico mediante ANOVA arrojó un valor de P menor a 0,0001, lo que indica la alta significancia que tiene la disminución en el crecimiento.

La figura 13 muestra que las células adaptadas a CuSO_4 poseen una muy baja cantidad de poliP en comparación a las células control. En cambio, las células no adaptadas a CuSO_4 , presentaron una baja en los niveles de poliP en el tiempo, pero su dinámica de síntesis y degradación de poliP fue la misma que en el control, alcanzando un punto máximo en la fase exponencial tardía. Para las células no adaptadas a Cu el rango de poliP intracelular fluctúa aproximadamente entre 200 y 300 nmoles de Pi/mg de proteína durante la curva de crecimiento. Por el contrario, las células adaptadas a Cu presentaron niveles de poliP muy bajos, que oscilaron levemente en el rango de los 80 nmoles de Pi / mg de proteína desde el principio de la medición.

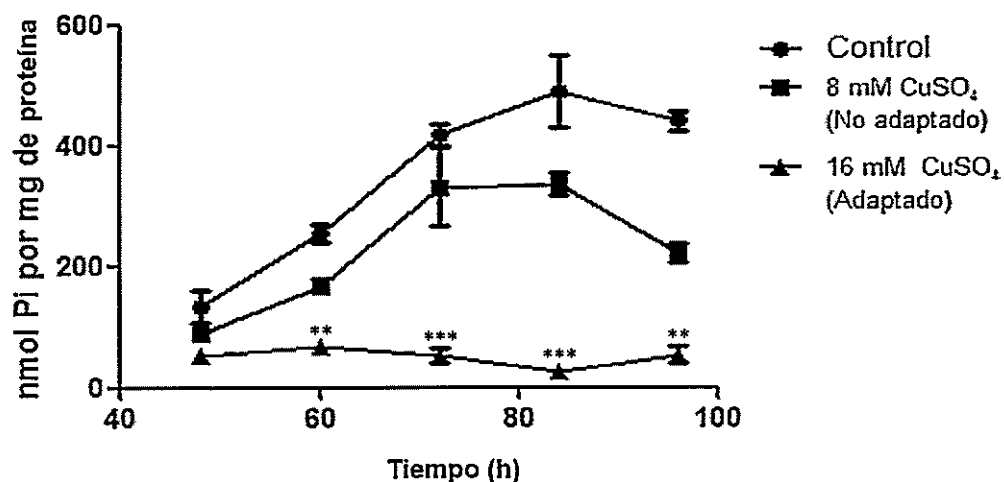


Figura 13. Determinación de los niveles de poliP en *M. sedula* crecida en ausencia y presencia de cobre. Se efectuó la extracción y cuantificación de poliP como se describió en materiales y métodos. Las condiciones de crecimiento de las células fueron como en la figura 12. El análisis estadístico mediante ANOVA arrojó un valor de P menor a 0,0001, lo que indica la significancia en el cambio de la concentración de poliP intracelular en las diferentes condiciones.

Células crecidas hasta fase exponencial tardía se continuaron incubando por los tiempos indicados en la figura 14 ya sea en ausencia (A) o presencia de un “shock” de cobre agregado a tiempo 0 (B). Se puede ver que los niveles de poliP no varían en el tiempo en el control sin metal. Por contrapartida, en presencia de cobre se observa que la concentración intracelular de poliP disminuye rápidamente a partir de los 15 min alcanzando un mínimo de aproximadamente 200 nmoles de Pi / mg de proteína a los 75 min, cantidad que se mantiene en el tiempo hasta los 180 min después del “shock”.

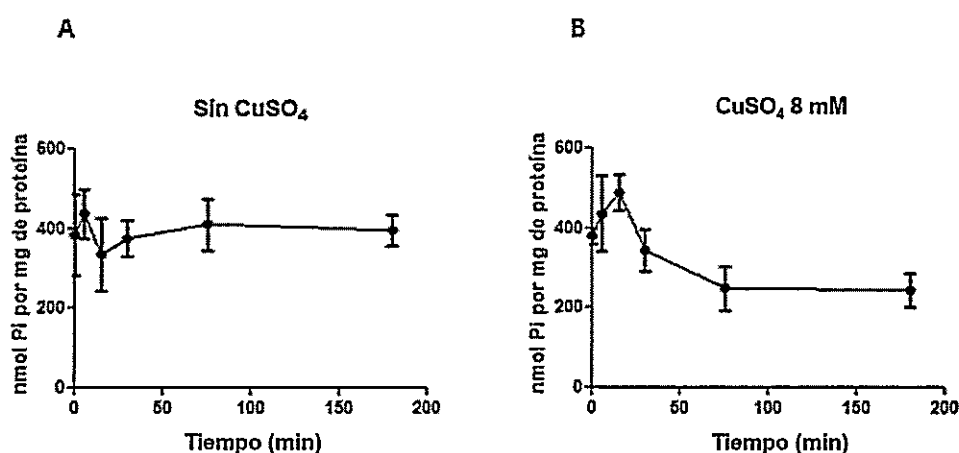


Figura 14. Efecto del Cu en los niveles de poliP en *M. sedula*. Se crecieron células hasta la fase exponencial tardía, en la que los poliP intracelulares están en su mayor concentración. A estas células se les determinó los niveles de poliP a los tiempos indicados en ausencia de cobre (A) y en condiciones de un “shock” de 8 mM de cobre agregado al tiempo cero (B). El análisis estadístico mediante ANOVA arrojó un valor de P menor a 0,0028, lo que indica que la disminución de los poliP intracelulares entre una condición y otra es significativa.

Según lo observado, las células de *M. sedula* poseen poliP que disminuyen sus niveles frente a la exposición a CuSO₄ en el medio de cultivo. En esta Tesis se ha demostrado que la concentración máxima de poliP en la célula se alcanza en la fase exponencial tardía y corresponde a una magnitud de aproximadamente 400 nmoles de Pi / mg de proteína. También se ha visto que los niveles de poliP disminuyen en un cultivo celular expuesto a una concentración no letal de 8 mM de CuSO₄ y que poseen un mínimo de

aproximadamente 50 nmol de Pi / mg de proteína en cultivos adaptados a 16 mM de CuSO₄ (Figura 13). Por otra parte, un “shock” de CuSO₄ promueve la disminución de la concentración intracelular de poliP.

5.4 Objetivo Específico 4

Caracterización de la enzima PPX de *M. sedula*

Como se ha descrito con anterioridad, en diversos microorganismos existe una enzima responsable de la hidrólisis de los poliP que es la exopolifosfatasa (PPX) (Akiyama y col. 1993; Cardona y col. 2002; Lindner y col. 2009). La presencia de esta enzima en *M. sedula* sólo está propuesta por homología de secuencia de DNA (Auernik y col. 2008). Se ha predicho que el gen Msed_0981 codificaría para la enzima PPX en el genoma de *M. sedula*. Para comprobar o descartar esta idea se clonó, expresó y caracterizó el producto de este gen que eventualmente codifica la PPX de *M. sedula*.

Para estudiar la actividad enzimática *in vitro* del producto del gen Msed_0981, este gen se clonó en el vector de expresión pET-TEV28a y se sobreexpresó en *E. coli* BL21 (DE3). Además para determinar cuál o cuáles son los aminoácidos responsables de la catálisis en esta enzima se realizaron sustituciones de los aminoácidos E111, E112 y E113 por el aminoácido alanina. En la figura 15 se muestra la secuencia de los genes clonados en el vector con las respectivas mutaciones y su alineamiento con el gen de PPX de *M. sedula*. En la sección 10.2 (anexos), se muestra el alineamiento completo del gen PPX.

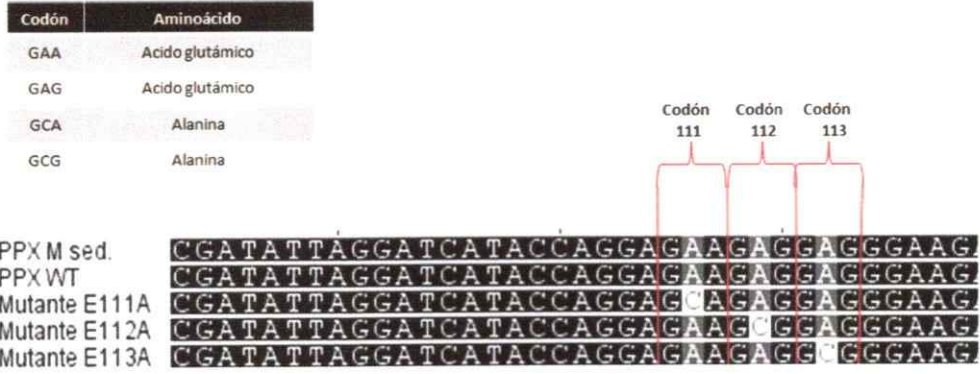


Figura 15. Alineamiento de las secuencias de DNA mutado de PPX de *M. sedula* insertadas en el vector de expresión utilizado. Alineamiento de la región que muestra la inserción de las respectivas mutaciones en el gen Msed_0981.

Una vez clonado el gen Msed_0981 en el vector, se efectuó la expresión heteróloga de la proteína (PPXr) que codifica el gen, en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Los resultados de la purificación de la proteína se muestran en la figura 16.



Figura 16. Purificación de la PPXr de *M. sedula* sobreexpresada en *E. coli*. Los cuatro constructos creados, clonados y sobreexpresados heterológicamente se purificaron usando columnas de afinidad de Ni²⁺. La separación de las proteínas corresponde a una electroforesis de 2 h a 200 V en un gel de poliacrilamida al 12 %.

Para corroborar que el sustrato comercial (Polifosfato de 700 residuos de fosfato en promedio) tuviese el mismo comportamiento descrito con anterioridad para los poliP (Lichko y col. 2006), antes de efectuar los ensayos enzimáticos se hidrolizó parcialmente con HCl (ver sección 10.3).

Una vez comprobado que el comportamiento de los poliP 700 a utilizar correspondía a los descritos con anterioridad, se realizó ensayos para determinar la temperatura óptima de funcionamiento de la enzima.

La figura 17 muestra la temperatura óptima para la hidrólisis enzimática del poliP utilizando la PPXr purificada de *M. sedula*.

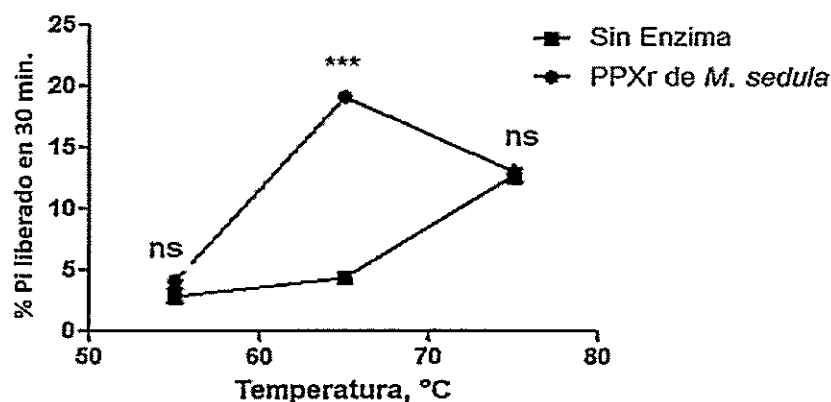


Figura 17. Determinación de la temperatura óptima para la hidrólisis enzimática *in vitro* de poliP por la PPXr de *M. sedula*. Para determinar la temperatura óptima de reacción se utilizó una concentración de 50 nmol de Pi totales de poliP 700 en tampón de reacción (Tris-acetato 50 mM pH 7.0, KCl 175 mM y MnCl₂ 1 mM) y a cada reacción se agregó una cantidad de 200 ng de proteína pura y el producto liberado (Pi) se determinó luego de 30 min de reacción. El *** indica un valor $P < 0,0001$ y ns indica un cambio no significativo.

Previo al análisis que se muestra en la figura 17, se efectuaron reacciones individuales a distintas temperaturas (ver anexos) para determinar las tres temperaturas óptimas para

realizar el ensayo en triplicado, que se muestra en la figura 17. Según lo observado en los anexos, la velocidad de liberación de Pi mediada por la enzima difiere de la reacción sin enzima ya a 45 °C. Esta velocidad aumenta hasta llegar a un máximo a 65 °C y luego disminuye a 75 °C. En la figura 17 se observa que la reacción sin enzima libera Pi a 75 °C, por lo que la diferencia en esta temperatura entre ambas condiciones prácticamente no se observa. Mediante este experimento se logró determinar que la temperatura óptima de ensayo para la enzima PPXr de *M. sedula* es de 65 °C. Aunque es importante mencionar que la cantidad de Pi liberado es muchas veces menor a la cantidad de poliP700 agregado a la reacción. Esto muy probablemente se debe a que la enzima requiere además de algún metal divalente para su reacción. Por ello, se determinó el efecto del Mn^{2+} y el Mg^{2+} como se ha descrito anteriormente (Cardona y col. 2002; Rodrigues y col. 2002).

En la figura 18 se puede ver el efecto que tienen cada uno de los metales probados. La figura 18A muestra el efecto del Mn^{2+} en la reacción enzimática. Se puede ver que existe un pico a la concentración 5 mM. En cambio, en la figura 18B se ve la aparición del pico de máxima actividad en la concentración de 20 mM de Mg^{2+} . También es importante mencionar los niveles de Pi liberados, ya que como se mencionó anteriormente, en cada reacción hay 50 nmol de Pi en forma de poliP 700, por lo que se puede inferir que es el Mg^{2+} , y no el Mn^{2+} , el metal que activa de mejor manera a la enzima.

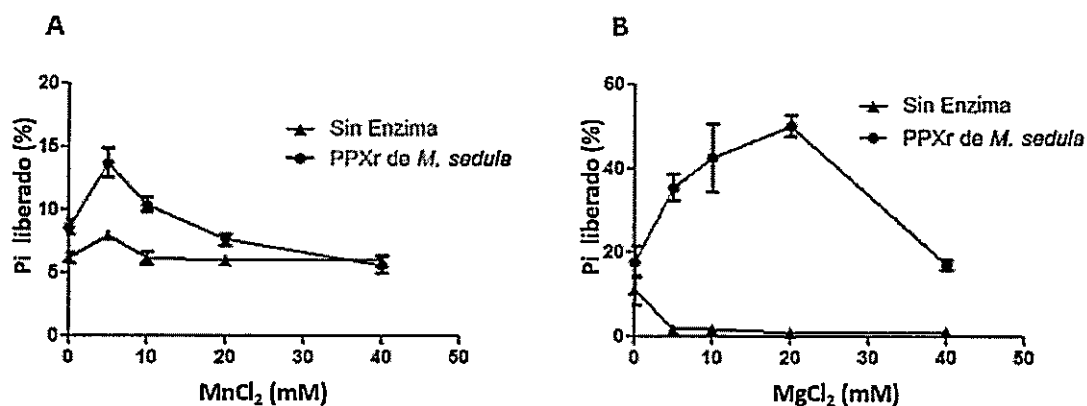


Figura 18. Determinación del efecto de Mn^{2+} y Mg^{2+} en la reacción *in vitro* de la PPXr de *M. sedula*. Liberación de Pi en una reacción *in vitro* de la enzima PPXr de *M. sedula* a tiempo final de reacción de 30 min en presencia de Mn^{2+} (A) o de Mg^{2+} (B). El procedimiento para determinar la cantidad de Pi liberado y la cantidad de poliP agregado a la reacción fue el mismo que se describió para los ensayos de temperatura y esta vez se incubó a 65 °C. El valor estadístico de P en ambas figuras es < 0,0001.

Como una aproximación cualitativa para estimar la actividad enzimática capaz de degradar el poliP se realizó un ensayo enzimático a diferentes tiempos y los productos de reacción se visualizaron por su separación por electroforesis en gel. La figura 19 muestra que a medida que aumenta el tiempo de la reacción, la cantidad de poliP 700 disminuye en el tiempo, lo que se atribuye a la acción de la enzima.

Además se puede apreciar que el poliP remanente en el tubo de reacción sin ser degradado es del mismo tamaño que el inicial (poliP700) a tiempo cero, pero disminuye su cantidad. Al comparar éste experimento, con un experimento de hidrólisis ácida de poliP (Figura 37, anexos), se ve un cambio evidente en la formación de especies intermedias de poliP. Lo que se manifiesta en la formación de una estela de poliP, a causa de la formación de especies de poliP de diferente tamaño. Esto nos indica que la enzima es capaz de degradar su sustrato desde el extremo.

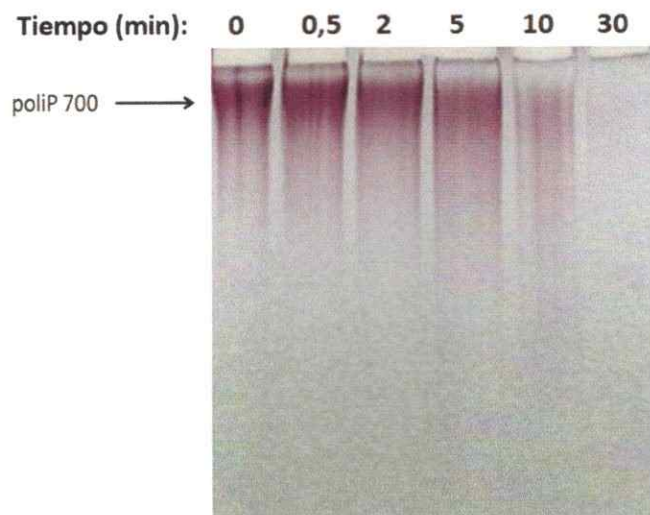


Figura 19. Análisis cualitativo de la degradación enzimática del poliP 700 mediada por la PPXr de *M. sedula*. El ensayo enzimático se realizó con 200 ng de enzima, 200 nmol de poliP 700 en 30 μ L de reacción a 65 °C por los tiempos indicados. Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 15 %. Los poliP se tiñeron con azul de toluidina.

Además de determinar las condiciones óptimas para la reacción de la PPXr se decidió probar si eventualmente la enzima tenía preferencia por algún sustrato en particular. Ya que en el laboratorio se disponía de poliP s de distintos tamaños, se utilizaron para comprobar la eficiencia de la enzima en la liberación de Pi a partir de estos sustratos.

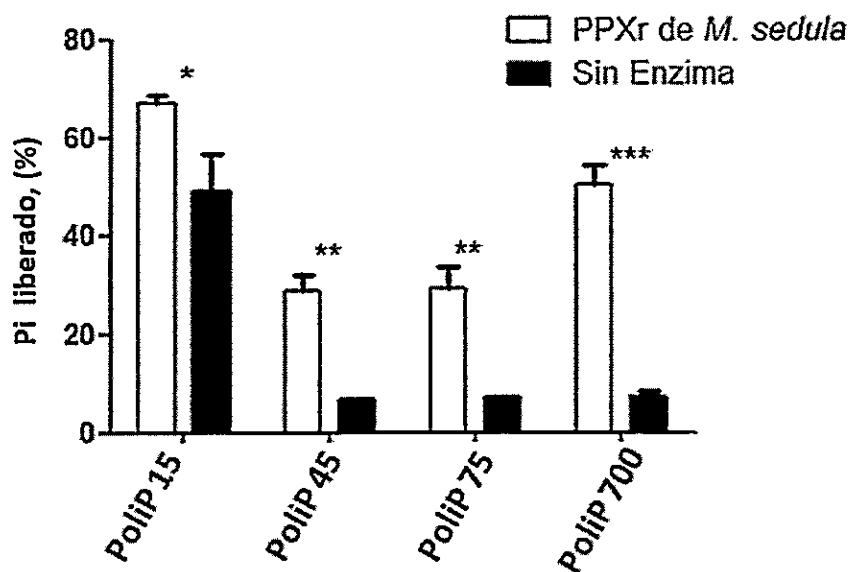


Figura 20. Reacción *in vitro* de PPXr con diferentes sustratos. Las incubaciones de la PPXr de *M. sedula* se realizaron por 30 min a 65 °C. Los sustratos empleados fueron poliP de 15, 45, 75 y 700 residuos nominales de Pi aproximados y con 50 nmoles (como Pi) de cada uno. Según el análisis estadístico: * P < 0,1, ** P < 0,001 y *** P < 0,0001.

De la figura 20 se puede inferir que la enzima puede de liberar fosfato desde los sustratos poliP 45 y poliP 75, pero en menor cantidad que desde poliP 700, por lo que este último sería el sustrato más adecuado para medir la reacción enzimática. Además se ve que el poliP 15 aparentemente libera una cantidad considerable de Pi. Sin embargo también lo hace el control sin enzima. De esto se infiere que este sustrato se encuentra degradado en su mayor parte y la liberación efectiva de Pi por la enzima desde este sustrato de 15 residuos es mínima y sólo correspondería a la diferencia entre el Pi liberado por la enzima y lo que ya estaba inicialmente en forma de Pi en la solución del sustrato (aproximadamente 10 nmol de Pi).

Para determinar el aminoácido implicado en la catálisis se construyó tres mutantes: E111A, E112A y E113A. De estos aminoácidos, el responsable más probable de la catálisis enzimática en *E. coli* es el E112. En la secuencia de la PPX de *M. sedula* este aminoácido correspondería al residuo E113. Se espera por lo tanto, que los otros dos

aminoácidos no están implicados en la catálisis, por lo que servirían para evaluar esta designación de función.

En la figura 21 se muestra una curva de progreso de la reacción, la que se efectuó con la enzima WT y los mutantes E111A y E113A.

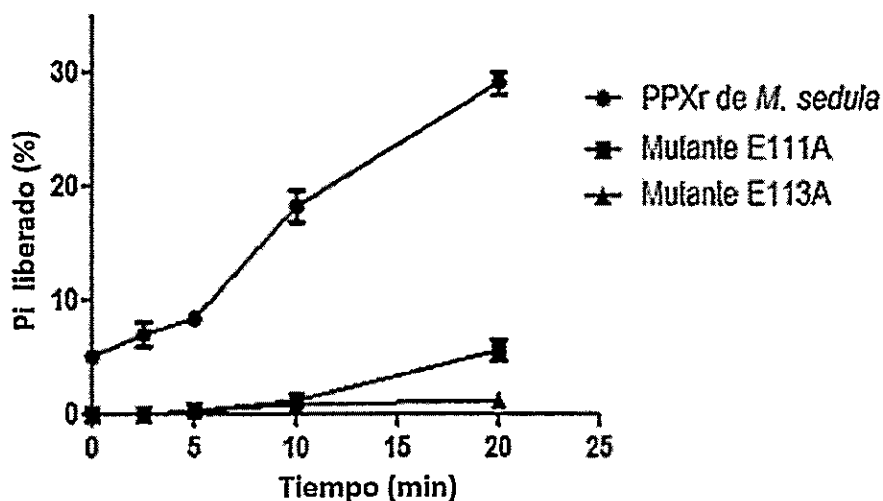


Figura 21. Actividad de los mutantes E111A y E113A. La curva de progreso de la reacción enzimática se realizó en las condiciones experimentales determinadas anteriormente. El análisis estadístico de los datos indica que el valor de P para la comparación entre la curva de la reacción con la enzima WT y los respectivos mutantes es $P < 0,0001$. Este valor aumenta a 0,1 cuando se comparan las mutantes entre sí.

En la figura 21 se puede ver que el mutante E111A posee muy baja actividad, pero la pérdida de ésta es total en el mutante E113A. Este resultado indica que ambos aminoácidos están implicados en la reacción catalítica. En la figura 39 de la sección 10, se muestra la actividad que posee la enzima mutada en E112A, la que no se afecta por este cambio.

Para determinar los parámetros cinéticos de la enzima PPXr de *M. sedula* se realizaron curvas de progreso a distintas concentraciones de sustrato con la enzima WT, las que se muestran en la figura 22.

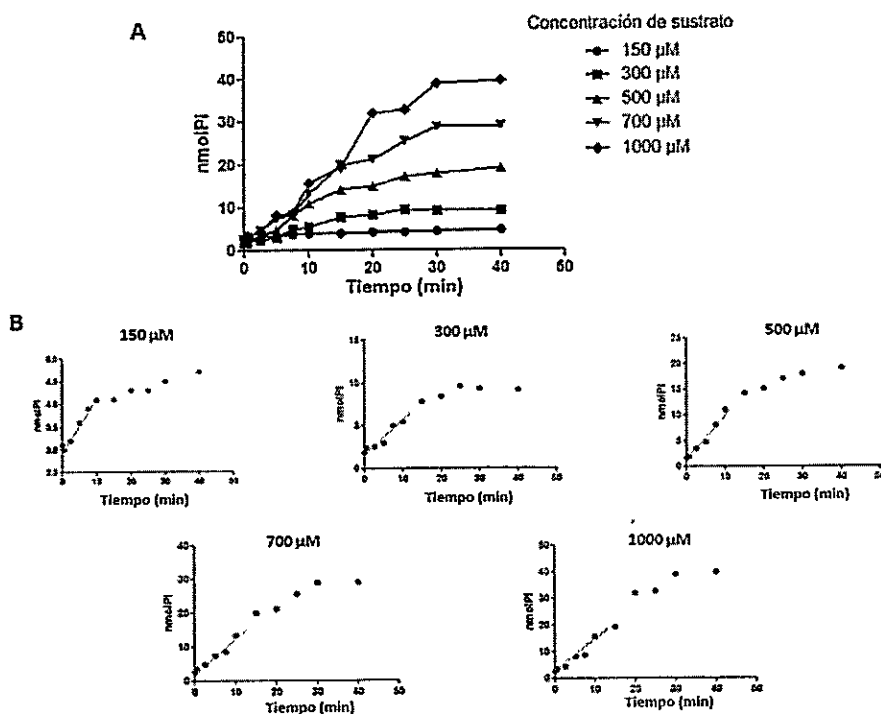


Figura 22. Curvas de progreso de la reacción enzimática de la PPXr de *M. sedula*. A) Curvas de progreso a todas las concentraciones de sustrato utilizadas. B) Se amplía la escala de cada una de las curvas de progreso en forma separada para visualizar detalles de los resultados.

Los gráficos de la figura 22 muestran el comportamiento de la enzima PPX a diferentes concentraciones de sustrato. Al realizar el análisis de las pendientes de los gráficos en el intervalo lineal de las curvas y graficarlas en función de las concentraciones utilizadas, éstas no se ajusta de buena manera a un comportamiento enzimático clásico de Michaelis-Menten sino que se ajustan a una curva sigmoidea, lo que se puede ver en la figura 23.

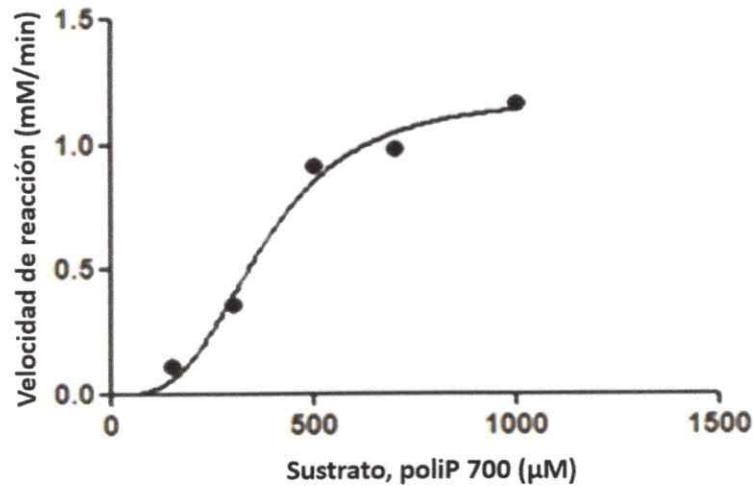


Figura 23. Comportamiento sigmoideo de la enzima PPXr de *M. sedula*. Curva cinética de la enzima PPXr de *M. sedula*, los datos necesarios para efectuar esta figura se tomaron de los resultados expuestos en la figura 21.

Para determinar si la PPX de *M. sedula* presenta inhibición por producto, como se ha descrito para la PPX de *E. coli* (Akiyama y col. 1993), se realizó ensayos de actividad de la PPXr de *M. sedula* en presencia de Pi. En la figura 24 se observa un efecto que sugiere la inhibición de la actividad enzimática por uno de los productos de la reacción (Pi).

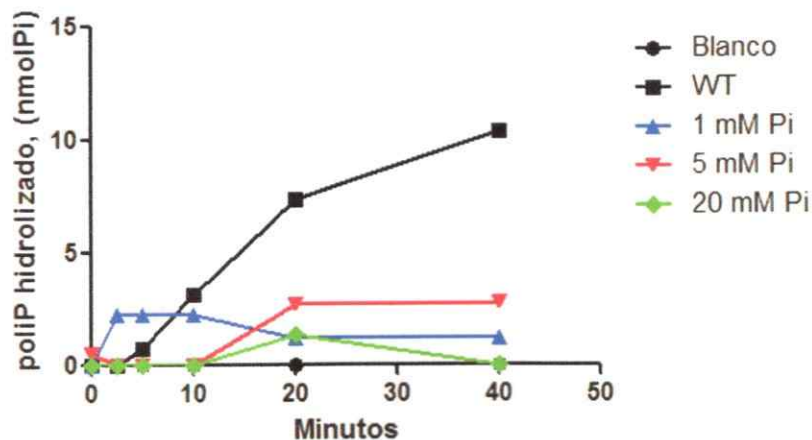


Figura 24. Efecto inhibitorio del Pi sobre la PPXr de *M. sedula*. El ensayo para determinar el efecto inhibitorio del Pi sobre la PPXr de *M. sedula* se realizó como se indica en la sección 4.5.2 con la diferencia que se agregó una concentración conocida de Pi al inicio de la reacción.

5.5 Objetivo Específico 5

Ubicación subcelular de la enzima PPX de *M. sedula*

Previo a los ensayos de inmunomicroscopía fue necesario purificar 3 mg de PPXr para sintetizar los anticuerpos anti PPX. El método de purificación fue el mencionado anteriormente y la producción de los anticuerpos policlonales se realizó por la empresa Bios Chile S.A. En la figura 25 se muestran los Western blots realizados con la enzima pura y los anticuerpos preparados. El anticuerpo reconoce específicamente a la enzima a diferentes diluciones.

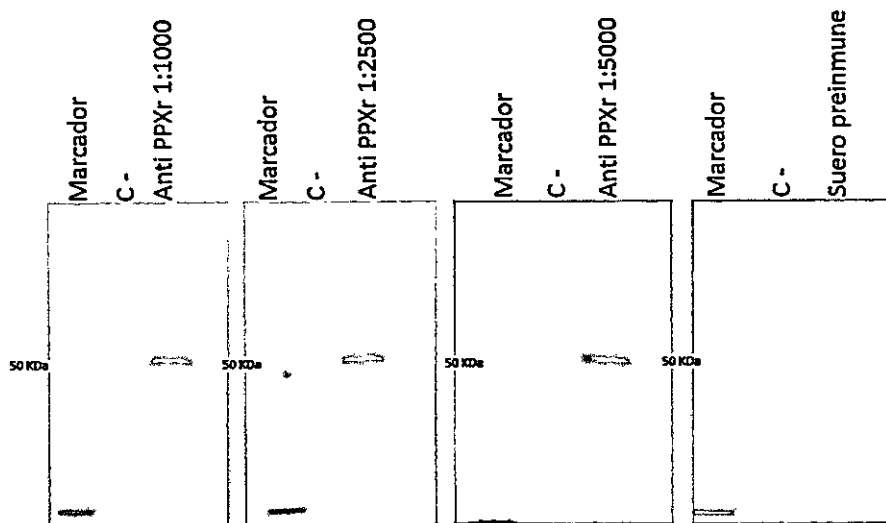


Figura 25. Reacción del anticuerpo Anti PPXr con PPXr purificada por Western blot. Se utilizó la misma cantidad de proteína en todos los carriles (aproximadamente 10 µg totales). Una vez realizada la transferencia y el bloqueo de las membranas, se agregó el anticuerpo primario en las diluciones indicadas para cada gel. Posteriormente se lavó la membrana y se incubó con el anticuerpo secundario asociado a la peroxidasa en una dilución de 1:5000. C-: extracto celular de *A. ferrooxidans*.

En la figura 25 se aprecia la efectividad del anticuerpo sintetizado contra la PPXr de *M. sedula* empleando diferentes concentraciones de anticuerpo. Además se observa la especificidad de este anticuerpo ya que no reacciona con el control negativo (extracto celular de *A. ferrooxidans*).

Para determinar la ubicación subcelular de la PPX de *M. sedula* se efectuó inmuno microscopía electrónica. La figura 26 muestra algunas microfotografías de células control no expuestas a cobre (figura 26A) y células adaptadas a 16 mM de CuSO₄ (figura 26B). Además se muestra en C un control de *E. coli* sobreexpresando la PPXr en un ensayo en ausencia y en presencia del anticuerpo anti PPX. Este último control comprueba que la posición de las esferas de oro corresponden a la colocalización debida a la interacción entre el anticuerpo anti PPX y el anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a esferas de oro. Según lo que se aprecia en la figura, las esferas de oro en las células de *M. sedula* no parecen tener una ubicación definida. Además, al comparar las células no tratadas con cobre con las expuestas al metal, no se observa un cambio en la localización de las esferas de oro.

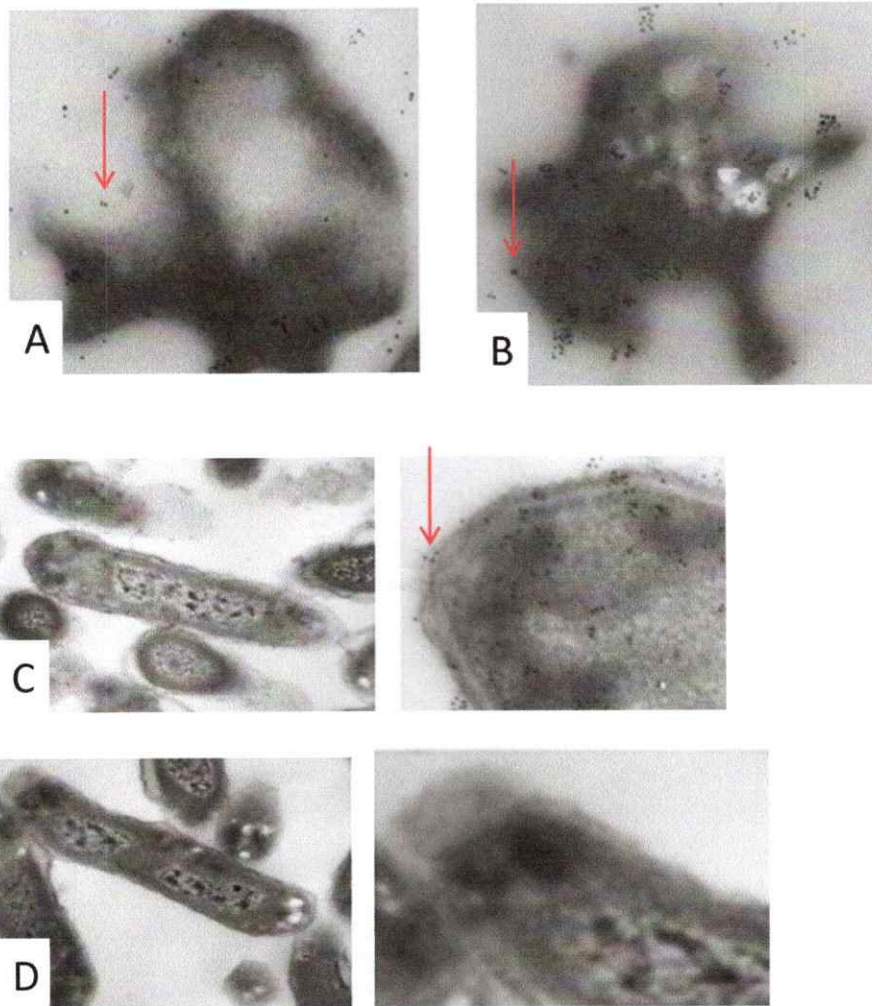


Figura 26. Localización subcelular de la PPX de *M. sedula*. A) *M. sedula* no expuesta a cobre. B) *M. sedula* expuesta a 16 mM de cobre. C) *E. coli* sobreexpresando la PPXr. D) *E. coli* sobreexpresando la PPXr a sin anticuerpo anti PPX. Las flechas indican algunos de los gránulos de oro visualizados.

5.6 Objetivo Específico 6

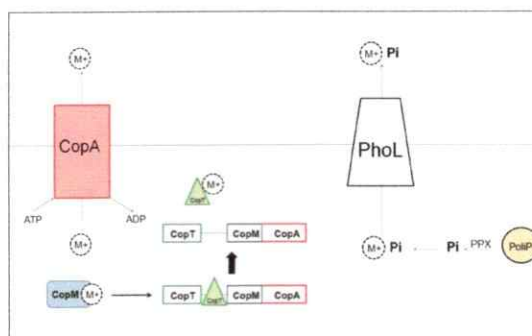
Análisis de la expresión transcripcional de probables determinantes de resistencia a cobre por qRT-PCR

Se analizó los genes indicados en la Tabla 2 por qRT-PCR. Estos genes se escogieron por su eventual implicancia en la resistencia a metales en este microorganismo. Junto con la tabla se entrega un esquema de los genes en su contexto celular.

Tabla 2. Genes de *M. sedula* analizados mediante la técnica de qRT-PCR.

Nombre del gen	Proteína que codifica	Descripción de la proteína
Msed_1512	ortólogo a pho84*	Transportador general de sustrato
Msed_1094	ortólogo a pho84*	Facilitador de transporte principal
Msed_0866	ortólogo a pho84*	Transportador general de sustrato
Msed_0846	ortólogo a pho84*	Transportador general de sustrato
Msed_0981	PPX	Exopolifosfatasa
Msed_0490	Cop A	ATPasa tipo P
Msed_0491	Cop M	Proteína de unión a metal
Msed_0492	Cop T	Regulador transcripcional

* Según Auernik y col. (2008).



A continuación se presenta una descripción un poco más amplia de las proteínas descritas en la Tabla 2.

Posibles proteínas ortólogas a Pho84.

Msed_1512, su análisis mediante un BLAST de proteínas indica que posee un dominio MFS (The Major Facilitator Superfamily). Este dominio corresponde a un gran grupo de transportadores secundarios. Además posee similitud con el sistema de simporter protón fosfato. Msed_1094 anotado como “major facilitator transporter” y la proteína que codifica pertenece a la familia MFS (Major Facilitator Superfamily). Msed_0866: gen anotado como transportador general de sustrato codifica para una proteína de 458 amino ácidos. Un análisis mediante BLAST mostró la presencia de dominio MFS y su anotación corresponde a una proteína general de transporte de sustrato. Msed_0846 también es un gen anotado como un transportador general de sustrato y la proteína que codifica está anotada como proteína general de transporte de sustrato que posee un dominio MFS.

Componentes del sistema Cop en *M. sedula*.

Msed_0490 (Cop A), su producto génico está descrito como una ATPasa tipo P translocadora de metales (Maezato y col. 2012). Msed_0491 (Cop M) codifica una proteína de 55 aminoácidos y tiene un dominio YHS. Este dominio posee aproximadamente 50 aminoácidos y usualmente posee dos cisteínas que probablemente sean funcionalmente necesarias. El dominio se encuentra en ATPasas transportadoras de cobre, algunas fenol hidrolasas y en un grupo de proteínas de membrana no caracterizadas. Este dominio se denomina YHS debido a la presencia altamente conservada de estos tres aminoácidos en su secuencia. Probablemente corresponda a un sitio de unión a metales, posiblemente cobre. Este dominio se encuentra duplicado en algunas ATPasas de cobre. Msed_0492 (Cop T) es un gen anotado como de la familia AsnC de reguladores transcripcionales. Esta subfamilia de represores transcripcionales

corresponden a proteínas en cuya estructura poseen un dominio “helix-turn-helix” y al parecer tienen la capacidad de disociarse del DNA en presencia de iones metálicos.

Los ensayos de qRT-PCR se efectuaron de dos maneras diferentes. Los primeros, se centraron en determinar la presencia del transcrito de los genes mencionados en la Tabla 2 en distintos puntos de la curva de crecimiento de *M. sedula* en cultivos adaptados a CuSO_4 16 mM y en cultivos crecidos en CuSO_4 8 mM no adaptados al metal. Además se realizaron mediciones en cultivos sometidos a un “shock” de 8 mM de CuSO_4 en la etapa exponencial tardía del ciclo celular (para una mejor comprensión de los cultivos utilizados véase la sección 4.1.4).

La figura 27 muestra los niveles de expresión de los RNAm de los cuatro genes tipo *Pho84*. Se compara entre células adaptadas y no adaptadas a Cu. Se puede ver que la expresión de los mensajeros varía de acuerdo a la fase de crecimiento de las células y además la adaptación a Cu también es un factor que afecta la expresión del mensajero.

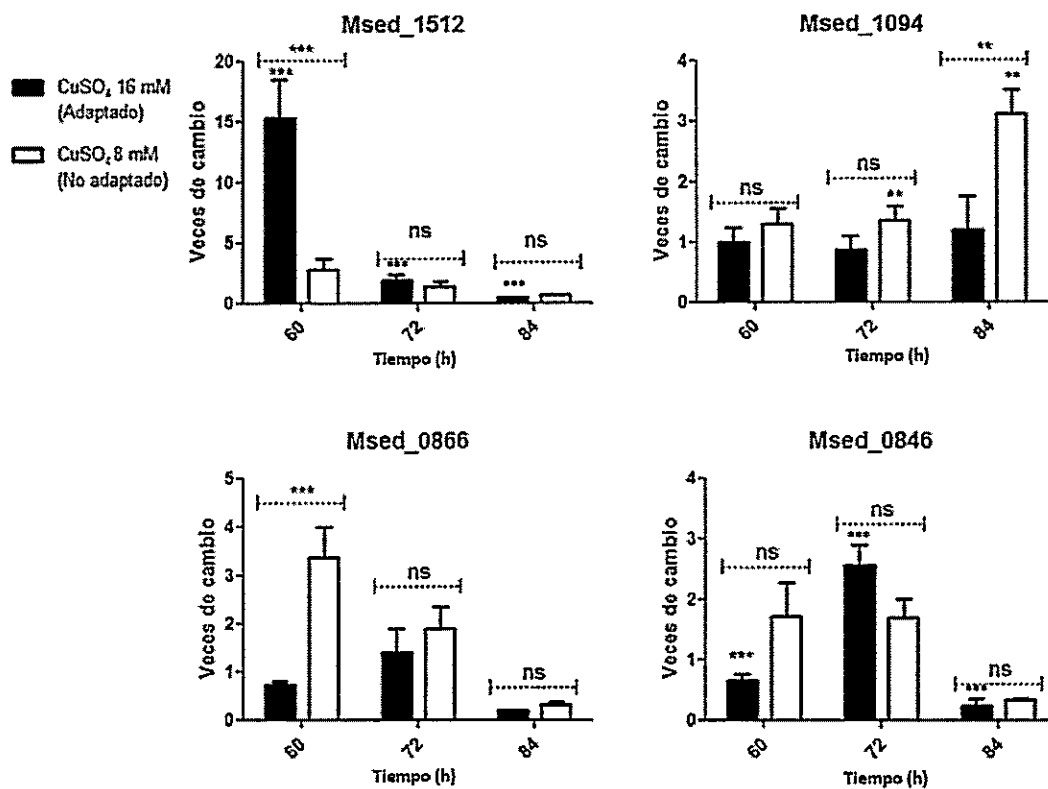


Figura 27. Expresión cuantitativa de los transcritos de los genes ortólogos a *Pho84* de *M. sedula*. La cuantificación de los mRNAs correspondientes se realizó según lo descrito en materiales y métodos. Las extracciones de RNA totales para la posterior generación de los cDNAs se hizo en los distintos tiempos de la curva de crecimiento indicados en la figura. El análisis estadístico se hizo entre grupos de células (adaptadas y no adaptadas) y entre tiempos (miembros de un mismo grupo). En donde: ** = $P < 0,005$, *** = $P < 0,0001$ y ns = No significativo. Las barras individuales que no poseen asteriscos implican que no hay diferencia significativa entre ellas.

Dada la variabilidad del comportamiento de los cuatro transcritos, el análisis de sus niveles diferentes tipos de cultivo y en diferentes etapas de la curva de crecimiento no resulta sencillo. Lo primero que resulta evidente es la importancia de determinar el momento de la curva de crecimiento en el que se realiza este tipo de medición ya que para el caso de un mismo gen los niveles de transcrito son diferentes a lo largo de la curva de crecimiento.

En la figura 28 se muestra el análisis por qRT-PCR de los transcritos del gen que codifica a la enzima PPX en *M. sedula*.

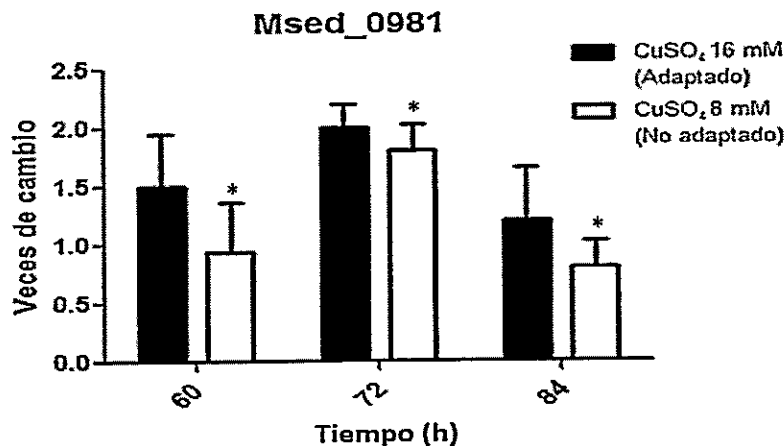


Figura 28. Expresión cuantitativa de los transcritos del gen que codifica la PPX de *M. sedula*. Los ensayos se realizaron del mismo modo como se explica en la figura 27. El análisis estadístico de los datos indicó que no existe diferencia significativa entre los datos comparados entre las distintas condiciones. * = $P < 0,01$.

La figura 28 muestra que existe un aumento en la expresión del mRNA de la PPX en la fase exponencial de crecimiento la que vuelve a disminuir en la fase exponencial tardía. Este comportamiento se mantiene para los cultivos de células adaptadas a Cu, pero con una magnitud de expresión un poco mayor en relación a la de las células no adaptadas. Según el análisis estadístico, al comparar las células adaptadas con las no adaptadas, no se observan cambios significativos en la presencia de este transcrito. Esto puede hacer pensar en la expresión constante y similar de este transcrito bajo estas dos condiciones. En la figura 29 se pueden ver los resultados de los niveles de transcripción de los transcritos de los genes que componen el operón *cop* mediante qRT-PCR (Maezato et al. 2012).

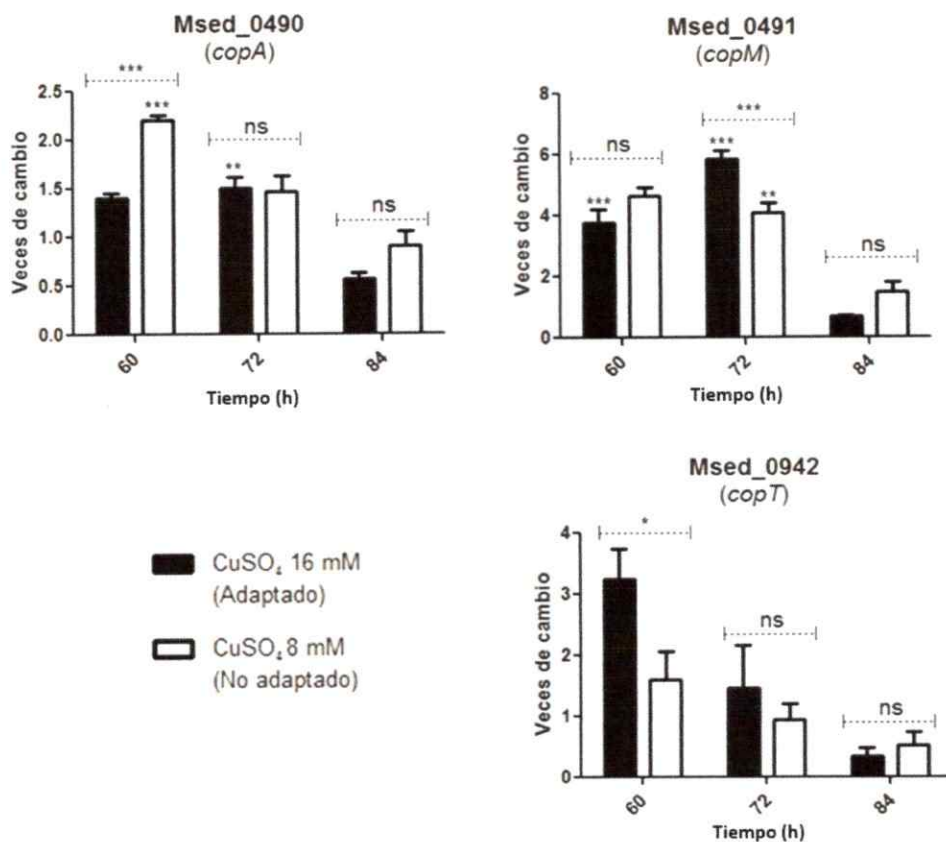


Figura 29. Expresión cuantitativa de los transcritos de los genes que conforman el operón *cop* de *M. sedula*. Los ensayos se realizaron del mismo modo que en la figura 26. El análisis estadístico se hizo de igual manera que en la figura 26 en donde: * = $P < 0,01$ ** = $P < 0,001$, *** = $P < 0,0001$ y ns = No significativo.

Los niveles de los transcritos que forman este operón muestran variaciones de expresión similares en el tiempo del ensayo. Los transcritos que se cotranscriben presentan un aumento en las células no adaptadas a cobre, el que luego disminuye hasta llegar a la fase exponencial tardía. Las células adaptadas a cobre presentan un leve aumento en la fase exponencial para luego volver a disminuir en la fase exponencial tardía. Por su parte, el transcrito del gen *copT* (Msed_0492) disminuye hacia la fase exponencial.

Adicionalmente se estudió la expresión de los genes en condición de “shock” de cobre. La figura 30 muestra los cambios en los niveles de expresión de los genes ortólogos a *pho84*.

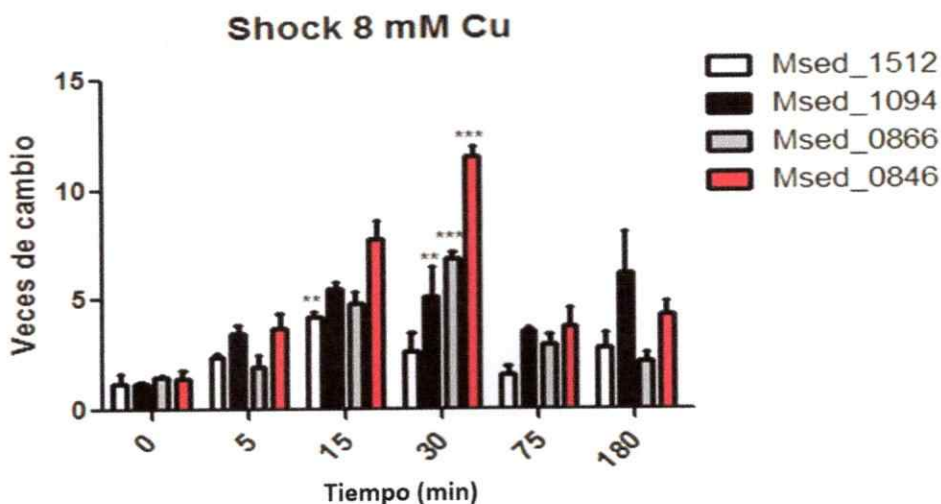


Figura 30. Expresión cuantitativa de los transcritos de los genes ortólogos a *pho84* en *M. sedula* en condiciones de “shock” de cobre. El experimento consistió en la extracción de RNA total de las células a distintos tiempos luego de un “shock” de 8 mM de CuSO₄ en la fase exponencial tardía del ciclo de crecimiento. El análisis estadístico de la varianza (ANOVA) de los datos en su globalidad arrojó un valor de $P < 0,0001$. Una vez analizado los datos de forma global se analizó el valor menor de las veces de cambio de cada gen (tiempo cero) v/s el valor máximo alcanzado, según estos resultados: ** = $P < 0,005$ y *** = $P < 0,0001$.

En la figura 30 se observan claramente un aumento en los transcritos a medida que pasa el tiempo después del “shock”. Este aumento alcanza su máximo a la media hora y luego comienza a declinar.

La figura 31 muestra la evolución de la expresión de los transcritos del gen que codifica para la enzima PPX de *M. sedula*. Al igual que en el caso anterior, se puede observar un aumento de los transcritos para este gen hasta la media hora después del shock, aunque es importante destacar que la magnitud de aumento es menor a la observada en los casos anteriores.

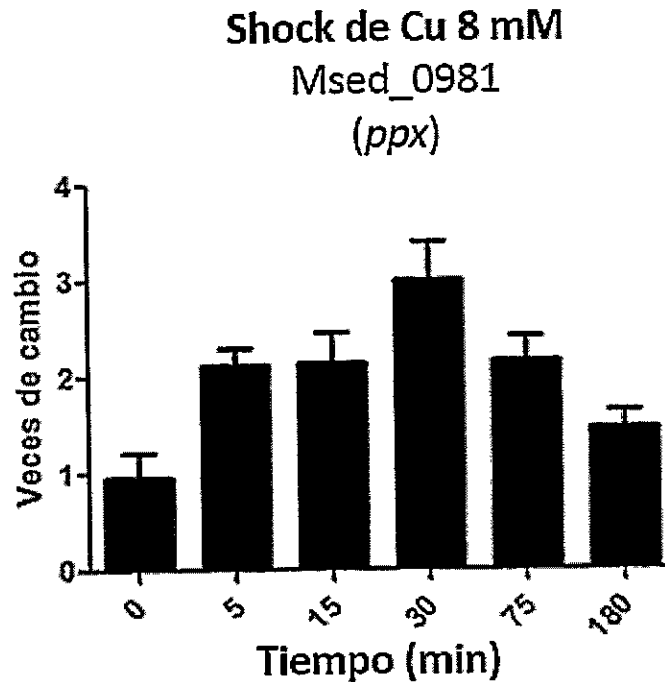


Figura 31. Expresión cuantitativa del transcrito del gen que codifica la PPX en *M. sedula* en condiciones de “shock”. Los ensayos se realizaron de la misma manera que en la figura 29. El análisis estadístico de varianza (ANOVA) realizado para el conjunto de datos arrojó un $P < 0,005$.

Finalmente, la figura 32 muestra la cuantificación de los transcritos de los genes pertenecientes al operón *cop* de *M. sedula*. Los niveles de expresión de estos genes cambian en el tiempo en forma similar a la de los otros genes estudiados en condiciones de “shock” (Fig. 30 y 31), excepto para el transcrito perteneciente al represor transcripcional *copT*, cuyos niveles se mantienen prácticamente constantes luego del “shock”. Esto indicaría que posterior al “shock” este transcrito permanece constante por lo que la cantidad de proteína que se podría generar a partir de la síntesis *de novo* de este mRNA sería nula. Esta situación ayudaría a tener menos represor en el sistema, lo que permitiría la expresión de los genes *copA* y *copM*.

Shock de Cu 8 mM

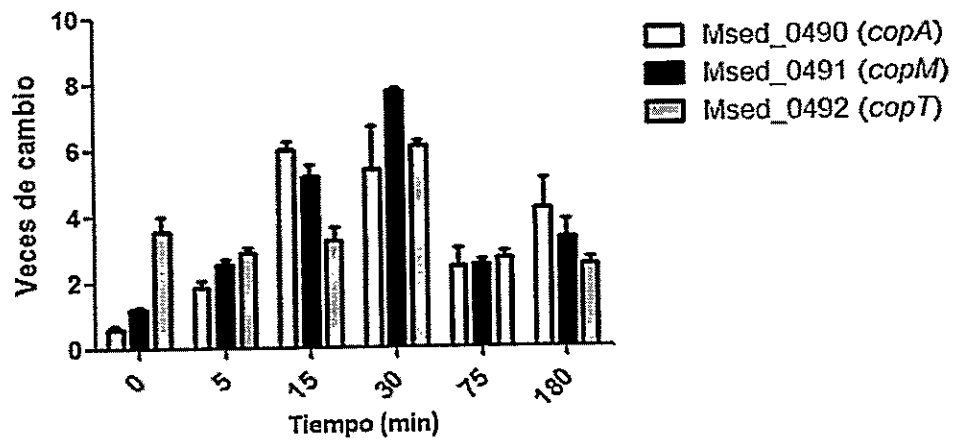


Figura 32. Expresión cuantitativa del transcrito de los genes pertenecientes al operón Cop de *M. sedula* en condiciones de “shock” de cobre. Los ensayos se realizaron de la misma manera que en la figura 30. El análisis estadístico de varianza (ANOVA) realizado para el conjunto de datos arrojó un $P < 0,0001$.

5.7 Objetivo Específico 7

Análisis cuantitativo de la expresión de proteínas en condiciones de ausencia y presencia de cobre en *M. sedula*

Este objetivo se llevó a cabo con proteómica cuantitativa, utilizando la técnica de iTRAQ, con proteínas de un extracto de células de *M. sedula* control y adaptadas a 16 mM de cobre.

La Tabla 3 muestra los números de proteínas que aumentan o disminuyen y la categoría funcional a la que pertenece cada una de ellas.

Tabla 3. Proteínas de *M. sedula* que varían significativamente sus niveles en presencia de cobre.

FUNCTIONAL CATEGORY	Total proteins	Up regulated proteins	Down regulated proteins
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING	13	7	6
Translation; ribosomal structure and biogenesis	6	2	4
RNA processing and modification	-	-	-
Transcription	3	2	1
Replication; recombination and repair	3	3	-
Chromatin structure and dynamics	1	-	1
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING	6	4	2
Cell cycle control; cell division; chromosome partitioning	-	-	-
Nuclear structure	-	-	-
Defense mechanisms	2	1	1
Signal transduction mechanisms	1	-	1
Cell wall/membrane/envelope biogenesis	-	-	-
Cell motility	-	-	-
Cytoskeleton	-	-	-
Extracellular structures	-	-	-
Intracellular trafficking; secretion; and vesicular transport	-	-	-
Posttranslational modification; protein turnover; chaperones	3	3	-
METABOLISM	27	12	15
Energy production and conversion	7	4	3
Carbohydrate transport and metabolism	2	1	1
Amino acid transport and metabolism	7	3	4
Nucleotide transport and metabolism	4	2	2
Coenzyme transport and metabolism	2	1	1
Lipid transport and metabolism	3	-	3
Inorganic ion transport and metabolism	2	1	1
Secondary metabolites biosynthesis; transport and catabolism	-	-	-
POORLY CHARACTERIZED	15	10	5
General function prediction only	3	2	1
Function unknown	11	8	3
Not predicted	1	-	1
TOTAL	61	33	28

El análisis se realizó mediante proteómica cuantitativa utilizando la técnica de iTRAQ.

La figura 33 muestra un resumen los datos de la Tabla 3 en forma de gráfico. Sesenta y una proteínas variaron significativamente su “expresión” en células adaptadas a 16 mM de cobre.

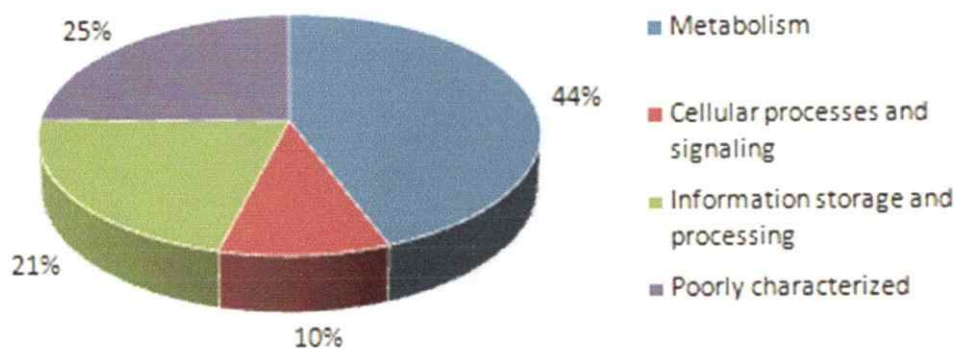


Figura 33. Categorías funcionales de las proteínas que varían significativamente en células de *M. sedula* adaptadas a Cu 16 mM. Resumen gráfico de los datos de la Tabla 3.

En la Tabla 4 se muestra la categorización de cada una de las proteínas que aumenta su “expresión” además del nivel de aumento que tienen relativo al control en ausencia de metal. Y la tabla 5 muestra las proteínas que disminuyen su “expresión” en células adaptadas a cobre, además las ordena por categoría funcional y dentro de este orden están ordenadas desde mayor nivel de cambio a menor nivel de cambio.

Tabla 4. Proteínas que aumentan su nivel en células adaptadas a cobre.

Accession number	Gen code	Function/similarity	Score	Coverage (%)	Peptide number	Fold change (16mM Cu/0mM Cu)
METABOLISM						
Inorganic ion transport and metabolism						
A4YG19	Msed_1210	Rhodanese domain protein	356,33	31,03	12	7,39
Amino acid transport and metabolism						
A4YFD1	Msed_0962	Phosphoadenylylsulfate reductase (Thioredoxin)	55,33	7,00	1	8,26
A4YIG2	Msed_2074	Glutamate dehydrogenase	1494,00	58,33	37	3,24
A4YF02	Msed_0829	3-Isopropionylate dehydratase small subunit	78,00	15,13	3	2,65
Carbohydrate transport and metabolism						
A4YIX4	Msed_2238	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	117,00	7,53	3	3,21
Nucleotide transport and metabolism						
A4YHG9	Msed_1716	Ribonucleoside-diphosphate reductase	970,00	34,17	26	3,54
A4YEP9	Msed_0726	Histidine triad (HIT) protein	18,00	5,50	1	2,62
Energy production and conversion						
A4YIAD	Msed_2012	NADH dehydrogenase subunit B	37,00	7,60	1	12,05
A4YHY4	Msed_1896	NADH dehydrogenase subunit C	102,67	12,30	3	3,01
A4YHY7	Msed_1899	NADH-quinone oxidoreductase, chain I	16,00	5,90	1	2,85
A4YDH1	Msed_0296	Ruberythrin	899,33	77,83	26	2,28
Coenzyme transport and metabolism						
A4YCM9	Msed_0004	Nicotinamide-nucleotide adenyltransferase	53,33	6,50	2	2,99
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING						
Posttranslational modification; protein turnover; chaperones						
A4YEW0	Msed_0787	Putative uncharacterized protein Thioredox_DsbM (PF03190)	53,33	2,03	1	6,59
A4YD28	Msed_0153	Glutaredoxin-like domain protein	398,33	35,20	8	4,07
A4YEG3	Msed_0640	Heat shock protein Hsp20	280,00	42,93	9	2,34
Defense mechanisms						
A4YHA1	Msed_1648	Putative uncharacterized protein	35,00	14,33	1	4,91
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING						
Translation; ribosomal structure and biogenesis						
A4YI25	Msed_2290	Putative uncharacterized protein	126,33	35,10	3	3,40
A4YCV1	Msed_0076	Exosome complex component Rrp4	528,00	46,83	13	2,27
Replication; recombination and repair						
A4YEJ2	Msed_0669	Nucleic acid binding, OB-fold, tRNA/helicase-type	252,33	48,53	7	4,28
A4YIP0	Msed_2153	DNA primase DnaG	97,67	6,50	2	3,29
A4YET3	Msed_0760	Putative uncharacterized protein (HerA Helicase)	101,33	5,77	2	2,30
Transcription						
A4YI43	Msed_1955	DNA-directed RNA polymerase, subunit M	80,33	22,77	2	4,10
A4YE88	Msed_0565	Transcriptional regulator, PadR family	62,50	6,50	2	2,16
POORLY CHARACTERIZED						
General function prediction only						
A4YHB4	Msed_1661	Putative uncharacterized protein (Pac2)	26,00	5,50	1	2,50
A4YID9	Msed_2051	Putative uncharacterized protein (Phospholipid-binding protein, PBP family)	249,00	38,67	7	2,40
Function unknown						
A4YE80	Msed_0557	Putative uncharacterized protein	21,00	5,10	1	6,05
A4YEA1	Msed_0578	Putative uncharacterized protein	299,00	68,93	9	3,99
A4YJ4	Msed_1489	Putative uncharacterized protein (zinc-ribbon domain)	46,33	6,90	1	3,91
A4YHM0	Msed_1767	Putative uncharacterized protein	372,33	17,40	9	3,10
A4YE6	Msed_0663	Putative uncharacterized protein	60,00	7,10	2	2,81
A4YCT5	Msed_0060	Putative uncharacterized protein	450,33	24,33	11	2,44
A4YDV4	Msed_0429	Putative uncharacterized protein (Dominio DUF3834)	740,67	70,10	22	2,36
A4YDX5	Msed_0450	Putative uncharacterized protein (DnsE)	604,00	70,33	15	2,17

Tabla 5. Proteínas que disminuyen su nivel en células adaptadas a cobre.

Accession number	Gen code	Function/similarity	Score	Coverage (%)	Peptide number	Fold change (15mM Cu/0mM Cu)
METABOLISM						
Inorganic ion transport and metabolism						
A4YEY1	Msed_0808	TriA-N domain protein	41,00	4,80	1	0,22
Amino acid transport and metabolism						
A4YF44	Msed_0874	Arginine deiminase	47,00	4,00	1	0,15
A4YD45	Msed_0170	N1-acetyl-L-lysine deacetylase	30,00	7,50	1	0,27
A4YHD9	Msed_1686	Anthranilate synthase, component II (Glutamine amidotransferase)	16,00	12,40	1	0,42
A4YEE6	Msed_0623	7-Isopropylmalate synthase	28,00	5,80	1	0,44
Carbohydrate transport and metabolism						
A4YG93	Msed_1286	Trehalose ABC transporter ATP-binding protein	30,00	6,50	1	0,30
Nucleotide transport and metabolism						
A4YI67	Msed_1979	Phosphoribosylformylglycinamide synthase 1	130,67	13,67	2	0,44
A4YI66	Msed_1978	Phosphoribosylformylglycinamide synthase, pur5	18,50	16,70	1	0,46
Energy production and conversion						
A4YE10	Msed_0485	Cytochrome c oxidase, subunit I	62,67	4,00	2	0,40
A4YGP2	Msed_1437	4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein	33,00	6,80	1	0,44
A4YGL0	Msed_1201	Pyruvate ferredoxin/flavodoxin oxidoreductase, delta subunit	38,67	2,80	1	0,46
Coenzyme transport and metabolism						
A4YEF4	Msed_0631	Dihydropterate synthase-related protein	53,00	3,20	1	0,47
Lipid transport and metabolism						
A4YG98	Msed_1291	AMP-dependent synthetase and ligase	18,00	4,40	1	0,35
A4YDE7	Msed_0272	Acyl-CoA dehydrogenase domain protein	324,33	29,00	9	0,38
A4YEG1	Msed_0638	Methylmalonyl-CoA mutase	69,67	4,23	2	0,39
CELLULAR PROCESSES AND SIGNALING						
Defense mechanisms						
A4YFW2	Msed_1153	Putative uncharacterized protein (CRISPR associated protein, COG1517 family)	259,67	40,13	7	0,46
Signal transduction mechanisms						
A4YGUS	Msed_1490	FHA domain containing protein	27,00	9,60	1	0,46
INFORMATION STORAGE AND PROCESSING						
Translation; ribosomal structure and biogenesis						
A4YIY3	Msed_2247	30S ribosomal protein S15	15,00	5,90	1	0,37
A4YCU4	Msed_0069	Putative uncharacterized protein (50S ribosome-binding GTPase)	38,00	5,30	1	0,39
A4YCC2	Msed_0117	15S ribosomal protein L34E	152,33	46,33	6	0,48
A4YHH4	Msed_1721	50S ribosomal protein S30E	26,33	18,73	1	0,48
Transcription						
A4YGS3	Msed_1468	Transcriptional regulator, AbrB family	209,33	82,40	6	0,40
Chromatin structure and dynamics						
A4YHLS	Msed_1762	Chromatin protein Cren7	31,00	33,90	2	0,33
POORLY CHARACTERIZED						
General function prediction only						
A4YE11	Msed_0486	Putative signal transduction protein with CBS domains	210,00	24,80	5	0,47
Function unknown						
A4YEX7	Msed_0804	Pyrrrolo-quinoline quinone	21,50	1,50	1	0,16
A4YH74	Msed_1621	Putative uncharacterized protein	26,00	2,40	1	0,25
A4YGL9	Msed_1413	Putative uncharacterized protein (DUF1955)	72,50	9,50	3	0,48
Not predicted						
A4YGX3	Msed_1519	Putative uncharacterized protein	31,00	23,80	1	0,41

El dato principal que arroja el análisis de las Tablas de los experimentos de proteómica cuantitativa, indica que las proteínas que al parecer tienen una mayor variación en condiciones de adaptación a cobre son aquellas que están involucradas en funciones metabólicas de la célula.

Para facilitar el estudio de las 61 proteínas que variaron de manera significativa se realizó un análisis de enriquecimiento, el que consiste en una validación, basada en el conocimiento biológico previo, de los resultados obtenidos por técnicas de agrupación de genes (Clustering y Biclustering) sobre bases de datos de expresión genética (Priness y col. 2007). Los análisis de enriquecimiento se realizaron utilizando el sistema disponible en: <http://david.abcc.ncifcrf.gov>.

El análisis de enriquecimiento realizado para las proteínas que aumentan su nivel de expresión dan indicios de que existe una activación de los procesos relacionados con la unión a metales y los procesos redox, la actividad oxidoreductasa que involucra NADH o NADPH y de fosforilación oxidativa. La Tabla 6 muestra un resumen de los resultados obtenidos en el análisis.

Tabla 6. Análisis de enriquecimiento para las proteínas que aumentan su nivel de manera significativa en un cultivo de *M. sedula* adaptado a cobre.

Puntuación de enriquecimiento: 1,36		
	Cuentas	Valor <i>p</i>
Actividad oxidoreductasa	3	2,5 x 10 ⁻²
Oxidoreducción	6	2,7 x 10 ⁻²
Fosforilación oxidativa	3	1,2 x 10 ⁻²
Puntuación de enriquecimiento: 1,27		
	Cuentas	Valor <i>p</i>
Unión a iones	6	5,1 x 10 ⁻²
Unión a cationes	6	5,1 x 10 ⁻²
Unión a iones metálicos	6	5,1 x 10 ⁻²
Unión a iones metalicos de transición	5	6,0 x 10 ⁻²

El mismo análisis se realizó para las proteínas que disminuyeron su expresión en células adaptadas a cobre. Los resultados obtenidos, se resumen en la Tabla 7. Los procesos biológicos relacionados con las proteínas que disminuyen su nivel son aquellos vinculados con la unión de distintos metales. Esto plantea una paradoja con lo visto en el análisis anterior, pero cabe destacar el hecho que el valor de enriquecimiento para esta muestra es de 0,7 y además los valores de *p*, son elevados, lo que indica que debido al bajo número de proteínas que disminuyen su nivel, no es posible diferenciar si esta

disminución, es a causa de la exposición a cobre o solamente corresponde a un eventual azar.

Tabla 7. Análisis de enriquecimiento para las proteínas que disminuyen su nivel de manera significativa en un cultivo de *M. sedula* adaptado a cobre.

Puntuación de enriquecimiento: 0,7	Cuentas	Valor <i>p</i>
Unión a metales de transición	5	$1,2 \times 10^{-1}$
Unión a ion hierro	3	$1,2 \times 10^{-1}$
Actividad transportadora de electrones	4	$2,1 \times 10^{-1}$
Unión a ion zinc	3	$2,3 \times 10^{-1}$
Unión a iones	5	$2,7 \times 10^{-1}$
Unión a cationes	5	$2,7 \times 10^{-1}$
Unión a metales	5	$2,7 \times 10^{-1}$

6. DISCUSIÓN

6.1 Análisis bioinformático

El alineamiento de las secuencias de las proteínas PPX de *M. sedula* y PPX de *S. solfataricus* versus la PPX de *E. coli* mostro un porcentaje de identidad de 19,6 % en ambos casos. Al comparar la enzima PPX de *M. sedula* contra la de *S. solfataricus* se observa que el porcentaje de identidad entre ambas secuencias es de 37,4 %. Este nivel de identidad hace prever que la funcionalidad de la PPX de *M. sedula* será similar a la descrita para la PPX de *S. solfataricus* (Cardona y col. 2002). El alineamiento de las secuencias de las PPX de *E. coli*, *M. sedula* y *S. solfataricus* mostró que los aminoácidos responsables de la catálisis, unión a Mg y los aminoácidos que forman un puente salino con el sitio catalítico en la PPX de *E. coli* (Rangarajan y col. 2006) se conservan en la secuencia de las PPX de *M. sedula* y *S. solfataricus*. La única salvedad en la conservación de estos sitios, es el hecho que el aminoácido Asp143 de *E. coli*, involucrado en la unión de Mg está sustituido por ácido glutámico (Glu), lo que no cambia el carácter ácido del residuo.

Las principales características de la estructura cristalográfica descrita para PPX de *E. coli* son que la enzima funcional está conformada por un dímero, el quel está costituido por dos monómeros que se componen de cuatro dominios. El sitio activo de la enzima está conformado por la interfase de los dominios I y II. Otra característica que se ve en la estructura de la PPX de *E. coli* es la presencia de un sitio rico en aminoácidos de carácter básico, los que en su mayoría se encuentran entre los dominios I y II y en menor medida en los dominios III y IV (Rangarajan y col. 2006). Estos residuos forman un “bolsillo básico” en el que se posicionaría el sustrato con una alta carga negativa (poliP). Llama la atención que los aminoácidos que forman el bolsillo básico en *E. coli* no se encuentran

conservados en las secuencias de las PPX de *M. sedula* y *S. solfataricus*. Al realizar el modelamiento de la PPX de *M. sedula* utilizando como molde la estructura de la PPX de *E. coli*, se observa que en la zona cercana al aminoácido catalítico (la interfase entre los dominios I y II) hay presencia de un grupo de aminoácidos de carácter básico que estarían formando el “bolsillo básico” donde se posicionaría el sustrato.

La estructura de la PPX de *M. sedula* mostró la ausencia del dominio IV, que posee similitud con algunas proteínas de “shock frío” de unión a RNA (Rangarajan y col. 2006), pero al que aún no se le ha otorgado una función específica en la PPX de *E. coli*. Este dominio no sería esencial para la actividad de la PPX ya que también está ausente en la PPX de *S. solfataricus* y su ausencia no supone una merma en la actividad de la enzima, como se determinó en el trabajo de Cardona y col. (2002).

6.2 Identificación y cuantificación de poliP

Para comprobar que los gránulos observados al interior de *M. sedula* (Orell y col. 2012) corresponden a gránulos ricos en fósforo, se observaron por microscopía electrónica de transmisión asociada a EDX (energía de dispersión de rayos X). Esta técnica se utiliza para el análisis elemental o caracterización química de una muestra. Se basa en una interacción de alguna fuente de excitación de rayos X y una muestra. La capacidad de esta técnica de detectar los elementos presentes en la muestra se debe al principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura atómica única que permite un conjunto único de picos en su espectro de emisión de rayos X (Goldstein y col. 2003). Para estimular la emisión de rayos X característicos del espécimen que se estudia, se centra un haz de alta energía de partículas cargadas, como electrones o protones. Un átomo, en reposo, dentro de la muestra se encuentra en estado fundamental (no excitado) con sus electrones en orbitales discretos de energía cercanos al núcleo. El haz incidente excita un electrón, el que aumenta su nivel de energía por lo que se transfiere a un orbital de mayor energía (generando un orbital de baja energía vacío). El orbital vacío es ocupado por un electrón de mayor energía, por lo que la diferencia de energía entre el orbital de mayor energía y el de menor energía es liberada en forma de rayos X. El número y energía de los rayos X emitidos desde una muestra se pueden medir mediante un espectrómetro de energía dispersiva. Como se mencionó anteriormente el patrón de picos de cada elemento es único, con lo que se puede establecer la composición elemental de la muestra (Goldstein y col. 2003).

Los resultados mostraron la presencia de un gránulo al interior de las células de *M. sedula*. Este gránulo al ser sometido al análisis de EDX, mostró un porcentaje de fósforo mayor al de los otros dos puntos analizados, tanto en el citoplasma como el exterior de la célula. El punto analizado al exterior de la célula mostró un porcentaje de fósforo mayor que el

analizado en el citoplasma celular, lo que puede deberse a que la muestra se lava varias veces en un tampón rico en fosfato, el cual al secarse, probablemente acumula las sales presentes en el tampón y las concentra al exterior de la célula. En conjunto, estos datos indican que el gránulo denso al paso de los electrones observado en *M. sedula* corresponde a un gránulo de alto contenido de fósforo, por lo que se sugiere que este podría estar formado en su mayor parte por polifosfatos.

La cuantificación de los poliP intracelulares mostró que la cantidad máxima de poliP intracelular se alcanza en la fase exponencial tardía, similar a lo observado en *A. ferroxidans* (Álvarez y Jerez 2004). El rango en el que fluctúan los niveles de poliP en *M. sedula* es entre 100 y 400 nmoles de Pi / mg de proteína.

Al vincular la presencia de gránulos de poliP con la resistencia a metales, en la teoría propuesta por Keasling (1997), se ha sugerido una aparente correlación entre la cantidad de poliP y la eventual resistencia a metales que pueda tener un microorganismo. Para comprobar que hay una mayor resistencia a metales cuando se tiene mayor cantidad de poliP intracelular, se necesitaría poder modificar los niveles de poliP intracelular de este microorganismo. Lamentablemente no se dispone de un sistema en *M. sedula* para montar los genes implicados en la síntesis de poliP. Por otro lado, la comparación de la resistencia a cobre de *M. sedula* con otros miembros similares, incluso de su propio género, como *S. solfataricus*, no pueden hacerse directamente, ya que las condiciones de cultivo de los microorganismos no son las mismas y además los poliP poseen diferentes funciones en las células (Kornberg y col. 1999). En este ámbito, experimentalmente en nuestro laboratorio se ha observado que una cepa de *E. coli* que carece del regulador PhoU (Morohoshi y col. 2002), por lo que acumula poliP en forma de gránulos, aumenta su resistencia a cobre en comparación a la cepa silvestre, elevando su MIC de cobre de 3

mM a aproximadamente 9 mM (no publicado). Esto reafirma la idea que los poliP son importantes en la resistencia de los microorganismos a los metales.

6.3 PoliP en presencia de cobre

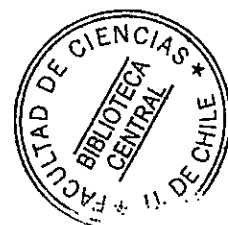
Los resultados indican que cuando *M. sedula* se expone a cobre las células no adaptadas poseen niveles de poliP similares a las células control. Se observa además que los niveles de poliP sólo disminuyen hacia el final de la fase de crecimiento. En cambio células adaptadas a cobre poseen alrededor de un 20% del poliP presente en las células control a lo largo de toda la etapa de crecimiento. Este tipo de comportamiento reafirma lo observado anteriormente para otras células (Álvarez y Jerez 2004; Remonsellez y col; 2006; Grillo-Puertas y col. 2014) y sugiere que células expuestas a cobre recurren a la degradación de sus poliP intracelulares en respuesta a la presencia del metal en el medio. Las células no adaptadas posiblemente degradan una pequeña porción de poliP para resistir a la presencia no letal de cobre en el medio. Posiblemente la menor cantidad de cobre en el medio de células no adaptadas cause la degradación de una porción de los poliP intracelulares, mientras se expresan otros sistemas de resistencia al metal, y una vez que estos sistemas de resistencia han sido expresados, la degradación de poliP es suprimida manteniéndose un nivel de poliP menor al del control, pero mayor al de las células adaptadas.

El hecho que las células adaptadas al metal presenten un nivel de poliP bajo durante toda la curva de crecimiento quizás se deba a que éstas sintetizan y degradan poliP a una misma velocidad. Esto posiblemente se deba a la necesidad de energía extra, ya que como se ha descrito, el poliP en algunas ocasiones puede ser utilizado como sustrato para la síntesis de ATP (Haeusler y col. 1992). Por otro lado, la célula puede estar utilizando el Pi degradado desde el poliP para unirse al metal y ser expulsado a través de los

transportadores de fosfato ya que como se ha demostrado anteriormente los transportadores de Pi poseen una vital trascendencia en el transporte de metales en la célula (Keasling 1997; Elias y col. 2012). Además, como en estas condiciones las células están en su máximo nivel de resistencia a cobre, es posible que tengan operando a máxima capacidad todos sus sistemas de resistencia a metal, por lo que la utilización de poliP como elemento de resistencia a metal no puede ser suprimida, sino que se necesita de manera constante. Esto provocaría que las células en esta condición de adaptación a cobre no acumulen poliP y presenten un nivel bajo de poliP durante la curva de crecimiento.

Para determinar que sucede con los poliP de *M. sedula* inmediatamente después que la célula es expuesta a cobre, se realizaron experimentos de “shock de cobre”. En estas condiciones, los poliP no varían en el control sin metal y en presencia de cobre se observa que la concentración intracelular de poliP disminuye luego de 15 min después del shock alcanzando un mínimo que luego se mantiene en el tiempo. Este resultado indica que la célula degrada los poliP en respuesta a una exposición repentina de cobre, como se había descrito con anterioridad (Álvarez y Jerez 2004; Remonsellez y col. 2006; Grillo-Puertas y col. 2014), reafirmando la idea que para *M. sedula* esta respuesta corresponde a una de las primeras barreras que posee en su defensa contra el aumento repentino de cobre en el medio.

Otro hecho que llama la atención de este resultado es que, si bien la célula es capaz de degradar los poliP en presencia de cobre, ésta degradación no es total, ya que se llega a un nivel determinado de poliP. Es posible que este comportamiento se deba a que los poliP tienen otras funciones en la célula. En este sentido, recientemente se ha descrito una importante función de los poliP como chaperonas inorgánicas de proteínas, que las protegen de su oxidación y agregación en las células sometidas a estrés (Azevedo y col.



2015). Es muy probable entonces que la degradación de los poliP, mediada por la PPX, esté sujeta a sistemas de regulación para sus diferentes funciones celulares.

6.4 Actividad de la enzima PPXr de *M. sedula*

Para caracterizar la PPX de *M. sedula* (Msed_0981), se clonó y expresó el gen PPX silvestre y mutantes sitiodirigidos.

La temperatura óptima de funcionamiento de la enzima fue de 65 °C. Esta temperatura está dentro del rango en que crecen las células de *M. sedula*, (60 °C - 75 °C) (Huber y col. 1989). Anteriormente se describió la actividad PPX de *Sulfolobus solfataricus*, un microorganismo similar a *M. sedula* respecto a su temperatura de crecimiento. La temperatura óptima para la PPX de *S. solfataricus* fue de 55 °C (Cardona y col. 2002). Esta diferencia en las temperaturas óptimas de reacción para dos enzimas muy similares se puede deber principalmente a que cuando las enzimas de termófilos se expresan de manera heteróloga y luego pasan por un proceso de purificación, probablemente van perdiendo ciertas características que poseían, principalmente interacciones de carácter débil como puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas, lo que causa que las temperaturas de reacción *in vitro* a las que las enzimas recombinantes son activas, difieran de la temperatura de crecimiento del microorganismo al cual pertenecen (Vieille y Zeikus 2001).

Como se ha descrito anteriormente para otras PPX, éstas requieren de cationes divalentes para su actividad (Cardona y col. 2002; Akiyama y col. 1993). La PPXr *M. sedula* mostró que tanto Mn como Mg tienen un efecto en la liberación de Pi por parte de la enzima, siendo el máximo de actividad a 5 mM de MnCl₂ y 20 mM de MgCl₂. Según estos resultados, la PPXr de *M. sedula* actúa de manera más eficiente en presencia de Mg. El efecto del Mg en las PPX se ha descrito como necesario para su funcionamiento (Akiyama

y col. 1993; Bolesch y Keasling 2000; Cardona y col. 2002). Aunque a la fecha no se sabe específicamente el efecto de este catión sobre la enzima y su actividad es posible que el Mg cumpla alguna de sus tres funciones mejor descritas como cofactor enzimático: I) Estabilizador de algún intermediario de la reacción, II) estabilizador de algún grupo saliente o III) unión de dos sustratos reactivos y facilitación de su reacción por proximidad (Wolf y Cittadini 2003). Nuestros resultados indican que el Mg^{2+} es de vital importancia para el funcionamiento de la enzima.

Anteriormente se ha demostrado que la actividad de la PPX es diferente dependiendo del largo de cadena del sustrato (Lindner y col. 2009). Para probar este efecto en la PPXr de *M. sedula* se utilizará poliPs comerciales de diferente largo de cadena. La enzima liberó fosfato desde los poliP 45 y poliP 75. Pero la mayor liberación de Pi se produce al utilizar el poliP 700 como sustrato.

A este resultado se suma el dato experimental (no mostrado) obtenido en el laboratorio que los poliP extraídos de *M. sedula* poseerían un tamaño similar a los poliP 700. Es bastante posible que el sustrato ideal para la PPX de *M. sedula* sea un poliP en el rango de 700 residuos de Pi. De esta manera, el sustrato requerido por esta PPX sería similar, por ejemplo, al de la PPX de *E. coli*, que requiere de un sustrato óptimo de aproximadamente 500 residuos de Pi (Akiyama y col. 1993).

Con la finalidad de identificar al aminoácido responsable de la catálisis, se diseñaron y expresaron mutantes de la PPXr de *M. sedula*. Los resultados obtenidos en una curva de progreso de reacción al utilizar los mutantes, muestran que el mutante E111A posee muy baja actividad, pero la pérdida de ésta es total en el mutante E113A. El mecanismo de reacción descrito para la PPX de *E. coli* involucra la escisión de un residuo de Pi terminal de la cadena de poliP a través del ataque nucleofílico de una molécula de agua activada

por el residuo de ácido glutámico. Esta activación de la molécula de agua permite que ésta ataque el fosfato terminal de la cadena de poliP, generando la liberación del Pi (Rangarajan y col. 2006). Como se puede ver en la figura 33, para el caso de *E. coli*, existe otro residuo importante en el mecanismo de acción, ya que un aminoácido de carácter básico es el responsable de nivelar las cargas del Pi, permitiendo que este pueda escindirse del poliP. La PPX de *M. sedula* posee el residuo E113, que sería el ácido glutámico equivalente al de *E. coli* involucrado en la catálisis (figura 34). Dentro del sitio catalítico también existen otros aminoácidos importantes para que esta reacción se lleve a cabo, y muy probablemente este aminoácido corresponda a la arginina que está formando un puente salino con el sitio catalítico en la PPX de *M. sedula*. Es por lo tanto muy probable que la PPX de *M. sedula* tenga un mecanismo similar al propuesto para *E. coli*.

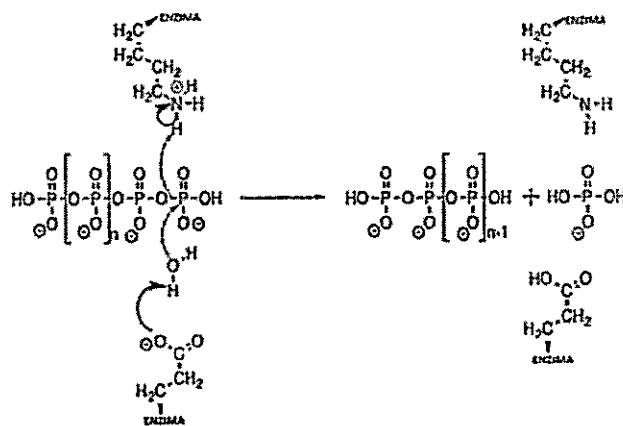


Figura 34. Esquema explicativo del mecanismo de reacción más probable para la catálisis efectuada por la PPXr de *E. coli*. El carácter ácido del residuo de ácido glutámico activa una molécula de agua, la cual efectúa un ataque nucleofílico al Pi terminal de la cadena de poliP, causando así la liberación de Pi.

El comportamiento cinético de la enzima de *M. sedula* mostró que la enzima posee un comportamiento que más bien se ajusta a una curva sigmoídea. Las enzimas con comportamiento sigmoídeo corresponden a aquellas que presentan una unión cooperativa. Esta unión cooperativa se refiere a que la unión del sustrato o ligando a un sitio de unión afecta a la afinidad de otros sitios para sus sustratos. Se observa la forma sigmoídea característica con baja actividad de la enzima a una concentración de sustrato baja y un aumento rápido e inmediato de la actividad enzimática a medida de que la concentración de sustrato aumenta (Koshland 1970).

Para finalizar la caracterización de la PPXr de *M. sedula*, se llevó a cabo un ensayo de actividad en presencia de Pi, con el propósito de probar el posible efecto del producto de la reacción sobre la actividad de la enzima. Los resultados experimentales mostraron que al agregar Pi desde el inicio de la reacción, la liberación de producto disminuyó considerablemente comparado con la reacción sin Pi en el medio. Este efecto se observó a bajas concentraciones de Pi como 5 mM y a concentraciones medias (10 mM). Por su parte, la disminución de la actividad fue casi completa cuando la concentración inicial de Pi fue de 20 mM. Este efecto de inhibición por producto de la PPX ha sido reportado anteriormente para la PPX de *E. coli* (Akiyama y col. 1993). Es interesante vincular este efecto de inhibición con lo observado anteriormente, ya que como se ha mencionado antes, al realizar la cuantificación de los poliP intracelulares de *M. sedula* en un experimento de "shock de cobre", se vio que la cantidad de poliP disminuye, es decir existe una acción de la PPX sobre los poliP, pero esta degradación no es completa quedando aproximadamente a 200 nmol de Pi/ mg de proteína y se mantuvo en este nivel. Este fenómeno podría tener relación con el efecto inhibitorio del producto de reacción sobre la enzima. Si se extrapola este efecto inhibitorio, a lo que eventualmente puede estar pasando a nivel intracelular, probablemente la degradación del poliP de la célula por la

PPX a causa de la presencia de cobre en el medio, sería uno de los primeros mecanismos de defensa celular ante la presencia de cobre. El Pi generado se uniría al cobre y éste sería expulsado de la célula por algún transportador de fosfato. Por otra parte, el exceso de Pi generado durante la degradación del poliP por la enzima, serviría también para regular la actividad de la enzima, deteniendo la degradación de los poliP. Esto sería de vital importancia para la célula, ya que como se mencionó antes, es importante que exista un nivel de reserva de poliP para las demás funciones que éstos cumplen. Una vez que el sistema de respuesta temprana a la presencia de metal se ha montado (degradación de poliP), probablemente aparecen otros sistemas de resistencia que tienen que ver con un tipo de respuesta canónico a la presencia de metales como las ATPasas de cobre u otros.

6.5 Ubicación subcelular de la PPX de *M. sedula*

La detección del posible lugar intracelular donde se ubica la enzima PPX se efectuó por inmunomicroscopía electrónica. Para realizar este ensayo se llevó a cabo microscopía de distintas células en diferentes condiciones de exposición a cobre. Por ejemplo, se utilizó *E. coli* sobreexpresando la proteína como control que la técnica estaba funcionando, ya que al utilizar estas células sobreproductoras de PPXr de *M. sedula* se vió la presencia de una elevada cantidad de partículas de oro asociadas al anticuerpo secundario. En células de *M. sedula*, expuestas o no a cobre, se observó la presencia de partículas de oro en ambos casos. Esto se interpretó como la existencia de asociación del anticuerpo secundario a partículas de oro con su anticuerpo primario, el que estaría unido a la PPX presente en el interior de la célula. Un aspecto que llama la atención en estos dos tipos de células de *M. sedula* y que no se observó en las células controles de *E. coli* sobreproductoras de la PPXr, es que las partículas de oro asociados al anticuerpo secundario se ven agrupadas en pequeños cúmulos distribuidos de manera homogénea en la célula. En cambio, en las células control de *E. coli* se observó la presencia de partículas

de oro distribuidas homogéneamente por la célula. Otra observación que se puede hacer es que el número de partículas de oro observadas en *M. sedula* no expuesta a cobre fue de aproximadamente 50, en cambio, en las células expuestas a cobre fue de aproximadamente 100. Aunque sería necesario confirmarlo, esto sugiere que la célula expuesta al metal posee una mayor cantidad de unidades de PPX. Esto reafirmaría la idea que esta enzima es parte de un mecanismo de respuesta a la presencia de cobre en el medio. Lamentablemente, una de las expectativas que se tenían al realizar este ensayo era ver la PPX asociada a los gránulos de poliP presentes en esta célula, lo que no ocurrió. Este eventual resultado negativo quizás se deba a la técnica empleada en la microscopía, ya que como se menciona en materiales y métodos las muestras observadas al microscopio corresponden a secciones de la célula y no a la célula completa. Para generar estas secciones se debe tratar la célula y luego cortarla, lo que eventualmente podría causar algún daño en la estructura del gránulo causando que éste no se vea en la imagen y por ello las partículas de oro agrupadas no se visualizan asociadas a un gránulo de poliP.

6.6 Expresión de probables determinantes de resistencia a cobre en *M. sedula*

Se utilizó qRT-PCR para estudiar el efecto del cobre sobre la expresión de algunos genes posiblemente involucrados en la respuesta de *M. sedula* al metal tóxico. Los genes estudiados fueron los siguientes:

Homólogos de *pho84* (Msed_1512, Msed_1094, Msed_0866 y Msed_0846).

El gen *pho84* fue descrito por primera vez como el que codifica una proteína transportadora de fosfato en *Saccharomyces cerevisiae* (Bun-Ya y col. 1991). Anteriormente en nuestro laboratorio se propuso la existencia de Pho84 en *A. ferrooxidans* (Alvarez y Jerez. 2004) debido a la ausencia de un transportador de fosfato

tipo Pit. Dada a la importancia del transporte de Pi en la resistencia a cobre mediada por poliP (Grillo-Puertas y col. 2014), es importante la presencia de algún sistema de transporte de Pi en *M. sedula*.

Al medir los niveles de expresión de los genes homólogos *a pho84* en *M. sedula* en cultivos adaptados o no a cobre, en la fase exponencial, fase exponencial tardía y comienzo de la fase estacionaria de crecimiento, se observó que el máximo nivel de transcrito del gen Msed_1512 ocurre en la fase exponencial de cultivos adaptados a cobre. En cambio, en el resto de los puntos y cultivos su presencia aparentemente no es determinante. Por su parte, el transcrito del gen Msed_1094 se mantiene en niveles basales en relación al control sin cobre, pero en el comienzo de la fase estacionaria se evidencia un aumento en el transcrito de este gen. Para el transcrito del gen Msed_0866, se puede distinguir dos comportamientos ya que para los cultivos adaptados a cobre existe una disminución desde la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria. En cambio, para cultivos no adaptados al metal se ve un leve aumento en la fase exponencial tardía para luego volver a los niveles basales de transcrito. Finalmente, al observar el comportamiento de los niveles de transcrito del gen Msed_0846 se observa que para los cultivos adaptados a cobre hay un nivel superior al basal en las fases exponencial y exponencial tardía de la curva de crecimiento, pero en el comienzo de la fase estacionaria el nivel de transcrito disminuye. Para el caso de los cultivos no adaptados a cobre se ve un aumento de los niveles de transcrito de este gen en la fase exponencial tardía.

En relación a la eventual implicancia en la resistencia a cobre de los genes estudiados, es importante recalcar la idea que el transporte de cobre sería responsable de la destoxicación del metal en la célula (Grillo-Puertas y col. 2014). En el estudio citado, se utilizó la modulación de los niveles de Pi en el medio, para ver el efecto que tiene éste en la resistencia a cobre. Células WT crecidas en un medio alto en Pi fueron más

tolerantes a cobre que las mismas células crecidas en un medio con menor cantidad de Pi. Además, las células tolerantes a cobre indujeron la degradación de los poliP mediada por la PPX. Finalmente, una cepa mutante para el sistema Pit (sistema transportador de Pi, Rao y Torriani 1990) fue extremadamente sensible a la presencia de cobre, incluso en medio rico en Pi. Esto, sumado al dato que el sistema Pit utiliza como soluto transportable un complejo metal fosfato (Hendrik y col. 1994), evidencia el hecho que este sistema transportador de Pi sería muy importante en la resistencia al metal.

Estos antecedentes llevan a pensar que los sistemas transportadores de Pi también tienen implicancia en la respuesta a cobre en *M. sedula*. Al analizar los niveles de transcrito de estos genes en su conjunto, se observan que en toda la curva de crecimiento de *M. sedula* existe al menos uno de ellos que está inducido, lo que reafirmaría la idea que el transporte de Pi es importante en la resistencia al metal.

Una observación insoslayable que apoya esta última proposición, es la descripción de una cepa de *M. sedula* con una resistencia a cobre mayor a la descrita para la cepa WT (McCarthy y col. 2014). En este estudio se caracterizó la cepa CuR1 como una cepa que posee una mutación que le permite reconstituir el gen Msed_1517, que corresponde a un ortólogo al transportador de Pi de *E. coli* PitA. El hecho que la cepa CuR1 posea un gen funcional *pitA*, el que no está presente en la cepa anotada como WT, y que además posea una mayor resistencia a cobre, indica que los sistemas transportadores de Pi son importantes para la resistencia a cobre en *M. sedula*. Además, se puede recalcar que la cepa estudiada en esta Tesis requiere para su resistencia a cobre de algún sistema transportador de Pi que compense la falta del sistema Pit. Debido a ello, cobrarían vital importancia los genes homólogos a *pho84*, ya que como se mencionó, al menos uno de ellos es siempre transcrito en los distintos momentos de la curva de crecimiento, para

asegurar que la célula tiene algún sistema de transporte de Pi funcionando durante la exposición a cobre.

Al medir los niveles de transcrito de los cuatro genes homólogos a *pho84* a diferentes tiempos después del “shock” de cobre, tres genes (Msed_1094, Msed_0866 y Msed_0846) aumentaron progresivamente sus niveles llegando a un máximo luego de 30 min después del “shock”. Luego de este tiempo, ocurre una disminución en los niveles de transcrito de los tres genes. Por otra parte, los transcritos del gen Msed_1512 no presentaron una variación significativa luego del “shock” de cobre. Por otro lado este gen solo evidenció un aumento en sus niveles de transcrito en la fase exponencial de células adaptadas a cobre, lo que posiblemente signifique que sea un transportador que se utiliza en células que ya han sido sometidas a un proceso de adaptación al metal.

Los resultados mostraron que los niveles de poliP en *M. sedula* se degradan rápidamente luego de un “shock” de cobre. Esta degradación de los poliP se detiene luego de 30 min para llegar a un nivel que se mantiene en el tiempo. Esto sugiere que la concentración de Pi al interior de la célula llega a un nivel constante, por lo que su eventual expulsión asociada al metal ha llegado a un máximo en ese momento, seguida de su disminución posterior. En paralelo, los sistemas encargados de expulsar el Pi de la célula (los genes ortólogos a *pho84*) también alcanzan un nivel máximo de expresión a la media hora después del “shock”, para soportar el aumento de la presencia de Pi intracelular debido a la degradación de los poliP.

PPX de *M. sedula* (Msed_0981).

Como se ha demostrado en este estudio, el gen Msed_0981 codifica para la enzima PPX de *M. sedula*. Debido a la ya descrita importancia de esta enzima en la resistencia a metales (Keasling 1997) se cuantificó los niveles de transcrito de esta enzima en las mismas condiciones empleadas para los genes ortólogos de *pho84*.

Se encontró que en cultivos no adaptados al metal existe un aumento en los niveles de transcrito de PPX en la fase exponencial tardía. Por su parte, en los cultivos adaptados a cobre se vió que los niveles de transcrito de este gen fueron siempre mayores a los de los cultivos no adaptados. En cambio en la etapa exponencial tardía se observó el mismo nivel de aumento aunque de magnitud menor que en las células no adaptadas. En cultivos adaptados a cobre los resultados sugieren que la célula está siempre degradando los poliP mediante la acción de la PPX y es por esto que los transcritos de esta enzima en estas condiciones son siempre mayores a los observados en las células control. Como era esperable, la disminución de los niveles de poliP intracelulares en la fase exponencial tardía coincide con el aumento de los niveles del transcrito del gen de la PPX.

Los niveles de transcrito del gen PPX de *M. sedula* sometidos a "shock" de cobre aumentaron alcanzando un máximo luego de 30 min. Esto se condice con la baja en los niveles de poliP que disminuyen durante el mismo período de tiempo y luego se "estacionan". Esto sugiere que en respuesta al estrés por cobre, la sobreexpresión de PPX es clave para disminuir el efecto del metal en la célula.

Sistema Cop (CopA: Msed_0490, CopM: Msed_0491 y CopT: Msed_0492)

Los últimos tres genes analizados por esta técnica fueron los componentes del sistema Cop. Este sistema está compuesto por la ATPasa CopA, la que, en *E. coli*, transloca cobre desde el citoplasma al periplasma (Rensing y col. 2000). Además, estudios posteriores

mostraron su participación en el eflujo de plata hacia el periplasma de *E. coli* (Stoyanov y col. 2003) por lo que se considera que es un determinante de resistencia a metales. Los otros dos componentes de este sistema son CopM y CopT. El primero corresponde a una chaperona de metal que es capaz de unirse al cobre y de esta manera escindir al represor transcripcional CopT del sitio promotor de la transcripción de los genes CopM y CopA, para así favorecer la expresión de estos (Ettema y col. 2006).

Estos tres genes han sido descritos por homología de secuencia en el genoma de *M. sedula* (Auernik y col. 2008) y corresponden a los genes: Msed_0490, gen descrito como ortólogo de CopA, Msed_0491, descrito como ortólogo de CopM y Msed_0492, gen ortólogo de CopT.

Los transcritos de *copA* y *copM* aumentaron durante el crecimiento de *M. sedula* no adaptadas a cobre para luego disminuir hasta llegar a la fase exponencial tardía. Los niveles de transcrito de *copT* fueron siempre muy similares en los del control, lo que sugiere que el sistema puede estar más reprimido que en las células sometidas a mayor cantidad de cobre en el medio.

El transcrito del gen *copT* disminuye hacia la fase exponencial, lo que se condice con el aumento de los genes para *copA* y *copM* ya que el producto de *copT* actúa como un regulador transcripcional negativo (Maezato y col. 2012).

Los genes *copA* y *copM* aumentaron luego del “shock”, hasta llegar a un máximo luego de media hora después para luego disminuir. Por su parte, el transcrito correspondiente al represor transcripcional *copT* mantiene sus niveles prácticamente constantes luego del “shock”. Esto es un posible indicio que luego del “shock” la cantidad de represor CopT permanece constante, por lo que la cantidad de proteína nueva que se podría generar a partir de la síntesis *de novo* de este mRNA sería nula o muy baja. Esto implicaría que la

cantidad de represor (CopT) permanecería constante o disminuiría (debido a la degradación de la proteína). Esta baja en la disponibilidad del represor del sistema facilitaría la expresión de los genes *copA* y *copM* para la expulsión del metal intracelular.

En conjunto, estos resultados muestran que el sistema Cop al parecer es funcional en *M. sedula*, y que la sobreexpresión de este sistema ayudaría a la expulsión del metal en células sometidas a la presencia de cobre.

En *M. sedula* posiblemente existen varios sistemas involucrados en la respuesta a cobre, ya que al parecer se requeriría algún sistema de transporte de Pi, la presencia y acción de la enzima PPX y la sobreexpresión de los componentes del sistema Cop. En su conjunto, todos estos sistemas ayudarían a que la célula pueda sobrellevar el aumento de cobre intracelular.

6.7 Respuesta global de *M. sedula* a la presencia de cobre determinada por proteómica cuantitativa

Se realizó la cuantificación de las proteínas que cambian sus niveles en células de *M. sedula* adaptadas a cobre por iTRAQ. Los resultados muestran que de un total de 61 proteínas que variaron significativamente, 33 que aumentaron su nivel y 28 disminuyeron su nivel en las células adaptadas a cobre. La mayoría de las proteínas que cambiaron sus niveles correspondieron a la categoría de metabolismo (44% del total). Además, llama la atención que la categoría de proteínas pobremente caracterizadas corresponden a un 25 % del total de los cambios. Esto indica que en este microorganismo quedan aún muchos elementos desconocidos, los que eventualmente pueden tener relación con la respuesta pleiotrópica a la presencia de cobre en el medio.

6.7.1 Proteínas que aumentan su nivel

Actividad oxidoreductasa que involucra NADH o NADPH

De las proteínas que aumentan su nivel y están involucradas en la actividad oxidoreductasa que involucra NADH o NADPH se pueden mencionar: a las proteínas codificadas en los genes Msed_1896, Msed_1899 y Msed_2012. Estos genes corresponden a la subunidad C de la NADH deshidrogenasa, a la cadena I de la NADH quinona oxidoreductasa y la subunidad B de la NADH deshidrogenasa respectivamente. Las subunidades B y C de la NADH deshidrogenasa (Msed_2012 y Msed_1896), forman parte de la enzima involucrada directamente en la fosforilación oxidativa. La otra proteína es la cadena I de la NADH quinona oxidoreductasa (Msed_1899) también involucrada en la cadena transportadora de electrones (Brandt 2006). Estas enzimas participan en reacciones redox en las que NADH o NADPH actúan como dadores de hidrógeno o electrones y reducen un hidrógeno o un aceptor de electrones.

Procesos de oxidación reducción (Redox)

Dentro del proceso biológico de oxidoreducción (redox) se encuentran las tres proteínas antes mencionadas junto con las codificadas por los genes Msed_0962, Msed_2074 y Msed_1716. Estos genes codifican para una thioredoxina, glutamato deshidrogenasa y una ribonucleósido difosfato reductasa respectivamente. Las dos primeras están dentro de la categoría funcional de transporte y metabolismo de aminoácidos y la tercera está dentro de la categoría funcional de transporte y metabolismo de nucleótidos. En conjunto con las tres mencionadas anteriormente, según el análisis de enriquecimiento estarían involucradas en el proceso biológico redox. Esto implica un proceso metabólico que resulta en la remoción o adición de uno o más electrones desde o hacia un elemento, con la concomitante remoción o adición de uno más protones.

Las proteínas que presentan al menos un dominio Trx son parte de la familia de las proteínas tioredoxinas. Este tipo de proteína están implicadas en múltiples funciones celulares (Pedone y col. 2010). Las tioredoxinas son proteínas que están implicadas en la reducción de otras proteínas mediante el uso de su centro cisteína thiol-disulfuro activo. De esta manera actúan como agentes reductores en una gran variedad de reacciones enzimáticas (Eklund y col. 1984).

La enzima glutamato deshidrogenasa utiliza como cofactor NAD(P)⁺ y es la responsable de la desaminación oxidativa del glutamato a α -cetoglutarato con la correspondiente liberación de amonio. Uno de los productos de la reacción (α -cetoglutarato) es un intermediario del ciclo de Krebs, por lo que posiblemente al estar aumentada la presencia de esta enzima en las células adaptadas a cobre, la célula esté intentando aumentar su tasa metabólica para resistir la presencia de cobre en el medio.

La ribonucleósido difosfato reductasa (RNR) es la enzima limitante en la síntesis de DNA, la cual se encarga de catalizar la reducción de diferentes ribonucleótidos en los desoxiribonucleótidos correspondientes (Sengupta y Holmgren 2014). Para el correcto funcionamiento de la RNR, se requiere de la acción de tioredoxinas (Sengupta y Holmgren 2014). Esto se relaciona con lo mencionado anteriormente, que una de las proteínas sobreexpresadas en esta condición es un tipo de tioredoxina, por lo que probablemente el aumento de la RNR esté relacionado con el de la tioredoxina antes mencionada.

Fosforilación oxidativa

Las tres proteínas involucradas en este proceso biológico que aumentan su nivel de expresión corresponden a la subunidad C de la NADH deshidrogenasa, a la cadena I de la NADH quinona oxidoreductasa y a la subunidad B de la NADH deshidrogenasa. Estas

proteínas están presentes dentro de los tres procesos biológicos identificados mediante el análisis de enriquecimiento.

Unión a iones, cationes, metales iónicos y metales de transición

Estos procesos biológicos involucran al menos cuatro proteínas caracterizadas y una menos conocida. Estas proteínas están codificadas por los genes: Msed_2238 (2,3-bifosfoglicerato independiente fosfoglicerato mutasa), Msed_0296 (ruberythrina), Msed_1489 (proteína poco caracterizada con un dominio de “dedo de zinc”), Msed_1899 (cadena I de la NADH quinona oxidoreductasa) y Msed_2012 (subunidad B de la NADH deshidrogenasa).

De las no mencionadas hasta ahora, la 2,3-bifosfoglicerato independiente fosfoglicerato mutasa cataliza la conversión reversible del 3 fosfoglicerato y el 2 fosfoglicerato de la glicólisis y la gluconeogénesis (Johnsen y Schönheit 2007), y la ruberythrina se cree que actúa como una peróxido reductasa (Weinberg y col. 2004; Kurtz. 2006) disminuyendo el estrés provocado por peróxido de hidrógeno.

Categorías funcionales

Como se ve en el análisis de enriquecimiento, los procesos biológicos en los que están involucradas las proteínas que aumentan su nivel son actividad oxidoreductasa que involucra NADH o NADPH, procesos de oxidación reducción (Redox), fosforilación oxidativa y unión a iones, cationes, metales iónicos y metales de transición. Sin perjuicio de esta clasificación generada por este tipo de análisis, al buscar la categoría funcional hecha en el análisis de los datos de proteómica, los genes identificados en el análisis de enriquecimiento se encuentran dentro de las categorías funcionales de metabolismo y señalización y procesamiento celular.

En la categoría de señalización y procesamiento celular sólo hay una proteína poco caracterizada que corresponde a la codificada en el gen Msed_1648 y que está en la sub categoría funcional de defensa celular. El resto de las proteínas se encuentran en la categoría funcional de metabolismo entre las que se encuentran las codificadas en los genes Msed_0296 (ruberythrina), Msed_1899 (cadena I de la NADH quinona oxidoreductasa), Msed_1896 (subunidad C de la NADH deshidrogenasa) y Msed_2012 (subunidad B de la NADH deshidrogenasa) y que pertenecen a la subcategoría de producción y conversión de energía. Dentro de la sub categoría de metabolismo y transporte de aminoácidos se encuentran los genes Msed_0962 (thioredoxina) y Msed_2074 (glutamato deshidrogenasa). La sub categoría de transporte y metabolismo de carbohidratos cuenta con la proteína codificada por el gen Msed_2238 (3-bifosfoglicerato independiente fosfoglicerato mutasa). Finalmente la sub categoría de transporte y metabolismo de nucleótidos tiene a la proteína codificada en el gen Msed_1716 (ribonucleósido difosfato reductasa).

Los análisis y categorizaciones hechas parecen apuntar a que la célula efectúa una respuesta pleiotrópica ante la presencia de cobre en el medio y dentro de esta respuesta destacan el aumento de los procesos que tienen que ver con el balance redox de la célula. Posiblemente esta respuesta tenga que ver con tratar de frenar el estrés oxidativo que causa el metal en la célula (Eral y col. 2001), dado que como se ha demostrado en arqueas de este tipo, existe una respuesta específica para contrarrestar el efecto del estrés oxidativo, como por ejemplo se ha descrito en *S. solfataricus* hay un aumento en la expresión de proteínas como rubreritina, ferredoxina y óxido reductasa ante la presencia de estrés oxidativo (Maaty y col. 2009).

El conocimiento de las proteínas que varían ante la presencia de cobre en *M. sedula* es prácticamente inexistente y aquí se ha dado por primera vez un indicio de cuales proteínas

son las que eventualmente pueden estar cambiando. Lamentablemente por razones desconocidas, el número de proteínas identificadas que variaron su expresión no se compara con las identificadas en otros estudios de proteómica. Esto quizás se deba a la naturaleza termoestable de las proteínas que componen a este microorganismo, cuya degradación por proteasas puede ser mucho menor que en mesófilos. El hecho que el número de proteínas que se identificaron y variaron significativamente sea bajo, no amerita que se descarte la eventual importancia de alguna de las proteínas encontradas y que se descartaron en el análisis de enriquecimiento, por esto, en la sección anexos se da una breve revisión de las proteínas que aumentaron o disminuyeron su nivel significativamente.

7. CONCLUSIONES

- *M. sedula* posee gránulos intracelulares de poliP que se degradan parcialmente en respuesta a la exposición a cobre.
- El producto del gen Msed_0981 corresponde a la exopolifosfatasa funcional (PPX) de *M. sedula* y es responsable de la degradación de los poliP.
- El aminoácido más importante de la catálisis de la PPX de *M. sedula* es el ácido glutámico 113.
- El Pi inhibe a la PPX de *M. sedula*, sugiriendo una posible regulación de la enzima mediada por este producto de su reacción. Además la enzima posee un comportamiento cinético sigmoideal.
- La inmunomicroscopía mostró que la PPX forma cúmulos al interior de la célula, probablemente estos cúmulos se encuentren asociados a los gránulos de poliP, los cuales no son visibles con esta técnica.
- Los transcritos de los genes involucrados en la respuesta a cobre fluctúan durante la curva de crecimiento.
- La célula monta una respuesta contra el estrés oxidativo ante la presencia de cobre.

8. MODELO

Finalmente, a modo de resumen para hacer más didáctica las conclusiones, se presenta un modelo que representa los mecanismos de resistencia a cobre que presentaría *M. sedula*.

En la figura 35 se expone el modelo sugerido para células de *M. sedula* expuestas a cobre a un tiempo temprano de exposición (A) y adaptadas a la presencia de cobre (B). En este modelo se puede apreciar que en las células sometidas a cobre existiría una respuesta de primera fase en la resistencia a metal, ya que la degradación de los poliP ante una exposición repentina a cobre es prácticamente inmediata (A), mientras otros sistemas comienzan a sobreexpresarse. Lo más característico de esta fase es la degradación del poliP, esta degradación generaría el Pi necesario para unirse al cobre y ser expulsado de la célula por la acción de los ortólogos a Pho84.

Si luego de esta respuesta de carácter temprano la exposición a cobre continua, la célula montará otros mecanismos de resistencia, con un carácter más adaptativo. Dentro de los que se pueden mencionar al sistema *cop* y la expresión del transportador *pho84* (B). Además, se puede ver que el cobre presente generaría especies reactivas de oxígeno, las que eventualmente pueden dañar la célula por lo que también se genera una respuesta global al estrés oxidativo, aumentando los niveles de proteínas relacionadas con esta respuesta (B).

En ambos casos, se aprecia que la degradación de poliP no es total, probablemente y entre otras razones, a causa de la inhibición por producto (Pi) que afecta a la PPX. Además en un sistema adaptado a cobre, se puede apreciar la agrupación de la PPX y un aumento en el sistema *cop*, pero no en transcrito del represor, lo que supone un montaje y mantenimiento de este sistema en la célula (C). Por ultimo en un sistema adaptado a

cobre se plantea la posibilidad que la célula esté sintetizando ATP mediante el uso de ADP y poliP por medio de la posible actividad PPK (enzima aún no caracterizada), para satisfacer las necesidades energéticas en aumento de una célula estresada por el ambiente en el que se encuentra.

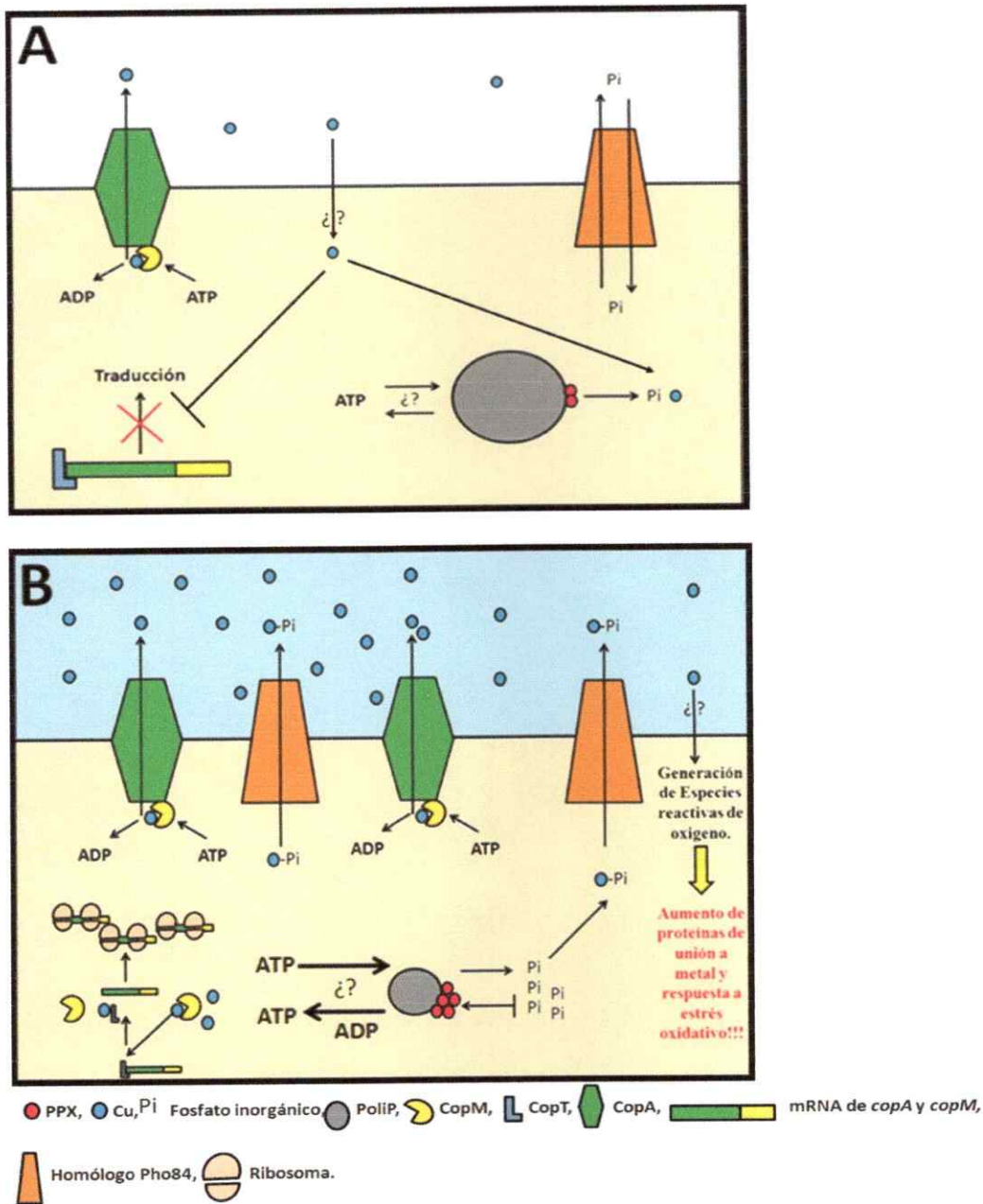


Figura 35. Modelo propuesto para el sistema de resistencia a cobre de *M. sedula*.
 A) Respuesta temprana de células expuestas a cobre. B) Células adaptadas a cobre.

9. BIBLIOGRAFÍA

Akiyama M, Crooke E, Kornberg A. (1993). "An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon." J. Biol. Chem. 268: 633-639.

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

Anand R, Hoskins A. A, Bennett E. M, Sintchak M. D, Stubbe J, Ealick S. E. (2004). "A model for the *Bacillus subtilis* formylglycinamide ribonucleotide amidotransferase multiprotein complex." Biochemistry. 43:10343-10352.

Anantharaman V, Koonin E, Aravind L. (2001). "Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-moleculebinding domains" J. Mol. Biol. 307: 1271-1292.

Andrews S. C. (2010). "The ferritin-like superfamily: evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor." Biochim. Biophys. Acta. 1800: 691-705.

Auernik K. S, Maezato Y, Blum P. H, Kelly R. M, (2008). "The genome sequence of the metal-mobilizing, extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* provides insights into bioleaching-associated metabolism." Appl. Environ. Microbiol. 74: 682-692.

Ault-Riché D, Fraley C. D, Tzeng C. M, Kornberg A. (1998). "Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. 180: 1841-1847.

Azevedo C, Livermore T, Saiardi A. (2015). "Protein polyphosphorylation of lysine residues by inorganic polyphosphate." Mol. Cell. 58: 71-82.

Bardaweel S, Ghosh B, Chou T. F, Sadowsky M. J, Wagner C.R. (2011). "*E. coli* histidine triad nucleotide binding protein 1 (ecHlnT) is a catalytic regulator of D-alanine dehydrogenase (DadA) activity *in vivo*." PLoS One. 6: 20897

Bolesch D. G, Keasling J. D. (2000). "Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase." J Biol Chem. 27: 33814-9.

Bonomi F, Pagani S, Cerletti P, Cannella C. (1977). "Rhodanese-mediated sulfur transfer to succinate-dehydrogenase." Eur. J. Biochem. 72: 17-24.

Brandt U. (2006). "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)." Annu. Rev. Biochem. 75:69-92.

Brenner C, Bieganowski P, Pace HC, Huebner K. (1999). "The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins." J. Cell. Physiol. 181:179-187.

Brierley C. L. (2008). "How will biomining be applied in future?". Transactions of nonferrous metals society of China 18: 1302-1310

Brock, T. D. Brock K. M. Belly R. T Weiss R. L. (1972). "*Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature." Arch. Mikrobiol. 84: 54-68.

Bun-Ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y. (1991). "The PHO84 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter." Mol. Cell. Biol. 11: 3229-38.

Cardona S. T, Chavez F. P, 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.

Ciamarella M, Pisani F. M, Rossi M. (2002). "Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*." Antonie Van Leeuwenhoek. 81: 85-97.

Cipollone R, Ascenzi P, Visca P. (2007). "Common themes and variations in the rhodanese superfamily." IUBMB Life. 59: 51-59.

Clark T. R, Baldi F, Olson G. J. (1993). "Coal depyritization by the thermophilic archaeon *Metallosphaera sedula*." Appl. Environ. Microbiol. 59: 2375-2379.

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

Chomczynski P, Sacchi N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal. Biochem. 162: 156-159.

Driessen R. P, Meng H, Suresh G, Shahapure R, Lanzani G, Priyakumar U. D, White M. F, Schiessel H, van Noort J, Dame R. T. (2013). "Crenarchaeal chromatin proteins Cren7 and Sul7 compact DNA by inducing rigid bends." Nucleic. Acids. Res. 41: 196-205.

Eklund H, Cambillau C, Sjöberg B. M, Holmgren A, Jörnvall H, Höög J. O, Brändén C. I. (1984). "Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins." EMBO J. 3: 1443-1449.

Eliás A. O, Abarca M. J, Montes R. A, Chasteen T. G, Pérez-Donoso J. M, Vásquez C. C. (2012). "Tellurite enters *Escherichia coli* mainly through the PitA phosphate transporter." Microbiologyopen. 1: 259-267.

Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. (2001). "Toxic metals and oxidative stress Part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage." Current Topics in Medicinal Chemistry, 6: 529-539.

- Ettema T. J, Brinkman A. B, Lamers P.P, Kornet N.G, de Vos W. M, van der Oost J. (2006). "Molecular characterization of a conserved archaeal copper resistance (cop) gene cluster and its copper-responsive regulator in *Sulfolobus solfataricus* P2." *Microbiology*. 152: 1969–1979.
- Feng Y, Yao H, Wang J. (2010). "Crystal structure of the crenarchaeal conserved chromatin protein Cren7 and double-stranded DNA complex." *Protein Sci*. 19: 1253-1257.
- Fenske J. D, Kenny G, E. (1976). "Role of arginine deiminase in growth of *Mycoplasma hominis*." *J. Bacteriol*. 126: 501-510.
- Frick D. N, Richardson C. (2001). "DNA primases." *Annu. Rev. Biochem*. 70: 39–80.
- Frantom P. A. (2012). "Structural and functional characterization of α -isopropylmalate synthase and citramalate synthase, members of the LeuA dimer superfamily." *Arch. Biochem. Biophys*. 519: 202-209.
- Goldstein J, Newbury D. E, Joy D. C, Lyman C. E, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael, J. R. (2003). "Volumen 1 de Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis." Springer.
- Grillo-Puertas M, Schurig-Briccio L. A, Rodríguez-Montelongo L, Rintoul R, Rapisarda V. A. (2014). "Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*." *BMC Microbiol*. 19: 1471-1480.
- Gross S. R, Burns R. O, Umbarger H. E, (1963). "The biosynthesis of leucine III. The conversion of alpha-hydroxy-beta-carboxyisocaproate to alpha-ketoisocaproate." *Biochemistry*. 2: 1053-1058.
- Guntur F, Kovács A. T, Pool T. J, Boonstra M, Kuipers O. P, Andy-Mark W. H, Thunnissen. (2012). "Crystal structures of two transcriptional regulators from *Bacillus cereus* define the conserved structural features of a PadR subfamily." *PLoS One*. 7: e48015.
- Haeusler P. A, Dieter L, Rittle K. J, Shepler L. S, Paszkowski A. L, Moe O. A. (1992). "Catalytic properties of *Escherichia coli* polyphosphate kinase: an enzyme for ATP regeneration." *Biotechnol. Appl. Biochem*. 15: 125-133.
- Hausner W, Lange U, Musfeldt M. (2000). "Transcription factor S, a cleavage induction factor of the archaeal RNA polymerase." *The J. Biol. Chem*. 275: 12393-12399.
- Hendrik W, van Veen J, Gerard J. J, Kortstee, Konings W. N, Zehnder J. B. (1994). "Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*." *Biochemistry*. 33: 1766-1770.
- Hofmann K, Bucher P. (1995). "The FHA domain: putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors." *Trends. Biochem. Sci*. 20: 347-349.

Huber G, Spinnler C, Gambacorta A, Stetter K. O. (1989). "*Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic Archaeobacteria." *System Appl. Microbiol.* 12: 38-47.

Johnsen U, Schönheit P. (2007). "Characterization of cofactor-dependent and cofactor-independent phosphoglycerate mutases from Archaea." *Extremophiles.* 11: 647-657.

Keasling J. D, Bertsch L, 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. (1997). "Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate." *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 829: 242-249.

Kiang J. G, Tsokos G. C. (1998). "Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology." *Pharmacol. Ther.* 80: 183-201.

Horikoshi K. (2011). *Extremophiles Handbook.* Springer

Kornberg A, Kornberg S. R, Simms E. S. (1956). "Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*." *Biochim. Biophys. Acta.* 20: 215-227.

Kornberg A. (1995). "Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable." *J. Bacteriol.* 177: 491-496.

Kornberg A, Rao N. N, Ault-Riché D. (1999). "Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions." *Annu. Rev. Biochem.* 68: 89-125.

Koshland Jr. (1970). "The Molecular Basis for Enzyme Regulation." Volume 1: 341-396.

Kulaev I. S, Kulakovskaya T. V, Andreeva N. A, 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.

Kurtz D. M. Jr. (2006). "Avoiding high-valent iron intermediates: superoxide reductase and rubrerythrin." *J. Inorg. Biochem.* 100: 679-93.

Lang K. (1933). Die rhodanbildung in tierkorper. *Biochem. Z.* 259: 243 – 256.

Lichko L. P, Kulakovskaya T. V, Kulaev I S. (2006) "Inorganic polyphosphate and exopolyphosphatase in the nuclei of *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on the growth phase and inactivation of the PPX1 and PPN1 genes." *Yeast.* 23:735-740.

Lillig C. H, Berndt C. (2013). "Glutaredoxins in thiol/disulfide exchange." *Antioxid Redox Signal.* 18: 1654-1665.

Lindner S. N, Knebel S, Wesseling H, Schoberth S. M, Wendisch V. F. (2009). "Exopolyphosphatases PPX1 and PPX2 from *Corynebacterium glutamicum*." *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3161-3170.

Maaty W. S, Wiedenheft B, Tarlykov P, Schaff N, Heinemann J, Robison-Cox J, Valenzuela J, Dougherty A, Blum P, Lawrence M. C, Douglas T, Young M. J, Bothner B. (2009). "Something old, something new, something borrowed; how the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* responds to oxidative stress." PLoS One. 4: 6964-6981.

Mac T. T, von Hacht A, Hung K. C, Dutton R. J, Boyd D, Bardwell J. C, Ulmer T. S. (2008). "Insight into disulfide bond catalysis in Chlamydia from the structure and function of DsbH, a novel oxidoreductase." J. Biol. Chem. 283: 824-832.

Maezato Y, Johnson T, McCarthy S, Dana K, Blum P. (2012). "Metal resistance and lithoautotrophy in the extreme thermoacidophile *Metallosphaera sedula*." J. Bacteriol. 194: 6856-6863.

Mayr E. (1990). "A natural system of organisms." Nature 348: 491.

Mayr E. (1998). "Two empires or three." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95: 9720-9723.

McCarthy S, Ai C, Wheaton G, Tevatia R, Eckrich V, Kelly R, Blum P. (2014). "Role of an archaeal PitA transporter in the copper and arsenic resistance of *Metallosphaera sedula*, an extreme thermoacidophile." J. Bacteriol. 196: 3562-3570.

Meyer A. (1904). "Orientierende untersuchungen über verbreitung, morphologie, und chemie des volutins." Bot. Z. 62: 113-152.

Morohoshi T, Maruo T, Shirai Y, Kato J, Ikeda T, Takiguchi N, Ohtake H, Kuroda A. (2002). "Accumulation of inorganic polyphosphate in phoU mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis sp.* strain PCC6803." Appl. Environ. Microbiol. 68: 4107-4110.

Müller (eds.), Progress in Molecular and Subcellular Biology, Vol. 23, pp 27-43. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Norris P. R, Burton N. P, Foulis N. A. (2000). "Acidophiles in bioreactor mineral processing." Extremophiles. 4: 71-76.

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

Orell A, Navarro C. A, Rivero M, Aguilar J. S, Jerez C. A. (2012). "Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions." Extremophiles 16: 573-583.

Orell A, Remonsellez F, Arancibia R, Jerez C. A. (2013). "Molecular characterization of copper and cadmium resistance determinants in the biomining thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*." Archaea. 2013: 289236

Pagani S, Galante Y. M. (1983). "Interaction of rhodanese with mitochondrial NADH dehydrogenase." *Biochim. Biophys. Acta* 742: 278-284.

Pagani S, Bonomi F, Cerletti P. (1984). "Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin." *Eur. J. Biochem.* 142: 361 – 366.

Pedone E, Limauro D, D'Ambrosio K, De Simone G, Bartolucci S.(2010). "Multiple catalytically active thioredoxin folds: a winning strategy for many functions." *Cell. Mol. Life. Sci.* 67: 3797-814.

Pfaffl M. W, Horgan G. W, Leo Dempfle L. (2002). "Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." *Nucleic Acids Res.* 30: 36.

Priness I, Maimon O, Ben-Gal I. (2007). "Evaluation of gene-expression clustering via mutual information distance measure." *BMC Bioinformatics.* 8: 111-123.

Radzi N. M, Soulimane T. (2012). "Bioenergetics at extreme temperature: *Thermus thermophilus* ba(3)- and caa(3)-type cytochrome c oxidases." *Biochim. Biophys. Acta.* 1817: 638-664.

Ramírez P, Toledo H, Guiliani N, Jerez C. A. (2002) "An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds." *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1837-1845.

Ramos P, Dohmen R. (2008). "PACemakers of Proteasome Core Particle Assembly." *Structure.* 16: 1296-1304.

Rangarajan E. S, Nadeau G, Li Y, Wagner J, Hung M. N, Schrag J. D, Cygler M, Matte A. (2006). "The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains." *J. Biol. Mol.* 359: 1249-1260.

Rao N. N. Liu S. Kornberg A. (1998). "Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response." *J. Bacteriol.* 180: 2186-2193.

Rao N. N. Torriani A. (1990). "Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 4: 1083-1090.

Rawlings D. (2002). "Heavy metal mining using microbes." *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 65-91.

Remonsellez F, Orell A, Jerez C. A. (2006). "Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism." *Microbiology* 152: 59-66.

Rensing C, Bin Fan, Rakesh Sharma, Bharati Mitra, Rosen B. P. (2000). "CopA: An *Escherichia coli* Cu (I)-translocating P-type ATPase." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 652–656.

Reusch R. N, Sadoff H. L. (1988). "Putative structures y functions of poly-beta-hydroxybutirate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4176-4180.

Rodrigues C. O, Ruiz F. A, Vieira M, Hill J. E, Docampo R. (2002). "An acidocalcisomal exopolyphosphatase from *Leishmania major* with high affinity for short chain polyphosphate." J. Biol. Chem. 277: 50899-50906.

Romero R. M, Roberts M. F, Phillipson J. D. (1995). "Anthranilate synthase in microorganisms and plants." Phytochemistry. 39: 263-276.

Ross P. L, Huang Y. N, Marchese J. N, Williamson B, Parker K, Hattan S, Khainovski N, Pillai S, Dey S, Daniels S, Purkayastha S, Juhasz P, Martin S, Bartlet-Jones M, He F, Jacobson A, Pappin D. J.(2004). "Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents." Mol. Cell. Proteomics. 3: 1154-1169.

Romberger S. P, Golbeck J. H, (2010). "The bound iron-sulfur clusters of type-I homodimeric reaction centers." Photosynth. Res. 104: 333-346.

Scherer P. A, 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.

Schlaepfer D, Mehlman T, Burgess W. H, Haigler H. T. (1987). "Structural and functional characterization of endonexin II, acalcium- and phospholipid-binding protein" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 6078-6082.

Sengupta R, Holmgren A. (2014). "Thioredoxin and glutaredoxin-mediated redox regulation of ribonucleotide reductase." World J. Biol. Chem. 26: 68-74.

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, Van der Oost J. (2001). "The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 7835-7840.

Shekhar Thakur. (2006). "Enviromental Biotechnology Basics Concepts and Applications." I.K. International. Pvt. Ltd.

Silva Z, Sampaio M. M, Henne A, Böhm A, Gutzat R, Boos W, da Costa M. S, Santos H. (2005). "The high-affinity maltose/trehalose ABC transporter in the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27 also recognizes sucrose and palatinose." J. Bacteriol. 187: 1210-1218.

Sköld O. (2000). "Sulfonamide resistance: mechanisms and trends." Drug. Resist. Updat. 3: 155-160.

Stetter K.O. (1995). "Microbial life in hyperthermal environments." ASM News 61: 285-290.

Stoyanov J. V, Magnani D, Solioz M. (2003). "Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*." FEBS Lett. 546: 391-394.

Sylvester M. Sander C. (1990). "Immunohistochemical localization of rhodanese." Histochem. J. 22: 197-200.

Swigonová Z, Mohsen A. W, Vockley J. (2009). "Acyl-CoA dehydrogenases: Dynamic history of protein family evolution." J. Mol. Evol. 69: 176-193.

Takahashi-Iñiguez T, García-Hernandez E, Arreguín-Espinosa R, Flores M. E. (2012). "Role of vitamin B12 on methylmalonyl-CoA mutase activity." J. Zhejiang. Univ. Sci. B. 13: 423-437.

Thijs J. G. Ettema, Arie B. Brinkman, Packo P. Lamers, Noor G. Kornet, Willem M. de Vos, John van der Oost (2006). "Molecular characterization of a conserved archaeal copper resistance (*cop*) gene cluster and its copper-responsive regulator in *Sulfolobus solfataricus* P2." Microbiology. 152: 1969-1979.

Vieille Zeikus G. (2001). "Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 65: 1-43.

Völlmecke C, Drees S. L, Reimann J, Albers S. V, Lübben M. (2012). "The ATPases CopA and CopB both contribute to copper resistance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*." Microbiology. 158: 1622-1633.

Webb M. R. (1992). "A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89: 4884-4887.

Weinberg M. V, Jenney F. E. Jr, Cui X, Adams M. W. (2004). "Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase." J. Bacteriol. 186: 7888-7895.

Wiame J. M. (1947). "Yeast metaphosphate." Federation Proc. 6: 302.

Wilhelm E. R, Battino R. J, Wilcock, (1977). "Low-pressure solubility of gases in liquid water, Chem. Rev. 77: 219-262.

Williams A, Foster G, Cox J, Embley T. M. (2013). "An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life." Nature 504: 231-236.

Witharana C, Roppelt V, Lochnit G, Klug G, Evguenieva-Hackenberg E. (2012). "Heterogeneous complexes of the RNA exosome in *Sulfolobus solfataricus*." *Biochimie* 94: 1578-1587.

Woese C. R, Kandler O, 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, Fox G. E. (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5088-5090.

Wood H. G. Clark J. E. (1988). "Biological aspects of inorganic polyphosphates." *Annu. Rev. Biochem.* 57: 235-260.

Wolf F. I. Cittadini A. (2003). "Chemistry and biochemistry of magnesium." *Mol. Aspects Med.* 24: 3-9.

Zhai R. G, Rizzi M, Garavaglia S. (2009). "Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide adenylyltransferase, new insights into an ancient enzyme." *Cell. Mol. Life. Sci.* 66: 2805-2818.

10. ANEXOS

10.1 Partidores

Tabla 8. Partidores utilizados.

NOMBRE	SECUENCIA 5'--3'	FUNCION
MRJFw3	CATATGGAGGAAGTTGGAG	Expresión PPX Msed en pET28
MRJRv3	CTCGAGTCAATAAACACCCAAGGG	Expresión PPX Msed en pET29
MRJFwA	AGACTCGCAGCCCTAGGATCCATA	Generación mutantes
MRJRvA	TATGATCCTAATATCGTGACCCAG	Generación mutantes
MRJFwB	CCAGGAGAAGCGGAGGGAAGACTCGCAGCCCTAGGATCCATA	Generación Mutante E112A
MRJRvB	TCCCTCCGCTTCTCTGGTATGATCCTAATATCGTGACCCAG	Generación Mutante E112A
MRJFwC	CCAGGAGCGGAGGAGGGAAGACTCGCAGCCCTAGGATCCATA	Generación Mutante E111A
MRJRvC	TCCCTCCTCCGCTCTCTGGTATGATCCTAATATCGTGACCCAG	Generación Mutante E111A
MRJFwD	CCAGGAGAAGAGGCGGGAAGACTCGCAGCCCTAGGATCCATA	Generación Mutante E113A
MRJRvD	TCCCGCCTCTTCTCTGGTATGATCCTAATATCGTGACCCAG	Generación Mutante E113A
MRJFw6	TTACCTTGCCCTCCAGATCTTGCCT	qRT PCR gen Msed_1512
MRJRv6	AGGCGTTTCTGGGACCTTTCTTCT	qRT PCR gen Msed_1512
MRJFw7	TGGAGGTATTCTTCGCGTTGGA	qRT PCR gen Msed_1094
MRJRv7	TTGGGTGGGATTCCATCTCCCTT	qRT PCR gen Msed_1094
MRJFw8	ACTGCAGGTTGTAGGATTCGTGGT	qRT PCR gen Msed_0866
MRJRv8	TGCAGTCCGTAAGGAAGAAGGCT	qRT PCR gen Msed_0866
MRJFw9	AGTGCAGGCCTAAACGACAGACTT	qRT PCR gen Msed_0846
MRJRv9	TGCCGAAGAGGAAAGCAAAGAGGA	qRT PCR gen Msed_0846
MRJFw10	ATCTTTGAGCTGGGAGGAGGTTCA	qRT PCR gen Msed_0981
MRJRv10	GGCAACCAGCTTGGCAATGAGTAA	qRT PCR gen Msed_0981
MRJFw11	CGCAAGTGAAACACCACCCATGAA	qRT PCR gen Msed_0490
MRJRv11	ACCTTTGGGCTCCCGTGTATCTT	qRT PCR gen Msed_0490
MRJFw12	AGTTAAGGAGACCTCGGCCTACAA	qRT PCR gen Msed_0491
MRJRv12	AAAGGCCGTCTTACAGTGTGGACT	qRT PCR gen Msed_0491
MRJFw13	CAGTGGCAAAGATCCTTCGT	qRT PCR gen Msed_0492
MRJRv13	CCGCTATCTCTCCTCCACAG	qRT PCR gen Msed_0492

10.2 Alineamiento de genes

Para comprobar que los genes utilizados para expresar las proteínas, sólo contienen las sustituciones hechas por mutación sitio dirigida y que no ocurrió ninguna mutación espontánea. En la figura 36 se muestra el alineamiento completo de los genes clonados.

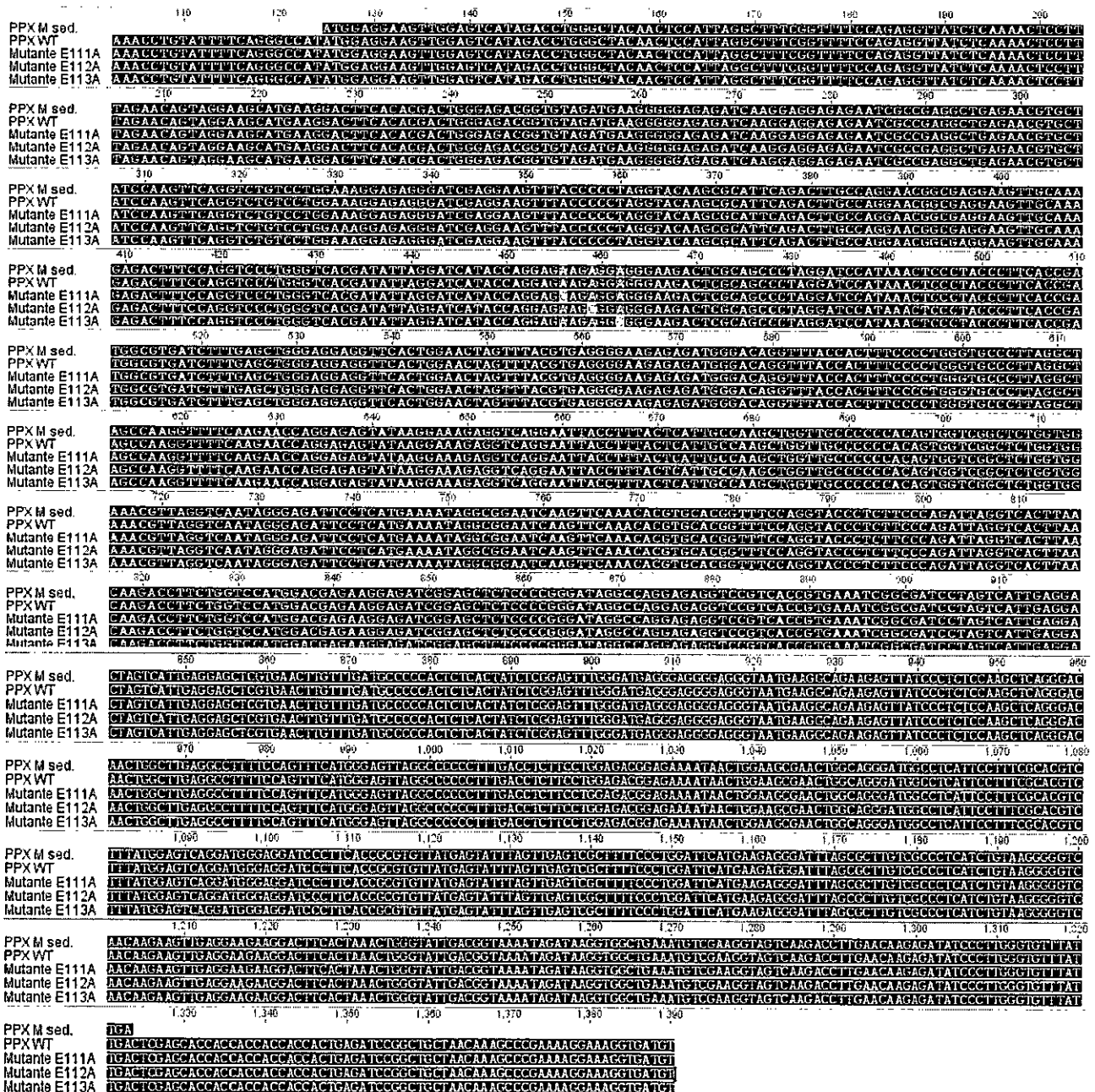


Figura 36. Alineamiento completo del gen Msd_0981 (PPX Msed) y los clones utilizados insertos en el vector de expresión pET-TEV28a. Gen WT insertado en el vector de expresión (PPX WT) y los respectivos mutantes insertados en el vector de expresión (Mutante E111A, Mutante E112A y Mutante E113A).

10.3 Hidrólisis ácida del poliP 700

Para la hidrólisis parcial de los poliP 700 en HCl 2 N, se tomó 150 nmoles de poliP 700 (medido como Pi), los que se incubaron a distintas temperaturas durante 15 min en el ácido. Luego de neutralizar las mezclas, los productos obtenidos se separaron por electroforesis a 300 V durante 1 h en un gel de poliacrilamida (12 %) en tampón TBE conteniendo urea 7 M. Luego de la electroforesis se tiñó el gel con una solución de 0,05 % de azul de toluidina, 25 % metanol y 5 % glicerol. El exceso de colorante se removió del gel mediante lavados con una solución de 25 % metanol y 5 % glicerol. La figura 37 muestra que la hidrólisis en ácido del poliP 700 aumenta a mayor temperatura de incubación, lo que se constata por su mayor migración hacia el frente del gel.

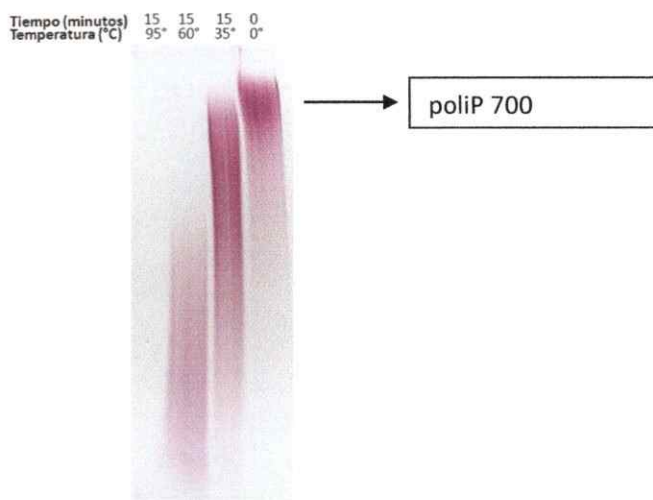


Figura 37. Hidrólisis ácida del sustrato utilizado en la reacción enzimática de la PPX. El poliP 700 se sometió a hidrólisis ácida con HCl 2 N durante 15 min a las temperaturas indicadas. Los productos obtenidos se separaron por electroforesis y se visualizaron mediante tinción con azul de toluidina.

10.4 Determinación de la temperatura óptima de reacción de la PPXr de *M. sedula*

Como se ve en la figura 38 se efectuó un barrido de temperaturas desde 25 hasta 75 °C en intervalos de 10 grados. Este ensayo se realizó con reacciones individuales para cada temperatura, en que cada una se realizó con una concentración de 50 nmol de poliP 700 en tampón de reacción (Tris acetato 50 mM pH 7,0, KCl 175 mM y MnCl₂ 1 mM) y a cada reacción se le agregó una cantidad de 200 ng de proteína pura y el producto liberado (Pi) se determinó luego de 30 minutos de reacción.

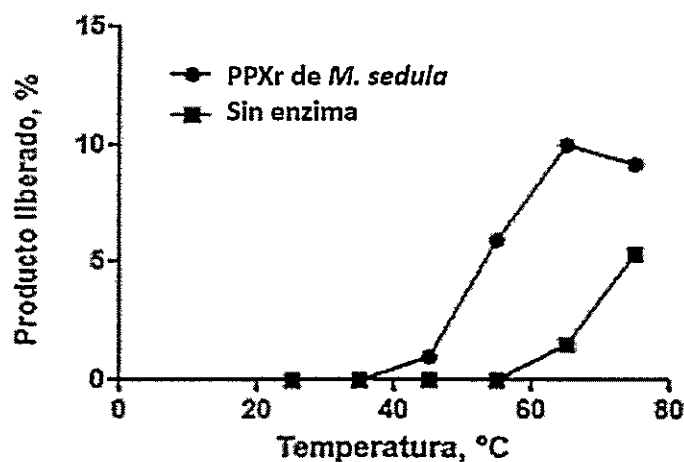


Figura 38. Actividad de PPXr en función de la temperatura. Se realizó este ensayo preliminar en las mismas condiciones que la figura 17.

10.5 La actividad de mutante E112A no es afectada

En la figura 39 se muestra en A la temperatura óptima a la que ésta enzima mutante es activa. En B se muestra la concentración de Mn^{2+} a la que responde el mutante y en C se muestra la concentración de Mg^{2+} a la que el mutante es activo. Este mutante tiene una actividad similar a la del WT. A la luz de estos resultados es claro que este aminoácido no estaría involucrado en la catálisis y sirve como control positivo de actividad sobre un mutante. Con esto se comprueba que la mutación de E113A corresponde a la del sitio activo.

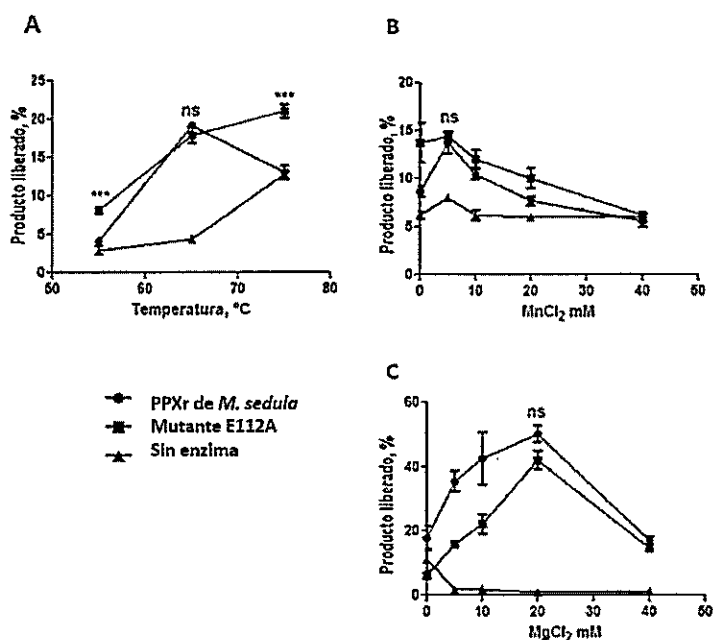


Figura 39. Actividad enzimática de PPXr mutada en E112A. A) Efecto de la incubación a distintas temperaturas. B) Efecto de la concentración de Mn^{2+} . C) Actividad enzimática a diferentes concentraciones de Mg^{2+} . El análisis estadístico de la varianza (ANOVA), se realizó comparando solo los datos de la enzima *wild type* y la mutante E112A, para los puntos en donde se indica. En los casos de B y C, el análisis se realizó solamente para los puntos máximos de actividad. *** = $P < 0,0001$, ns = No significativo ($P > 0,05$).

10.6 Análisis proteómica cuantitativa

A continuación se presenta un análisis de las proteínas que aumentan su nivel significativamente en células de *M. sedula* adaptadas a 16 mM de cobre y que fueron descartadas mediante el análisis de enriquecimiento. Según su subdivisión en categorías funcionales.

Metabolismo

Transporte y metabolismo de iones inorgánicos

La única proteína de esta subcategoría que se vió aumentada corresponde a una proteína que contiene un dominio de rhodanasa. Las proteínas que presentan dominios de rhodanasa están presentes en varios tipos celulares (Cipollone y col. 2007). La rhodanasa fue descrita como una proteína responsable de la conversión de tiosulfato y cianuro en tiocianato y sulfito (Lang 1933). Pero desde ese descubrimiento hasta hoy se han descrito muchas proteínas que poseen dominios de rhodanasa y que están involucradas en una gran cantidad de procesos celulares. Las proteínas con dominios de rhodanasa se han clasificado en 4 grupos. Grupo I: "Single Domain Proteins", Grupo II: "Tandem-Domain Proteins", Grupo III: "Multidomain Proteins" y el Grupo IV: "Elongated Active-site Loop Proteins" (Cipollone y col. 2007).

Si bien uno de los aspectos más estudiados en cuanto a la función celular de las rhodanasas es la detoxificación que estas proteínas otorgan a la célula cuando ésta es expuesta a cianuro (Sylvester y Sander 1990). También existe evidencia que las proteínas con dominio rhodanasa pueden reparar proteínas con sitios hierro-azufre. Al parecer, la rhodanasa podría movilizar el azufre de los centros hierro- azufre y así ayudar a la

reparación de estos. Por ejemplo los centros hierro-azufre de ferredoxinas, succinato dehidrogenasas y NADH deshidrogenasas mitocondriales pueden ser reconstituidos a partir de la incubación con un tipo de rhodanasa y un dador de azufre, un aceptor de azufre y una fuente de hierro (Bonomi y col. 1977; Pagani y Galante. 1983; Pagani y col. 1984).

El hecho que en un experimento de proteómica se viera aumentada una proteína con dominio rhodanasa quizás muestra que el efecto de la presencia de cobre en el medio afecta diversas funciones celulares entre las que está posiblemente la reparación de proteínas con centros hierro azufre.

Transporte y metabolismo de aminoácidos.

Dentro de esta subcategoría hay 3 proteínas que presentan un aumento en su nivel en células adaptadas a 16 mM de cobre, que son: phosphoadenylylsulfate reductase (thioredoxin) (Msed_0962), glutamato deshidrogenasa (NAD/NADP) (Msed_2074) y 3-isopropylmalate dehydratase, small subunit (Msed_0829).

Las proteínas que presentan al menos un dominio Trx son parte de la familia de las tioredoxinas, las que están implicadas en múltiples funciones celulares (Pedone y col. 2010) como la reducción de otras proteínas usando su centro cisteína thiol- disulfuro activo. De esta manera actúan como agentes reductores en una gran variedad de reacciones enzimáticas (Eklund y col. 1984).

La enzima glutamato deshidrogenasa es la responsable de la desaminación oxidativa del glutamato a α -cetoglutarato con la correspondiente liberación de amonio y utiliza como cofactor NAD(P)^+ . Uno de los productos de la reacción (α -cetoglutarato) es un intermediario del ciclo de Krebs, por lo que posiblemente al estar aumentada la presencia de esta enzima en las células adaptadas a cobre, la célula esté intentando aumentar su tasa metabólica para resistir la presencia de cobre en el medio. Además, como se vió en los

experimentos de qRT-PCR los niveles de los transcritos de CopA están elevados en la fase exponencial de crecimiento de células adaptadas a 16 mM, lo que implica la presencia de la ATPasa en el sistema, por lo que para un correcto funcionamiento de la ATPasa y la expulsión del metal de la célula es altamente probable que la célula busque la manera de exacerbar la producción de ATP y una posible manera de lograr esto es mediante la desaminación del glutamato para formar α -cetoglutarato y canalizarlo al ciclo de Krebs.

La 3-isopropilmalato dehidratasa es la enzima responsable de catalizar la isomerización del 2-isopropilmalato en 3 isopropil malato en la síntesis de leucina (Gross y col. 1963).

Transporte y metabolismo de carbohidratos

En esta subcategoría funcional se detecta el aumento de la 2,3-bifosfoglicerato independiente fosfoglicerato mutasa (Msed_2238). Esta enzima cataliza la conversión reversible del 3 fosfoglicerato y el 2 fosfoglicerato en la glicólisis y la gluconeogénesis (Johnsen y Schönheit 2007). Si se toma en cuenta lo mencionado anteriormente, que la célula adaptada a cobre 16 mM probablemente requeriría la formación de mayor energía en forma de ATP, el hecho de que esta enzima involucrada en la glicólisis esté aumentada, podría indicar que esta idea es correcta, ya que la glicólisis es una de las vías metabólicas elementales en la obtención de ATP.

Transporte y metabolismo de nucleótidos

En esta sub categoría las proteínas que muestran un aumento son la ribonucleósido difosfato reductasa (Msed_1716) y una proteína perteneciente a la superfamilia HIT (histidine triad) (Msed_0726). La ribonucleósido difosfato reductasa (RNR) es la enzima limitante en la síntesis de DNA, la que se encarga de catalizar la reducción de diferentes ribonucleótidos en los desoxiribonucleótidos correspondientes (Sengupta y Holmgren

2014). Para el correcto funcionamiento de la RNR, se requiere de la acción de thioredoxinas (Sengupta y Holmgren 2014), lo que se relaciona con que una de las proteínas aumentadas en esta condición era un tipo de thioredoxina.

Las proteínas de la súper familia HIT corresponden a un grupo de proteínas que poseen un dominio de unión a nucleótidos (Brenner y col. 1999). Como ejemplo de la importancia de estas proteínas en el metabolismo energético de la célula se puede mencionar el del caso de la “*Histidine Triad Nucleotide Binding Protein I*” de *E. coli*, la que tiene como función regular la acción de la D-alanina deshidrogenasa, enzima involucrada en el catabolismo de la alanina para generar piruvato (Bardaweel y col. 2011).

Producción y conversión de energía

Dentro de la categoría funcional de metabolismo, las más numerosas son las que corresponden a la subcategoría de producción y conversión de energía, estas son: las sub unidades B y C de la NADH deshidrogenasa (Msed_2012 y Msed_1896), enzima involucrada directamente en la fosforilación oxidativa. La otra proteína que se observa aumentada es la cadena I de la NADH quinona oxidoreductasa (Msed_1899), también involucrada en la cadena transportadora de electrones (Brandt 2006). Por último, la cuarta proteína aumentada es la ruberitina (Msed_0296), que pertenece a la familia de las proteínas similares a ferritinas (Andrews 2010). La ruberitina se cree que actúa como una peróxido reductasa (Weinberg y col. 2004; Kurtz 2006) disminuyendo el estrés provocado por peróxido de hidrogeno.

Metabolismo y transporte de coenzimas

La enzima que presenta un aumento en su nivel en esta sub categoría funcional, es la nicotinamida-nucleotido adeniltransferasa, la que sintetiza NADP⁺ a partir de ATP y NAD⁺ (Zhai y col. 2009).

Procesamiento y señalización celular

Modificaciones post traduccionales, intercambio de proteínas y chaperonas

La proteína codificada por el gen *Msed_0787* está anotada como una proteína hipotética que posee un dominio tioredoxina, además de ser una posible DsbH, una oxidoreductasa (Mac y col. 2008). Las proteínas de la familia Dsb (Disulfide bond) tienen como función la formación de puentes de disulfuro tanto como la isomerización de puentes mal hechos; esta función hace pensar que el aumento en la expresión de esta posible DsbH tiene correlación con la necesidad de la célula de corregir la formación de puentes disulfuro presentes en ciertas proteínas de la célula, los que fueron posiblemente dañados por la acción del metal.

Otra de las proteínas que aumenta su nivel en esta categoría es la codificada por el gen *Msed_0153*, anotada como una proteína con dominio similar a glutaredoxina. Las glutaredoxinas son oxidorreductasas pequeñas de la familia de las tioredoxinas que regulan el estado redox de los grupos sulfidrilo de las proteínas (Lillig y Berndt 2013).

La tercera proteína que aumenta su nivel en esta sub categoría es la Hsp 20 (Heat shock protein 20). Las proteínas pertenecientes a la familia Hsp están presentes en todas las células, tanto eucariotes como procariontes y se ven inducidas principalmente en condiciones de estrés celular y pese a que su nombre dice relación con una respuesta a la exposición al calor no todas son inducidas mediante esta forma de estrés (Kiang y Tsokos 1998).

Almacenamiento y procesamiento de información

Traducción; estructura ribosomal y biogénesis

En esta sub categoría junto con una proteína no caracterizada, se observa el aumento de un componente del exosoma (Rrp4). El exosoma es el complejo encargado de la degradación y la adenilación post transcripcional del RNA en eucariontes y arqueas. Específicamente la proteína Rrp4, que forma parte del exosoma, tiene como función otorgarle la especificidad de unión a las colas poliA de los RNAs (Witharana y col. 2012). En un contexto celular en que la célula está sometida a un estrés por parte del cobre en el medio, quizás la degradación de RNAs para la utilización de los nucleótidos que lo componen en otros procesos celulares, sea una forma de atenuar el daño producido por el metal. Por lo que el aumento de esta proteína parte del exosoma, sería un reflejo de esta situación.

Replicación; recombinación y reparación

Una de las proteínas que aumenta en esta sub categoría esta anotada como de unión a ácidos nucleicos con un dominio OB (oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold), tipo RNA helicasa. La arquitectura de los dominios OB presenta una cara de unión que se ha adaptado para unirse a diferentes ligandos. El dominio OB es un barril beta cerrado de cinco a seis hebras formado por 70 a 80 aminoácidos. Los hilos están conectados por bucles de longitud variable que forman los apéndices funcionales de la proteína. La mayoría de las proteínas OB utilizan la misma cara de unión al ligando como un sitio activo. Diferentes proteínas-OB utilizan esta cara, para unir oligosacáridos, oligonucleótidos, proteínas, iones metálicos y sustratos catalíticos.

La DNA primasa (DnaG) también se encuentra aumentada en esta condición, esta enzima es la que sintetiza los fragmentos cortos de RNA que servirán de partidores en la replicación del DNA (Frick y Richardson 2001).

Transcripción

La sub unidad M de la RNA polimerasa se encuentra aumentada, además de un regulador transcripcional perteneciente a la familia PadR.

La sub unidad M de la RNA polimerasa corresponde a un factor de transcripción que se encarga de la escisión de la RNA polimerasa del RNA sintetizado (Hausner y col. 2000).

Los reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia PadR están relacionados con proteínas que controlan la expresión de genes asociados con la desintoxicación, la virulencia y la resistencia a múltiples fármacos en las bacterias (Guntur y col. 2012).

Proteínas poco caracterizadas

Dentro de esta categoría se han descrito sólo algunas con dominios funcionales, lo que da un indicio de que proteína podría ser o que eventual función podría tener.

Predicción general de la función

Una de las proteínas identificadas posee un dominio Pac (de las siglas en ingles: Proteasome Assembly Chaperones) (Ramos y Dohmen 2008). Esto habla del posible favorecimiento en el ensamblaje del proteosoma en las condiciones de adaptación a cobre.

La otra proteína identificada posee un dominio de la familia PBP (phospholipid-binding protein), los miembros de esta familia mejor descritos son las anexinas, las que en presencia de Ca^{2+} se unen a fosfolípidos (Schlaepfer y col. 1987).

A continuación se presenta un análisis de las proteínas que disminuyen su nivel significativamente en células de *M. sedula* adaptadas a 16 mM de cobre y que fueron descartadas por el análisis de enriquecimiento. Se ordenan y presentan según su subdivisión en categorías funcionales.

Metabolismo

Transporte y metabolismo de iones inorgánicos

Una proteína con un dominio N terminal TrkA se ve disminuida en esta condición. Este tipo de dominio es uno de los pertenecientes a la categoría de SMBD (por las siglas en inglés de: dominio de unión a moléculas pequeñas), dominios que muchas veces están involucrados en respuestas alostéricas de proteínas (Anantharaman y col. 2001). Específicamente el dominio N terminal TrkA está involucrado en la regulación de procesos redox y su molécula de unión es el dinucleótido de nicotinamida (Anantharaman y col. 2001).

Transporte y metabolismo de aminoácidos

Esta sub categoría funcional es una de las que más proteínas posee, lo que quizás refleja la importancia del metabolismo de aminoácidos en la respuesta a cobre.

La proteína que presenta la mayor disminución es la arginina deaminasa, que cataliza el primer paso en la vía de degradación de la arginina (Fenske y Kenny, 1976).

La N2-acetil-L-Lisina deacetilasa, cataliza la reacción de formación de lisina.

La antranilato sintasa (glutamina amidotransferasa) es otra de las enzimas que disminuye su nivel y cataliza el primer paso en la síntesis de triptófano (Romero y col. 1995).

Por último, la 2-isopropilmalato sintasa también se encuentra disminuida en esta condición, enzima encargada de formar malato a partir de acetil-CoA y ácido alfa-cetoisovalérico en la primera etapa de la síntesis de leucina (Frantom 2012).

Las cuatro proteínas mencionadas tienen que ver con la síntesis o la degradación de un aminoácido. Por lo general la síntesis de aminoácidos es un proceso que involucra varias enzimas y además el aporte de energía. Quizás en esta condición la célula intenta ahorrar energía desactivando los procesos que la requieren, y que no están relacionados directamente con la resistencia al metal y por ello la síntesis de aminoácidos se vería mermada.

Cabe destacar un efecto paradójico en la vía de síntesis de la leucina. Como se mencionó, existe una enzima de esta vía que está aumentada, la 3-isopropilmalato dehidratasa. Y dentro de las proteínas que disminuyen su producción está la 2-isopropilmalato sintasa, miembro de la misma vía. La explicación a este comportamiento paradójico puede ser el hecho de que la síntesis de leucina tiene dos vías principales, una que utiliza directamente piruvato como sustrato, en la que está involucrada la 3-isopropilmalato dehidratasa que aumenta su nivel. Y otra vía que también utiliza piruvato en su inicio, pero proviene de una ramificación de la síntesis de valina, por lo que se hace más larga y compleja, es en esta en la que está involucrada la 2-isopropilmalato sintasa (ver figura 40). Esto hace suponer que la célula está favoreciendo la vía más corta en la formación del aminoácido y depreciando la vía energéticamente menos conveniente. Lo que concuerda con la idea que la célula aprovecha al máximo su capacidad para ahorrar energía en las condiciones de adaptación a cobre.

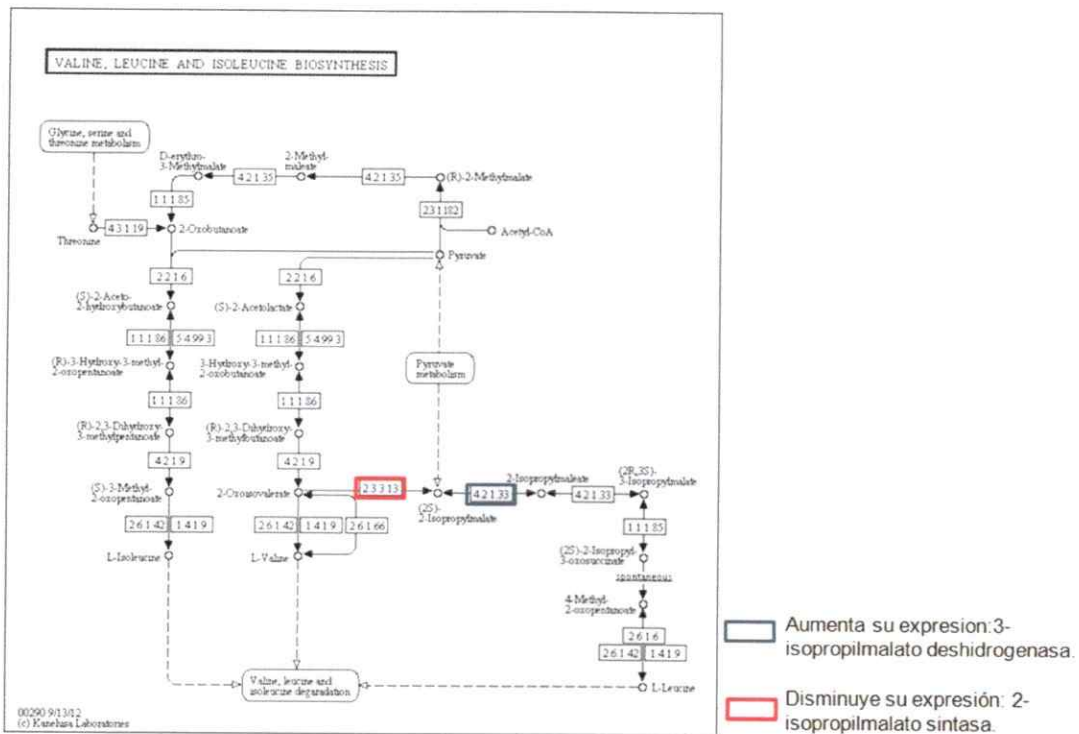


Figura 40. Vía metabólica de la síntesis de leucina. Se aprecian las dos vías que derivan en la síntesis de leucina. Se pueden distinguir las proteínas que fueron identificadas mediante iTRAQ. La 2- isopropilmalato sintasa que disminuye su expresión (rectángulo rojo) y la 3- isopropilmalato deshidrogenasa que aumenta su expresión (rectángulo azul).

Transporte y metabolismo de carbohidratos

El transportador de trehalosa tipo ABC está disminuido en la condición de exposición a 16 mM de cobre. Este transportador, como su nombre lo indica, tiene la función de transportar trehalosa hacia el interior de la célula, aunque también se ha descrito que transportadores similares pueden transportar otros tipos de azúcares como sacarosa (Silva y col. 2005).

Transporte y metabolismo de nucleósidos

La fosforibosilformilglicinamida es una enzima involucrada en la síntesis de purinas (Anand y col. 2004), la que se encuentra disminuida en esta condición de crecimiento.

Producción y conversión de energía

La subunidad I de la citocromo C oxidasa se encuentra disminuida en las células adaptadas a cobre 16 mM. Este dato pareciera ir en contra de lo observado con anterioridad en las proteínas que aumentan su nivel, ya que existen algunas proteínas involucradas en la cadena transportadora de electrones que se ven aumentadas. Quizás esta disminución en la subunidad I de la citocromo C oxidasa se deba a que a temperaturas elevadas la solubilidad del oxígeno disminuye hasta un 60% en comparación a la que posee a temperatura ambiente (Wilhelm y col. 1977). Por lo que posiblemente esta subunidad disminuya su expresión y se aumente otra subunidad alterna, aun no identificada, que posea mayor afinidad por oxígeno como se describe para otros termófilos (Radzi y Soulimane 2012).

Una ferredoxina tipo 4Fe-4S se encuentra disminuida en esta condición. Estas proteínas están involucradas en una gran variedad de reacciones que involucran el traspaso de electrones (Romberger y Golbeck 2010).

Transporte y metabolismo de coenzimas

Una proteína relacionada a la dihidropterato sintasa, involucrada en la síntesis de ácido fólico. Es la enzima encargada de catalizar la condensación del ácido para amino benzoico y la pteridina para formar ácido dihidropteroico (Sköld 2000)

Transporte y metabolismo de lípidos

La sintasa y ligasa dependiente de AMP corresponde a una enzima necesaria para la síntesis de ácidos grasos de cadena larga esta enzima al parecer actúa mediante la unión de AMP a sus sustratos, esta unión es dependiente de ATP.

Una proteína descrita con un dominio similar a la Acyl-CoA deshidrogenasa disminuye. La Acil-Coa deshidrogenasa, enzima que cataliza la alfa, beta deshidrogenación de los ésteres de acil- CoA en el catabolismo de los ácidos grasos y los aminoácidos.

(Swigonová y col. 2009).

Por último, la metil-malonil CoA mutasa, responsable de la isomerización del metil manoil CoA a succinil CoA (Takahashi-Iñiguez y col. 2012). Como se sabe el succinil CoA es un intermediario del ciclo de Krebs. Anteriormente se habían visto enzimas del ciclo de Krebs aumentadas, lo que hacía pensar que la célula estaba tratando de obtener energía. La disminución en esta enzima que genera una molécula perteneciente al ciclo de Krebs a partir del catabolismo de ácidos grasos, hace pensar que la célula no utiliza la degradación de ácidos grasos de manera preferente para generar energía sino que preferiría otras vías.

Procesamiento y señalización celular

Mecanismos de señal y transducción

Para esta categoría se describe la disminución de una proteína con un dominio FHA (forkhead-associated domain). Este dominio reconoce fosfopéptidos en muchas proteínas reguladoras (Hofmann y Bucher 1995).

Información almacenamiento y procesamiento

Traducción; estructura ribosomal y biogénesis

Al menos tres proteínas relacionadas con la estructura del ribosoma se encuentran disminuidas en esta condición. Una de ellas es la proteína ribosomal S15 una de las primeras en acoplarse al RNA 16S donde coopera con la nucleación y el ensamblaje de la sub unidad 30S. Las otras dos son los constituyentes del ribosoma, las proteínas L34E

y S30E. Si se atribuye una disminución de la estructuración del ribosoma a causa de estas disminuciones, se podría asumir que la traducción de proteínas se ve mermada debido a que se ensamblan menos ribosomas, por lo que la síntesis *de novo* de proteínas en esta condición se vería disminuida.

Transcripción

Un regulador transcripcional de la familia AbrB se encuentra disminuido.

Dinámica y estructura de la cromatina

La proteína Cren7 que corresponde a una histona altamente conservada (Feng y col. 2010) también se encuentra disminuida en esta condición. Estas proteínas juegan un rol importante en la compactación del nucléolo para la organización funcional del DNA genómico (Driessen y col. 2013).