

UCH - FC
DOC - Microbiología
066

**ESTUDIO DE LOS DETERMINANTES DE RESISTENCIA AL COBRE
EN LA ARQUEA TERMOACIDÓFILA
*SULFOLOBUS METALLICUS***



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

Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología



Facultad De Ciencias

Por

Alvaro Francisco Orell Ruiz

Junio, 2010

**Director de Tesis
Dr. Carlos A. Jerez**

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.

Alvaro Francisco Orell Ruiz

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el 20 de Mayo de 2010

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

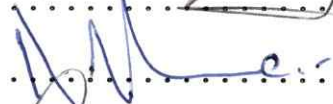

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos


.....

Dr. Romilio Espejo


.....

Dr. Omar Orellana


.....





*Dedicado a mis padres Flor, María y Alvaro
a mi hermana Pía y
a Rafaela por todo su amor y apoyo*



AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en primer lugar la acogida que tuve en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en especial a los miembros del comité del doctorado en Ciencias mención Microbiología. Quisiera también expresar mi agradecimiento a los profesores que integraron la comisión evaluadora de este trabajo doctoral, de quienes recibí sugerencias e ideas que contribuyeron enormemente en mi formación académica.

Especial agradecimiento le debo al Profesor Dr. Carlos A. Jerez, de quién recibí tanto apoyo personal como académico. Agradezco particularmente su confianza e inspiración. Durante nuestra relación académica, por más de 7 años, he aprendido de su pasión por el trabajo científico, la dedicación y la incansable búsqueda por hacer bien las cosas. Durante todos estos años, el "profe" Carlos ha sabido comprender mi situación familiar brindándome apoyo en cada ocasión que necesité estar con ellos. También agradezco al Dr. Francisco Chavez por su amistad, y por sus aportes y comentarios siempre oportunos durante todo el desarrollo de mi Tesis.

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio, que me acompañaron durante estos años. En primer lugar a Claudio Navarro, compañero en el subgrupo de "los metales pesados", con quien compartí mis inquietudes científicas y de la vida, lo que se ha traducido en una gran amistad. A Simón Beard, por todos sus aportes y comentarios, además de su amistad generosa. Especial agradecimiento a Rafaela Arancibia por su colaboración en los experimentos de PCR en tiempo real y sus innumerables comentarios y visión crítica. A Rodrigo Arreniuz por sus ideas y ayuda en los experimentos de electroforesis bidimensional. A Daniela Soto, por su colaboración en los experimentos de proteómica comparativa en *S. solfataricus*, y quien continuará la investigación en los termoacidófilos. A Juan Araos por su generosidad, su ayuda siempre incondicional, y gran calidad humana. Por supuesto a todos los compañeros de laboratorio que se han ido integrando en el último año. También a los que ya han dejado el laboratorio, en especial al Dr. Nicolás Guilliani, Dr. Sergio Alvarez, Dr. Francisco Remosellez, Dr. Mario Vera, Dra. Lissette Valenzuela, Dr. Felipe Gordillo, Ms. Mauricio Acosta, Ms. Fernando Pagliai, Cristian Varela y Cecilia Mauriaca.

Quisiera también agradecer al grupo de la Dra. Margarita Carú, en especial a la Dra. Julieta Orlando y Catalina Zuñiga por toda su ayuda en los experimentos de RFLP. Especial agradecimiento a la Dra. Sonja Albers de la Universidad de Groningen en Holanda, por recibirme amablemente en su laboratorio y por su generosidad científica.

Mis estudios de postgrado no hubieran sido posible, sin el financiamiento económico otorgado por el Gobierno de Chile a través del programa MECESUP UCH407 para el financiamiento de mis estudios y CONICYT en el financiamiento de la estadía de investigación en la Universidad de Groningen, y por la beca de extensión que me permitió finalizar mis estudios. Especial mención para los fondos de financiamiento que permitieron la realización experimental de esta tesis: Proyecto Fondecyt 100679 y la Iniciativa Científica Milenio a través del Proyecto ICM P-99-031-F.

Todo el trabajo y la dedicación entregada a esta Tesis la dedico a mi madre Flor María, mi padre Alvaro, y mi hermana Pía, quienes me han apoyado incondicionalmente en cada locura que he emprendido. Especial dedicación le brindo a Rafaela por su amor, compañía, y paciencia. Rafaela ha sido mi apoyo fundamental para que todo esto se haya concretado.

Finalmente, no puedo dejar de mencionar a mis amigos, quienes han hecho más placentera mi estancia en la capital. Especialmente a Sergio Andrés, amigo, colega, prácticamente un hermano. También a todos los amigos músicos, con ellos he compartido uno de los regalos más placenteros que me ha dado la vida.





AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. El dominio <i>Archaea</i>	1
1.1.1. El árbol de la vida.....	1
1.1.2. Características del dominio <i>Archaea</i>	2
1.2. El género <i>Sulfolobus</i>	3
1.2.1. Características del género <i>Sulfolobus</i>	3
1.2.2. <i>Sulfolobus metallicus</i> y su utilización en biominería.....	4
1.3. El cobre y su relación con los sistemas biológicos.....	5
1.3.1 La relevancia biológica del cobre.....	5
1.3.2. Mecanismos de resistencia al cobre en bacterias.....	8
1.3.3. Resistencia al cobre en especies acidófilas.....	10
1.3.4. Mecanismos de resistencia al cobre en arqueas acidófilas.....	12
1.4. Los polifosfatos inorgánicos (poliP).....	17
1.4.1. Aspectos generales de los poliP.....	17
1.4.2. Funciones de los poliP.....	19
1.4.2. El papel de los poliP en la resistencia a metales pesados.....	20
2. MATERIALES y METODOS.....	24
2.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	24
2.1.1. <i>Sulfolobus metallicus</i>	24
2.1.2. <i>Sulfolobus solfataricus</i>	24
2.1.3. <i>Escherichia coli</i>	25



2.2. Técnicas generales de biología molecular.....	26
2.2.1. Extracción de DNA genómico.....	26
2.2.2. Extracción de DNA plasmidial.....	26
2.2.2. Cuantificación del DNA.....	27
2.2.3. Purificación de amplificados de PCR desde geles de agarosa y de otros fragmentos de DNA.....	27
2.2.3. Electroforesis del DNA en geles de agarosa.....	28
2.2.2. Reacciones de PCR.....	28
2.4.3. Reacciones de PCR en tiempo real.....	28
2.2.3. Clonamiento de los productos de PCR.....	30
2.2.4. Secuenciación de DNA.....	30
2.3. Búsqueda y aislamiento de los genes <i>cop</i> en el genoma de <i>S. metallicus</i>	31
2.3.1. Diseños de los partidores DOP y CODEHOP.....	32
2.3.2. Reacciones de PCR utilizando partidores degenerados (DOP-PCR) y partidores consenso degenerados (CODEHOP-PCR).....	32
2.3.3. Experimentos de “genome walking”.....	33
2.3.3.1. Construcción de un Adaptador de DNA.....	33
2.3.3.2. Construcción de las bibliotecas de digestión.....	34
2.3.3.3. Primera PCR: amplificación lineal.....	34
2.3.3.4. Segunda PCR: amplificación exponencial.....	35
2.4. Técnicas con RNA.....	37
2.4.1. Extracción del RNA total.....	37
2.4.2. Transcripción reversa.....	38
2.4.3. Experimentos de Northern Blot.....	39
2.4.3.1. Preparación de geles para Northern Blot.....	39
2.4.3.2. Tratamiento de las muestras de RNA.....	39
2.4.4.3. Electroforesis de las muestras de RNA en geles con agarosa-formaldehído.....	39
2.4.3.4. Transferencia desde gel de agarosa-formaldehído a membranas de nitrocelulosa.....	30
2.4.3.5. Hibridación y lavado de las membranas.....	40
2.4.3.6. Obtención de las imágenes.....	41



2.5. Generación de una cepa recombinante de <i>S. solfataricus</i> capaz de sobreexpresar el gen <i>ppx</i> endógeno.....	41
2.5.1. Subclonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>S. solfataricus</i> (<i>ppxS.so</i>) en pMZ1.....	41
2.5.2. Clonamiento del gen <i>ppxS.so</i> recombinante (<i>ppxS.so_r</i>) en el vector de expresión pMJ0503.....	42
2.5.3. Transformación de <i>S. solfataricus</i> M16 con pJ0503- <i>ppxS.so_r</i>	43
2.6. Métodos de extracción y cuantificación de polifosfato (poliP).....	44
2.6.1. Extracción del poliP endógeno de <i>S. solfataricus</i>	44
2.6.2. Cuantificación del poliP endógeno de <i>S. solfataricus</i>	45
2.7. Ensayos de resistencia a cobre en <i>S. solfataricus</i> M16-PPX.....	46
2.7.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cobre en <i>S. solfataricus</i> M16-PPX.....	46
2.8. Métodos para el análisis de proteínas.....	47
2.8.1. Preparación de extractos proteicos totales de <i>S. metallicus</i> y <i>S. solfataricus</i>	47
2.8.2. Cuantificación de proteínas.....	47
2.8.3. Electroforesis de proteínas en minigeles de poliacrilamida-SDS.....	48
2.8.4. Preparación de las muestras de proteínas de membrana de <i>S. metallicus</i> para electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE (2D-PAGE).....	48
2.8.5. Electroforesis bidimensional de proteínas IEF/SDS-PAGE (2D-PAGE).....	49
2.8.6. Tinción con nitrato de plata de los geles bidimensionales.....	50
2.8.7. Selección de proteínas de los geles 2D-PAGE y secuenciación por espectrometría de masas.....	51
2.8.8. Expresión y purificación de la proteína PPX recombinante (PPXr) de <i>S. solfataricus</i>	52
2.8.9. Detección inmunológica de las proteína PPXr de <i>S. solfataricus</i> mediante “Western-blotting”.....	53
2.9. Métodos bioinformáticos.....	54
3. Resultados.....	55
3.1. Búsqueda de genes <i>cop</i> de resistencia al cobre en el genoma de <i>S. metallicus</i>	55
3.1.1. Determinación de la presencia de genes <i>cop</i> en el genoma de <i>S. metallicus</i>	55



3.1.2. Aislamiento de los genes <i>cop</i> desde el genoma de <i>S. metallicus</i> mediante “genome walking”.....	59
3.1.3. Análisis de las secuencias aminoacídicas codificadas en las regiones genómicas <i>cop1</i> y <i>cop2</i> de <i>S. metallicus</i>	63
3.2. Caracterización de la expresión de los genes <i>cop</i> putativos de <i>S. metallicus</i>	67
3.2.1. Determinación de la expresión de los genes <i>copA1</i> y <i>copA2</i> de <i>S. metallicus</i> en presencia de distintos metales.....	67
3.2.2. Análisis de co-expresión de los genes <i>copM</i> y <i>copA</i> de <i>S. metallicus</i>	69
3.2.3. Análisis de la expresión diferencial de los genes <i>copA1</i> , <i>copA2</i> , <i>copT1</i> y <i>copT2</i> de <i>S. metallicus</i> crecido en la presencia de distintas concentraciones de cobre.....	70
3.2.3.1. Crecimiento de <i>S. metallicus</i> en la presencia de distintas concentraciones de cobre.....	70
3.2.3.2. Cuantificación de los niveles de transcrito de los genes <i>copA1</i> , <i>copA2</i> , <i>copT1</i> y <i>copT2</i> de <i>S. metallicus</i> expuesto a distintas concentraciones de cobre.....	72
3.3. Efecto del cobre en el proteoma de membrana de <i>S. metallicus</i>	75
3.3.1. Análisis de la expresión diferencial de las proteínas de membrana de <i>S. metallicus</i> expuesto a CuSO_4	76
3.3.2. Identificación de las proteínas de <i>S. metallicus</i> que cambiaron su expresión en respuesta a la exposición al cobre.....	79
3.4. Generación de una cepa recombinante de <i>S. solfataricus</i> incapaz de acumular poliP inorgánicos.....	83
3.4.1. Estrategia para la eliminación del contenido de poliP de <i>S. solfataricus</i>	84
3.4.1.1. Subclonamiento del gen <i>ppx</i> de <i>S. solfataricus</i> (<i>ppxS.so</i>) en <i>pMZ1</i>	85
3.4.1.2. Clonamiento del gen <i>ppxS.so_r</i> en el vector de expresión <i>pMJ0503</i>	86
3.4.1.3. Ensayos de expresión en <i>S. solfataricus</i> M16.....	86
3.4.1.4. Contenido de poliP en los recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX.....	87
3.4.2. Evaluación de la resistencia al cobre de la cepa de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX carente de poliP (<i>poliP</i> -).....	89
3.4.2.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de CuSO_4 de la cepa de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (<i>poliP</i> -).....	89
3.4.2.2. Efecto de la adición de CuSO_4 en el crecimiento de la cepa <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (<i>poliP</i> -).....	91



3.4.5. Cambios en el proteoma total de las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-).....	94
4. Discusión.....	102
4.1. Ocurrencia de los genes <i>cop</i> de resistencia al cobre en el genoma de <i>S. metallicus</i>	102
4.2. Los genes <i>cop</i> de <i>S. metallicus</i> se expresan en respuesta al cobre.....	106
4.2. Búsqueda de otros determinantes de resistencia al cobre en <i>S. metallicus</i>	111
4.4. Los polifosfatos (poliP) y su papel en la resistencia al cobre en especies del genero <i>Sulfolobus</i>	115
5. Conclusiones.....	123
6. Referencias.....	125
7. Anexos.....	132

INDICE DE FIGURAS



Figura 1. Árbol filogenético de la vida.....	2
Figura 2. Mecanismos de resistencia al cobre en bacterias.....	9
Figura 3. Organización genética del loci <i>cop</i> en <i>Archaea</i>	14
Figura 4. Modelo de resistencia al cobre en <i>S. solfataricus</i>	15
Figura 5. Polifosfatos inorgánicos (poliP) y gránulos de poliP en <i>S. metallicus</i>	17
Figura 6. Modelo de destoxificación de metales pesados mediado por los poliP en bacterias.....	21
Figure 7. Estrategía de “genome walking” desarrollada por Acevedo y col.....	36
Figura 8. Representación esquemática del grupo de genes <i>cop</i> en <i>S. solfataricus</i>	56
Figure 9. Amplificación parcial de los probables genes <i>copM</i> , <i>copA</i> y <i>copT</i> mediante DOP-PCR, CODEHOP-PCR y PCR específico desde el genoma de <i>S. metallicus</i>	57
Figura 10. Productos de “genome walking” para la identificación de las regiones desconocidas de los genes <i>cop</i> de <i>S. metallicus</i>	60
Figura 11. Representación esquemática de los 2 grupos de genes <i>cop</i> aislado desde el genoma de <i>S. metallicus</i>	61
Figura 12. Búsqueda “ <i>in silico</i> ” de secuencias promotoras en los loci <i>cop</i> de <i>S. metallicus</i>	62
Figura 13. Alineamiento de las proteínas putativas CopA1 y CopA2 de <i>S. metallicus</i> con las ATPasas de cobre CopA de <i>E. coli</i> y CopB de <i>E. hirae</i>	65
Figura 14. Alineamiento de las proteínas putativas CopM presentes en <i>S. metallicus</i> y en otras arqueas <i>Sulfolobales</i>	66
Figura 15. Alineamiento de las proteínas putativas CopT presentes en <i>S. metallicus</i> y en otras arqueas <i>Sulfolobales</i>	67
Figure 16. Análisis de Northern blot para determinar la expresión de los genes <i>copA1</i> y <i>copA2</i> de <i>S. metallicus</i> en respuesta a varios metales.....	68
Figura 17. Análisis de la co-expresión de los genes <i>copM</i> y <i>copA</i> en <i>S. metallicus</i>	70

Figura 18. Efecto del cobre en el crecimiento de <i>S. metallicus</i>	71
Figura 19. Cuantificación relativa de los niveles de transcritos de los genes <i>copA1</i> , <i>copA2</i> (A) y <i>copT1</i> , <i>copT2</i> (B) de <i>S. metallicus</i>	73
Figura 20. Separación de las proteínas de membrana de <i>S. metallicus</i> expuesto a CuSO_4 mediante 2D-PAGE.....	78
Figura 21. Detalle amplificado de las secciones de los geles bidimensionales mostrados en la figura 19.....	79
Figura 22. Subclonamiento del gen <i>ppxS.so</i> en el vector pMZ1.....	85
Figura 23. Purificación de la PPXr de <i>S. solfataricus</i> y Western blotting con anti-his.....	87
Figura 24. Niveles de poliP en las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX y cinética de degradación de los poliP.....	88
Figura 25. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de CuSO_4 en las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-).....	90
Figure 26. Efecto de la adición de CuSO_4 en el crecimiento de la cepa recombinante <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-).....	92
Figura 27. Contenido de poliP de células de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP+) expuestas a CuSO_4	94
Figura 28. Cambios en el proteoma total de las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-).....	96
Figura 29. Rutas metabólicas centrales en <i>S. solfataricus</i>	119
Figura 30. Modelo cualitativo de los posibles mecanismos de resistencia al cobre en <i>S. metallicus</i>	122





INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones máximas de cobre en las cuales se ha reportado el crecimiento para algunos microorganismos acidófilos y neutrófilos.....	11
Tabla 2. Comparación de las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes <i>cop</i> de <i>S. metallicus</i> con sus ortólogos presentes en otros microorganismos <i>Sulfolobales</i>	64
Tabla 3. Inducción de los niveles de transcrito de los genes <i>copA1</i> , <i>copA2</i> , <i>copT1</i> y <i>copT2</i> de <i>S. metallicus</i> en presencia de distintas concentraciones de cobre.....	75
Tabla 4. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masas que cambian sus niveles cuando <i>S. metallicus</i> se creció en distintas concentraciones de CuSO_4	80
Tabla 5. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-).....	99
Tabla 6. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-).....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE	: electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida
ADP	: adenosín difosfato
Ara	: Arabinosa
ATP	: adenosín trifosfato
BLAST	: basic local alignment search tool
BSA	: seroalbúmina de bovino
CHAPS	: 3-[(3-cocamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CMI	: concentración mínima inhibitoria
DEPC	: dietilpirocarbonato
DMSO	: dimetilsulfóxido
DNA	: ácido desoxirribonucleico
DO₆₀₀	: densidad óptica a 600 nm
DTT	: ditioneitol
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
GITC	: isotiocianato de guanidina
Glu	: glucosa
HSP	: proteína de estrés térmico
IEF	: isoelectroenfoque
kDa	: kiloDalton
LB	: Luria-Bertani
MOPS	: Ácido morfolino-orto-propansulfónico
NAD	: nicotinamin adenina dinucleotido
NADH	: nicotinamin adenina dinucleotido reducido
ORF	: marco de lectura abierto
PAGE	: electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	: pares de bases
PBS	: solución amortiguadora de fosfato
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa
Pi	: ortofosfato
Pit	: transportador inorgánico de fosfato
PMSF	: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
poliP	: polifosfato inorgánico
PPK	: polifosfato quinasa
PPX	: exopolifosfatasa
PPXr	: exopolifosfatasa recombinante
PSA	: persulfato de amonio
RNA	: ácido ribonucleico
RND	: división de nodulación y resistencia (Resistance Nodulation Division)
SDS	: dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida
TAE	: Tris, acetato, EDTA
TBS	: Amortiguador Tris salino
TEM	: microscopía electrónica de transmisión
TEMED	: tetrametiletildiamino

RESUMEN

Sulfolobus metallicus es un arqueón termoacidófilo capaz de oxidar fierro y azufre, ampliamente utilizado en la extracción de cobre desde minerales como la calcopirita, durante el proceso de biolixiviación. El uso exitoso de este microorganismo se debe en gran medida a su capacidad de prosperar en ambientes con altas concentraciones de metales pesados y a altas temperaturas de crecimiento, que aceleran los procesos de biolixiviación.

El cobre es un importante cofactor para varias enzimas involucradas en diversos procesos celulares. Mientras que cantidades trazas de este metal son esenciales para la vida, su exceso puede catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno causando importantes daños celulares. Es así como procariontes y eucariontes han desarrollado diversos mecanismos de resistencia con el fin de evitar los efectos nocivos del cobre.

Recientemente demostramos que *S. metallicus* es capaz de crecer en la presencia de hasta 200 mM de CuSO_4 (Remonsellez y cols., 2006). Este nivel de resistencia al cobre presentado por *S. metallicus* es uno de los más altos reportados a la fecha, y supera en 40 veces la resistencia que muestran otras especies del género *Sulfolobus* y de bacterias como *Escherichia coli* y *Enterococcus hirae*. Hasta ahora no existen estudios sobre los mecanismos genéticos y bioquímicos que le permiten a *S. metallicus* prosperar en tan altas concentraciones de cobre. La comprensión de estos mecanismos podría ser de mucha utilidad en potenciales mejoras genéticas de los microorganismos biolixiviantes para aumentar la eficiencia de los procesos de biolixiviación.

Aunque la resistencia al cobre ha sido ampliamente estudiada en bacterias, se tiene escasa información sobre los mecanismos de resistencia a este metal en arqueas.

Recientemente se ha identificado un grupo de genes (*cop*) de resistencia al cobre altamente conservado en algunas especies del dominio *Archaea*. Éste incluye un transportador de tipo ATPasa posiblemente involucrada en la exportación del metal (*copA*), una metalochaperona de cobre (*copM*) y un regulador transcripcional (*copT*) que controlaría la expresión de los genes *cop*. Debido a que aún no se dispone de la secuencia genómica de *S. metallicus*, utilizamos las estrategias de CODEHOP-PCR y "genome walking" para buscar y aislar los genes *cop* en este microorganismo. Aquí, reportamos la presencia en el genoma de *S. metallicus* de 2 loci *cop* (*cop1* y *cop2*), con la estructura *copT1*, *copM1*, *copA1* y *copT2*, *copM2*, *copA2*, respectivamente. Esta duplicación génica constituiría una característica inédita para un representante del dominio *Archaea* y podría explicar en parte la elevada resistencia al cobre que muestra *S. metallicus*.

Mediante análisis transcripcionales determinamos que los pares génicos *copMA1* y *copMA2* se cotranscriben y los niveles de los mRNA policistrónicos aumentan concomitantemente por la adición externa de Cu^{2+} o cuando se generó este ión metálico producto de la oxidación de la calcopirita por el microorganismo. La expresión de estas ATPasas (CopA1 y CopA2) en la presencia de cobre sugiere que el sistema de transporte está funcionando para permitir la salida del metal. Adicionalmente, reportamos en *S. metallicus* que mientras el gen *copT2* mostró una expresión constitutiva, los niveles del transcrito *copT1* aumentaron en la presencia de Cu^{2+} .

Con el objetivo de encontrar otros posibles mecanismos responsables de la resistencia al cobre en *S. metallicus* analizamos la expresión diferencial de proteínas de membrana en células expuestas a Cu^{+2} . Así, se encontraron aumentadas proteínas involucradas en el estrés oxidativo y en el plegamiento y la degradación de las proteínas.

Estos resultados sugieren que la presencia de cobre produce daño oxidativo, que afectaría la integridad de las proteínas, evidenciando que esta arquea usa múltiples mecanismos para resistir las altas concentraciones de cobre.

Otro posible mecanismo adicional de resistencia al cobre en especies del género *Sulfolobus* comprendería a los polifosfatos (poliP). En nuestro grupo hemos demostramos que *S. metallicus* acumula altas cantidades de este polímero, y que cuando esta arquea se expone a cobre, los poliP se degradan progresivamente, lo que es acompañado por el exporte de iones fosfato, y supuestamente de los cationes de cobre, desintoxicando de esta forma el ambiente intracelular (Remonsellez y col., 2006). Para evaluar la contribución del metabolismo de los poliP en la resistencia al cobre en los *Sulfolobales*, y debido a que no se dispone de herramientas para la manipulación genética en *S. metallicus*, generamos una cepa recombinante de *S. solfataricus* incapaz de acumular poliP. Así, determinamos que esta cepa recombinante, carente de poliP, mostró una mayor sensibilidad al cobre demostrándose experimentalmente la participación de los poliP en la resistencia al metal. Adicionalmente, mediante un estudio preliminar sobre los cambios en el proteoma de la cepa de *S. solfataricus* carente de poliP, encontramos aumentadas proteínas relacionadas al ciclo de Krebs y al estrés oxidativo. Estos hallazgos sugieren la relevancia tanto en las funciones energéticas como regulatorias de los poliP en la cepa recombinante de *S. solfataricus* carente de poliP, lo que podrían explicar su mayor sensibilidad al cobre.

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten concluir en conjunto que los elementos claves en la resistencia al cobre en *S. metallicus* parecen ser la duplicación de genes *cop* de resistencia al cobre, un mecanismo basado en la acumulación de poliP y una respuesta defensiva ante el estrés oxidativo.

ABSTRACT

Sulfolobus metallicus is a thermoacidophile archaea capable of oxidizing iron and sulfur. It is widely used in the extraction of copper from minerals such as chalcopyrite in the process of bioleaching. This microorganism is successfully used in bioleaching processes mainly due to its capacity to survive in environments with high heavy metal concentrations and to grow at high temperatures, where the bioleaching processes are favored.

Copper is an important cofactor for several enzymes involved in diverse cellular processes. While trace amounts of copper are essential for life, an excess of this metal can catalyze the formation of reactive oxygen species triggering significant cellular damage. In order to avoid the harmful effects of copper prokaryotes and eukaryotes have developed numerous mechanisms involved in the resistance to this metal.

Our laboratory recently demonstrated that *S. metallicus* is able to grow in the presence of up to 200 mM CuSO₄ (Remonsellez et al., 2006). The level of copper resistance presented by *S. metallicus* accounts as one of the highest reported to date, exceeding in over 40 times the resistance found in other species of the genus *Sulfolobus* and of bacteria, including *Escherichia coli* and *Enterococcus hirae*. Thus far, there are no studies on the prospective genetic and biochemical mechanisms that enable *S. metallicus* to thrive in such high concentrations of copper. Understanding these mechanisms could be particularly useful in potential genetic improvement of the bioleaching microorganisms, which could likely increase the efficiency of bioleaching processes in due course.

Although resistance to copper has been widely studied in bacteria, the reported information on mechanisms of resistance to this metal in archaea is very scarce. Recently a

highly conserved group of genes (*cop*) related to the resistance to copper was identified in some species of *Archaea*. Considering that the genomic sequence of *S. metallicus* is not yet available we made use of strategies such as CODEHOP-PCR and “genome walking” in order to look and isolate for the *cop* genes in this microorganism.

Interestingly, we found two *cop* loci (*cop1* and *cop2*) within the genome of *S. metallicus*, having the genomic structure *copT1*, *copM1*, *copA1* and *copT2*, *copM2*, *copA2*, respectively. This finding would constitute an unprecedented feature for a representative of the *Archaea* domain. Such a genetic duplication could somewhat explain the high resistance to copper detected in *S. metallicus*.

Moreover, we determined that the genetic pair *copMA1* and *copMA2* are cotranscribed. In fact, the levels of detected polycistronic mRNA concomitantly increased in the presence of Cu^{2+} or when the organism uses chalcopyrite as an energy source. The expression of these ATPases (CopA1 and CopA2) in the presence of copper suggests that the transport system is in effect working, enabling a steady output of copper. In addition, it we reported that *copT1* transcript levels were increased in the presence of Cu^{2+} , even while *copT2* showed a constitutive expression.

To find additional mechanisms potentially involved in the high resistance to copper in *S. metallicus*, we analyzed the differential expression of membrane proteins in cells exposed to Cu^{+2} . Several proteins which have been identified to be involved in cellular processes including oxidative stress and folding and degradation of proteins were found with increased expression. These results illustrate the fact that the presence of copper produces oxidative damage, which would in turn affect protein integrity, suggesting that this archaea makes use of multiple mechanisms in order to resist high copper concentrations.

Another potential mechanism involved in copper resistance in species of the genus *Sulfolobus* would involve polyphosphates (polyP). We have already demonstrated that *S. metallicus* accumulates high amounts of this polymer. Furthermore, when exposed to copper, polyP is progressively degraded, a process which is linked to the export of phosphate ions, presumably together with copper cations, thus detoxifying the intracellular environment (Remonsellez et al., 2006).

Since there are no tools for genetic manipulation in *S. metallicus*, to assess the contribution of polyP metabolism in copper resistance in *Sulfolobales*, we generated a recombinant strain of *S. solfataricus* which is incapable of accumulating polyP. This polyP deficient recombinant strain showed an augmented copper sensitivity, being an experimental demonstration of the involvement of polyP in copper resistance.

Additionally, through a preliminary study on the changes in the proteome of the *S. solfataricus* polyP deficient strain, we found an increased expression of proteins related to both the Krebs cycle and oxidative stress mechanism, which suggesting a link between the higher copper sensitivity of the *S. solfataricus* recombinant strain and the lack polyP.

Altogether, the results obtained in this study allow us to conclude that the key elements in the resistance to copper in *S. metallicus* appear to be the duplication of the copper resistance *cop* genes, a polyP-based accumulation mechanism and a defensive response to oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El dominio *Archaea*

1.1.1. El árbol de la vida

En 1990, Woese y col. basándose en la comparación de las secuencias nucleotídicas del RNA ribosomal 16S/18S, propuso que las arqueas constituyen un dominio independiente y separado de las bacterias. Desde entonces, se destruyó el paradigma de la existencia de procariontes y eucariontes, permitiendo de esta forma la construcción de un árbol filogenético universal que agrupa a los seres vivos en tres dominios, *Bacteria*, *Eukarya* y *Archaea* (Fig. 1A) (Woese y col., 1990).

Posteriormente, con el advenimiento de la secuenciación de los genomas de diferentes arqueas, que comenzaron con *Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum* y *Archaeoglobus fulgidus* (Bult y col., 1996; Smith y col., 1997), se puso en evidencia que dos tercios de los genes presentes en las arqueas no tienen homólogos en *Bacteria* y *Eukarya*, enfatizando de esta manera la posición genéticamente distinta del dominio *Archaea* en el árbol de la vida. Adicionalmente, estos análisis también demostraron que la transferencia lateral de genes se ha producido no sólo entre diferentes especies del dominio *Archaea*, sino también entre bacterias y arqueas, constituyendo así una fuerza importante en la evolución biológica (Nelson y col., 1999; Diruggiero y col., 2000; Olendzenski y col., 2000).

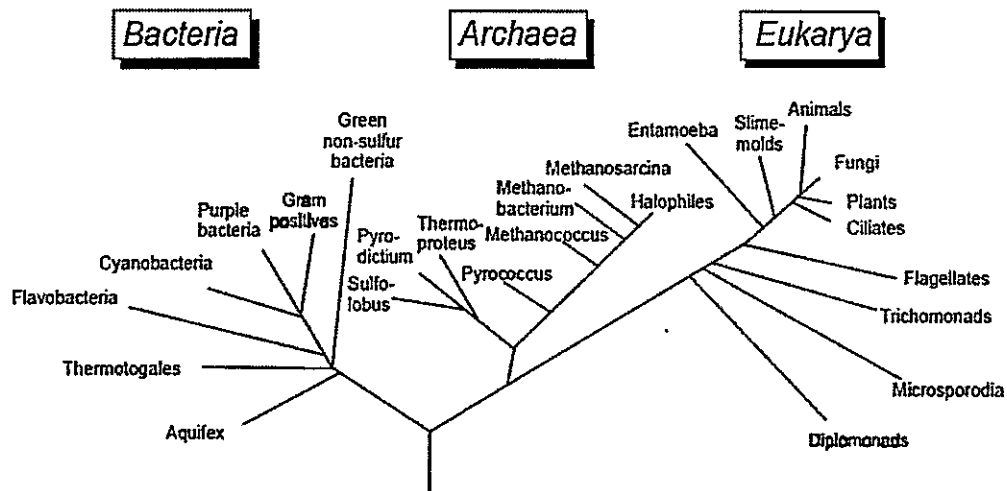


Figura 1. Árbol filogenético de la vida. El árbol filogenético de los tres dominios de la vida basado en las secuencias del RNAr 16S.

1.1.2. Características del dominio *Archaea*.

Desde la descripción de la primera arquea en 1972, *Sulfolobus acidocaldarius* (Brock y col., 1972), el número de microorganismos descritos que pertenecen a este dominio ha aumentado de forma constante. Muchas de estas arqueas prosperan en ambientes muy extremos, donde los parámetros físicos como la temperatura, la salinidad, el pH ó la presión muestran valores inesperados para el desarrollo de cualquier forma de vida. Así, muchos de los representantes de este dominio han suscitado especial interés como modelos estudio de la adaptación de la vida en condiciones extremas (Rajagopal y col., 1998).

La secuenciación de genomas de arqueas ha revelado que la mayor parte de los sistemas de procesamiento de la información como la replicación, la transcripción y la traducción, que mantienen y expresan los genomas son claramente de tipo eucarionte (Rowlands y col., 1994; Baumann y col., 1995; Dennis, 1997). En cambio, los genes relacionados con funciones metabólicas son de tipo bacteriano (Olsen y Woese, 1997;

Gaasterland, 1999). Otras similitudes de las arqueas con bacterias son sus tamaños celulares, la ausencia de membrana nuclear y de organelos, y la presencia de un cromosoma circular acompañado de plásmidos circulares más pequeños (Brown y Doolittle, 1997). La estructura de las envolturas celulares formadas por la capa S de glicoproteínas y una membrana plasmática que contiene una gran proporción de tetra-éteres lipídicos, constituye una característica original de las arqueas (Brown y Doolittle, 1997; Rajagopal y col., 1998).

El dominio *Archaea* se divide en los reinos *Crenarchaeota*, *Euryarchaeota* y *Korarchaeota*. Los *Crenarchaeota* incluyen a los termoacidófilos extremos, que crecen a pH entre 1 y 3, y a temperaturas sobre los 60 °C (Brown y Doolittle, 1997), mientras que los *Euryarchaeota* incluyen a las arqueas halofílicas, capaces de tolerar concentraciones muy altas de sal, y a los metanógenos que generan metano bajo condiciones anaeróbicas. Los *Korarchaeota* comprenden microorganismos de ambientes termófilos aún no cultivados, identificados en base al análisis del RNAr 16S (Barns y col., 1996).

1.2. El género *Sulfolobus*

1.2.1. Características del género *Sulfolobus*

El género *Sulfolobus* pertenece al reino *Crenarchaeota* y comprende especies termoacidófilas aisladas de hábitats geotermales como las fuentes solfatáricas (Ciaramella y col., 2002). Estos ambientes extremos se caracterizan por las altas temperaturas de sus aguas circulantes, la presencia de minerales de hierro y azufre y una gran acidez (Stetter, 1995).

Debido a la existencia de especies heterótroficas y aerobias pertenecientes a este género, varios de estos microorganismos pueden cultivarse fácilmente en medio líquido, siendo ampliamente utilizados como modelos para estudios bioquímicos y genéticos. Desde

el punto de vista básico, se ha avanzado mucho en el estudio de *Sulfolobus acidocaldarius* y *Sulfolobus solfataricus*. Los genomas de estas arqueas se encuentran secuenciados y anotados (She y col., 2001; Chen y col., 2005), y se han desarrollado recientemente en *S. solfataricus* herramientas genéticas para la expresión de proteínas y para la mutagénesis (Jonuscheit y col., 2003; Albers y col., 2006).

1.2.2. *Sulfolobus metallicus* y su utilización en biominería

S. metallicus es un termoacidófilo que se desarrolla a 65 °C y a pH entre 2 y 3, que es capaz de obtener su energía mediante la oxidación de hierro y azufre (Huber y Stetter, 1991). Es el representante menos estudiado del género *Sulfolobus*, sin embargo presenta características fenotípicas que lo hacen particularmente interesante desde el punto de vista biotecnológico. En este contexto, *S. metallicus* se ha empleado con gran beneficio para extraer metales como cobre y oro desde los minerales que los contienen, en el proceso biotecnológico conocido como biolixiviación (Lindström y col., 1992; Aguilar, 1996). Este proceso es de gran importancia para la industria minera nacional e internacional, ya que permite aprovechar minerales que no pueden lixivarse de manera química, y además genera un menor impacto ambiental comparado con los métodos tradicionales (Gentina y Acevedo, 1985; Acevedo y col., 1993; Rawlings, 2002)

En las últimas décadas los procesos de biolixiviación a altas temperaturas se han desarrollado fuertemente, en donde la utilización de arqueas termoacidófilas como *S. metallicus*, *M. sedula* y *Acidianus brierleyi* ha resultado en un aumento de las tasas de obtención de minerales (d'Hugues y col. 2001; Stott y col., 2001; (Rawlings, 2002; Mikkelsen y col., 2006). Esto se debe en parte, a que las reacciones químicas a altas temperaturas ocurren a

mayor velocidad, y adicionalmente constituye una importante alternativa para la lixiviación de minerales recalcitrantes como la calcopirita (CuFeS_2), un mineral de cobre muy abundante en la naturaleza (Rodríguez y col., 2003; Jordan y col., 2006). A pesar de las ventajas de la biolixiviación a altas temperaturas, existe escasa información sobre los mecanismos de adaptación de este tipo de microorganismos a estos ambientes extremos como lo son las altas concentraciones de metales pesados a las que se ven expuestos durante la faena biominera.

Por todo esto, existe un gran interés por dilucidar los mecanismos que les permitirían a estos extremófilos adaptarse y responder a su medio ambiente. El conocimiento de estos mecanismos será de importancia ya podría contribuir en el control del complejo ecosistema microbiano presente en operaciones de biominería (Aguilar, 1996).

1.3. El cobre y su relación con los sistemas biológicos

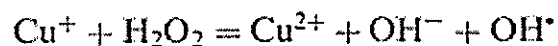
1.3.1 La relevancia biológica del cobre

El cobre con una abundancia relativa en la corteza de la Tierra de 68 ppm, está ampliamente distribuido en la naturaleza, y se encuentra principalmente en forma de sulfuros, óxidos o carbonatos, así como en minerales de calcopirita (CuFeS_2), calcocita (Cu_2S), cuprita (Cu_2O) y malaquita ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$).

El cobre es un micronutriente esencial para la gran mayoría de los seres vivos (eucariotas y procariotas) y sus funciones biológicas están estrechamente relacionadas con sus propiedades como un metal de transición. Este metal tiene parcialmente ocupado el orbital d por lo que puede encontrarse con más de un estado de valencia, ya sea en la forma de Cu(I) (d^{10}) o Cu(II) (d^9) (Solioz y Stoyanov, 2003a). Como el ácido de Lewis más fuerte

en el Grupo IB, el cobre tiene la capacidad de mediar en el transporte de electrones, así tiene un papel estructural y funcional en metaloenzimas tan importantes para el metabolismo energético como la Citocromo c oxidasa. Adicionalmente, el ión cuproso (Cu^+) actúa como un grupo prostético de varias enzimas celulares entre ellas la superóxido dismutasa, la lisil oxidasa y en enzimas microbianas que participan en la reducción de nitritos y de óxidos de nitrógeno (Peña y col., 1999; Solioz y Stoyanov, 2003a).

A pesar de su función biológica, el cobre puede ser altamente tóxico cuando se encuentra en concentraciones que exceden a las requeridas fisiológicamente. Aunque la toxicidad del cobre no está completamente entendida, en gran parte se debe a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno a través de una reacción tipo Fenton (Ecuación 1) (Lloyd y Phillips, 1999; Bruins y col., 2000; Teitzel y col., 2006).



(Ecuación 1)

Así, los radicales libres generados mediante esta reacción pueden dañar las membranas celulares, alterar la estructura de las proteínas y del DNA, perturbando las funciones celulares en general (Yoshida y col., 1993; Bruins y col., 2000; Solioz y Stoyanov, 2003a). Por todo esto, la homeostasis de cobre en los organismos es un proceso estrictamente regulado, que permite mantener una concentración del metal que no supere el límite sobre el cual se vuelve tóxico. Es así como procariontes y eucariontes han desarrollado diversos mecanismos de resistencia que se activan con el fin de evitar los

efectos nocivos del cobre (Dameron y Harrison, 1998; Rensing y Grass, 2003; Teitzel y col., 2006).

En términos generales estos mecanismos de resistencia al cobre incluyen:

- i) Componentes intra ó extracelulares que capturan al cobre neutralizandolo. Un ejemplo de esto es la capacidad de las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) de algunas bacterias de atrapar el metal, o en el caso de los eucariotas las metalotioneínas (mamíferos y levaduras) o fitoqueatinas (plantas), proteínas que capturan el cobre a través de un dominio rico en cisteínas.
- ii) La disminución de la entrada de cobre a la célula, mediante la alteración de las envolturas celulares y la represión de la expresión de porinas de membrana externa.
- iii) La conversión enzimática del metal a la especie química menos tóxica (Cu^{2+}).
- iv) La expulsión de los iones de cobre hacia el medio extracelular mediante transportadores específicos de membrana, principalmente dependientes de energía como las ATPasas de membrana.
- v) La reducción de la sensibilidad al metal de los blancos celulares, mediado por mecanismos moleculares normales de la célula, como pueden ser los sistemas de reparación del ADN y de plegamiento de proteínas.

Estos sistemas en particular o en conjunto pueden representar la respuesta celular al exceso del metal, y por lo general son los encargados de disminuir el exceso de cobre en el

citoplasma celular (Silver y Phung, 1996; Dameron y Harrison, 1998; Dopson y col., 2003; Solioz y Stoyanov, 2003b; Teitzel y col., 2006; Lutsenko y col., 2007; Waldron y Robinson, 2009).

1.3.2. Mecanismos de resistencia al cobre en bacterias

Se ha propuesto que entre los distintos mecanismos de resistencia al cobre descritos, el eflujo activo del metal desde el citoplasma mediante transportadores específicos de membrana constituye la alternativa más utilizada por los microorganismos procariotas (Outten y col., 2000; Ryan y col., 2007; Smaldone y Helmann, 2007). A la fecha existe bastante información sobre los mecanismos de resistencia al cobre en bacterias. En particular, *Enterococcus hirae* ha servido de modelo de estudio en gram positivas, y *Escherichia coli* ha sido el modelo en gram negativas (Outten y col., 2001; Solioz y Stoyanov, 2003a)

El sistema de homeostasis al cobre en *E. hirae* está codificado en su genoma, y consiste de 4 genes organizados en el operón *cop*. Los genes *copA* y *copB* codifican para ATPasas de cobre de tipo CPx, *copY* codifica un represor transcripcional que es inhibido en presencia de cobre, y *copZ* codifica una chaperona que facilita el tráfico intracelular de cobre. De acuerdo al modelo de homeostasis, CopA es responsable del importe del metal cuando éste es limitante, mientras que CopB participa en la expulsión de cobre cuando éste ha alcanzado concentraciones intracelulares tóxicas. Debido a que estas ATPasas (CopA y CopB) transportan ión cuproso (Cu^+), se ha propuesto la presencia de una enzima reductora de Cu^{2+} (CorA). Dicha actividad se ha detectado asociada a membrana en *E. hirae*, sin embargo aún no se ha identificado la proteína responsable. Adicionalmente, se ha demostrado que la chaperona de cobre (CopZ) es capaz de interactuar directamente con

CopA y CopY entregándoles el átomo de Cu^+ y cumpliendo un papel crucial en la función de estas proteínas (Solioz y Stoyanov, 2003a). En cuanto a *E. coli*, se han identificado 2 sistemas de detoxificación de cobre codificados en su genoma. Uno de ellos, el sistema Cue (“copper efflux”), incluye una ATPasa tipo CPx (CopA) que participa en el eflujo del cobre desde la célula, muy similar al que presenta *E. hirae* (CopB), y una multi-oxidasa de cobre (CueO), que cataliza la oxidación del ión cuproso (Cu^+), la especie más tóxica del cobre para la célula, hasta Cu^{2+} (Outten y col., 2001; Singh y col., 2004). La expresión de estos genes es controlada por la proteína CueR (Rensing y Grass, 2003). Como mecanismo adicional, *E. coli* posee el sistema Cus, un antiporte de protones para el eflujo de ión cuproso de la familia RND (“resistance, nodulation and división”), que permite la expulsión del metal desde el citoplasma hasta el espacio extracelular (Rensing y Grass, 2003), y una chaperona de cobre periplásmica (CusF), que transferiría un átomo de Cu^+ el metal al sistema Cus (Grass y Rensing, 2001; Franke y col., 2003). Por su parte, el mecanismo que permitiría la entrada de cobre en *E. coli* aún no se ha descrito.

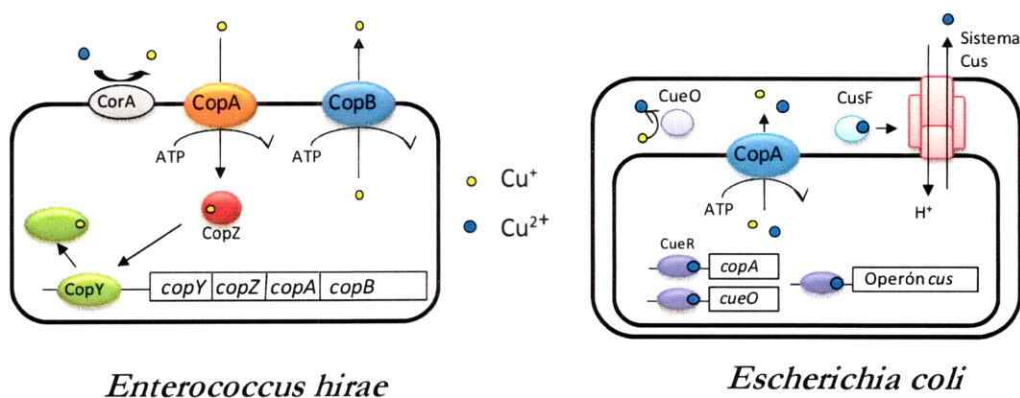


Figura 2. Mecanismos de resistencia al cobre en bacterias. Se ilustran los modelos de estudio de la resistencia al cobre en bacterias, *E. hirae* en Gram(+) y *E. coli* en Gram(-).

1.3.3. Resistencia al cobre en especies acidófilas.

Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) a cobre de *E. coli* y *E. hirae* son 1 y 8 mM respectivamente (Outten y col., 2001; Solioz y Stoyanov, 2003a). Estos valores de CMI son muy bajos si se les compara con los mostrados por algunas especies acidófilas presentes en ecosistemas tales como los drenajes ácidos de mina, donde las concentraciones de los metales pesados, especialmente Cu, son uno o dos órdenes de magnitud más altas (Dopson y col., 2003). Entre estos microorganismos acidófilos altamente resistentes al cobre destacan la bacteria Gram negativa ampliamente utilizada en biominería *Acidithiobacillus ferrooxidans*, que puede ser adaptada para crecer en la presencia de 800 mM de Cu (Das y col., 1998), y las arqueas *F. acidarmanus* y *S. metallicus* que muestran valores de resistencia al cobre de 312 y 200 mM respectivamente (Dopson y col., 2003; Remonsellez y col., 2006) (Tabla 1). Este nivel de resistencia al cobre presentado por *S. metallicus* es uno de los más altos hasta ahora reportados, y supera en 40 veces la resistencia que muestran otras especies del género como *S. acidocaldarius* (CMI = 1 mM) y *S. solfataricus* (CMI = 5 mM) (Remonsellez y col., 2006)(Tabla1).

La elevada resistencia al cobre que muestra *S. metallicus* está también documentada en los estudios realizados en pruebas de biolixiviación de calcopirita. En dicho proceso el microorganismo se va exponiendo progresivamente a cantidades crecientes del metal alcanzado concentraciones de aproximadamente 90 mM de ión Cu^{2+} (Rodríguez y col., 2003). Por otra parte, un problema ordinario en la industria minera es la paralización de los procesos de biolixiviación de calcopirita a alta temperatura. Se ha reportado que este fenómeno se debe en gran parte a la toxicidad del metal sobre la microflora operante. Así, la

selección de cepas altamente resistentes al cobre ha sido de especial interés (Norris y col., 2000).

Tabla 1. Concentraciones máximas de cobre en las cuales se ha reportado el crecimiento para algunos microorganismos acidófilos y neutrófilos.

Microorganismo	Concentración máxima(mM)	Referencia
Acidófilos		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	800	(Das y col., 1998)
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	312	(Baker-Austin y col., 2005b)
<i>Sulfolobus metallicus</i>	200	(Remonsellez y col., 2006)
<i>Metallosphaera sedula</i>	16	(Huber y col., 1989)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	1	(Miller y col., 1992)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	5	(Remonsellez y col., 2006)
Neutrófilos		
<i>Escherichia coli</i>	1	(Outten y col., 2001)
<i>Enterococcus hirae</i>	8	(Solioz y Stoyanov, 2003)

A pesar de estos extraordinarios valores de resistencia al cobre que muestran algunos acidófilos existen pocos estudios que intenten explicar los mecanismos que les permiten prosperar en tan altas concentraciones del metal. En este contexto, nuestro laboratorio ha estudiado recientemente los determinantes genéticos que podrían conferir resistencia al cobre en la bacteria *A. ferrooxidans*. A través de una búsqueda bioinformática en su genoma se observó la presencia de al menos 10 genes que estarían posiblemente

relacionadas con la resistencia al cobre. Entre ellos se encontraron tres genes que codifican para ATPasas potencialmente involucradas en el transporte de Cu (*copA1_{Af}*, *copA2_{Af}* y *copB_{Af}*), tres genes relacionados con un sistema tipo Cus, complejo proteico de la familia RND (*cusA_{Af}*, *cusB_{Af}* y *cusC_{Af}*), y dos genes que codifican para chaperonas periplásmicas de cobre (*cusF_{Af}* y *copC_{Af}*). Junto con esto, se demostró que la expresión de la mayoría de éstos ORFs aumentó cuando la bacteria se expuso a CuSO₄ en el rango de 5 a 25 mM. Adicionalmente, se demostró la funcionalidad de casi todos estos ORFs mediante ensayos de complementación en *E. coli*. Estos resultados en conjunto sugieren que la alta resistencia al cobre que muestra *A. ferrooxidans* puede deberse en parte a su amplio repertorio de determinantes de resistencia al cobre y a la duplicación de algunas de estos determinantes (Navarro y col., 2009).

1.3.4. Mecanismos de resistencia al cobre en arqueas acidófilas

El primer reporte sobre la caracterización funcional de una potencial ATPasa de cobre (CopA) en una arquea hipertermófila, *Archaeoglobus fulgidus*, se realizó hace pocos años. En este estudio se demostró que esta ATPasa tipo CPx era capaz de transportar iones Ag⁺ y Cu²⁺. Esta fue la primera ATPasa termofílica de Ag⁺/Cu²⁺ expresada y purificada funcionalmente, haciéndola un buen candidato para estudios estructurales (Mandal y col., 2002).

Debido a la disposición del genoma completo de *S. solfataricus* P2 se han realizado algunos estudios bioinformáticos en busca de determinantes genéticos involucrados en la resistencia a cobre. Uno de estos estudios describe la presencia de un dominio peptídico denominado TRASH (por "Trafficking, Resistance and Sensing of Heavy metals"), el cual

contiene motivos con residuos de cisteína muy conservados que dan cuenta de su posible papel en la coordinación de metales, entre ellos el cobre. Este dominio TRASH, que también se ha identificado en otros genomas procariotas, forma parte de reguladores transcripcionales, ATPasas que transportan metales y de hidrogenasas. Así, se sugiere que este dominio es un nuevo componente para el tráfico intracelular de metales y podría constituir un modulo estructural importante en proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales pesados (Ettema y col., 2003).

Otros autores han descrito la existencia de dos genes que codifican para potenciales ATPasas de cobre en *S. solfataricus* P2, CopA y CopB. Adicionalmente, en estudios *in vitro* realizados con la ATPasa CopB, se demostró la funcionalidad de su dominio fosfatasa mediante la capacidad de hidrolizar ATP a altas temperaturas y en la presencia específica de ión Cu^{+2} . Así, se concluyó que la proteína CopB sería una ATPasa para la traslocación de cobre, sin embargo no se ha demostrado si este transportador participaría en el importe o el exporte del metal en *S. solfataricus* (Deigweihel y col., 2004).

Recientemente se ha identificado un grupo de genes *cop* de resistencia al cobre altamente conservado en *Archaea*. Estos genes *cop* codifican para una metalochaperona (CopM), una ATPasa de cobre de tipo CPx (CopA), y un regulador transcripcional (CopT) que controlaría la expresión de los genes *cop* (Ettema y col., 2006) (Fig. 3).

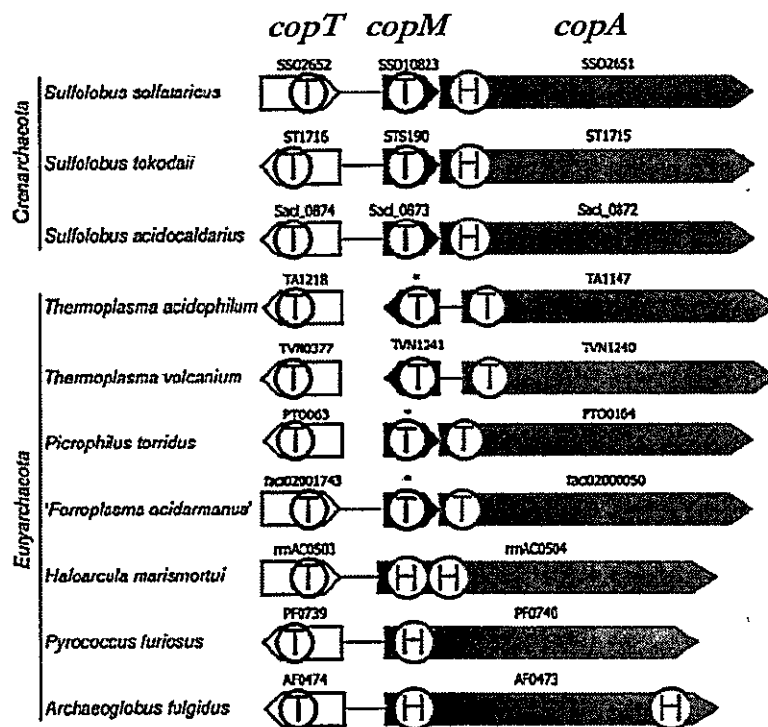


Figura 3. Organización genética de los loci *cop* en *Archaea*. Los genes que codifican *copT*, *copM* y *CopA* se indican en color blanco, negro y gris, respectivamente. Los números sobre cada gen indican el nombre del ORF anotado. Los dominios presentes en las proteínas codificadas se abrevian como T, dominio TRASH y H, dominio HMA de unión a cobre. (Adaptado de Ettema y col., 2006.)

En *Sulfolobus solfataricus* P2 se demostró que los genes que codifican para la metalochaperona, *copM*, y la ATPasa, *copA*, se transcriben formando parte de una misma unidad transcripcional. Adicionalmente, se determinó que los niveles de este policistrón (*copMA*) aumentan cuando el microorganismo se expone a concentraciones de cobre inhibitorias del crecimiento (5 mM de CuSO_4), mientras que la expresión del gen *copT* es constitutiva. Estos resultados sugieren que el aumento en la expresión del gen *copA* podría dar cuenta de un mecanismo de resistencia al cobre que involucra el eflujo activo del metal desde el citoplasma. Junto con esto, se demostró que el regulador CopT se une al promotor

de *copMA*, no así a su propio promotor. Esta unión dependiente de la ausencia de cobre sugiere que CopT funcionaría como un represor de la transcripción. Por su parte, el papel de la proteína CopM no está claro, pero podría estar cumpliendo varias funciones, entre ellas, coordinar el tráfico intracelular de metales, regular la actividad de CopA, o modular la regulación transcripcional (Ettema y col., 2006). Basándose en los estudios realizados en *S. solfataricus* P2, en la figura 4 se ilustra un posible modelo de la resistencia al cobre en esta arquea.

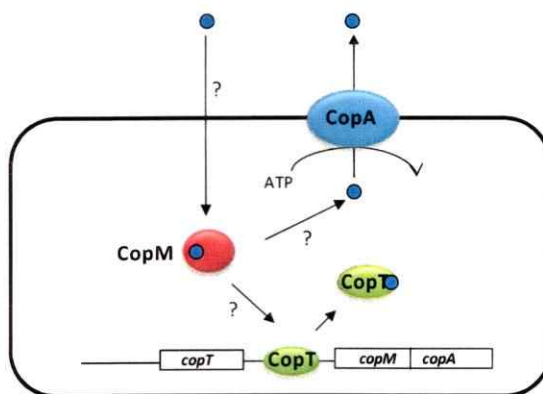


Figura 4. Modelo de resistencia al cobre en *S. solfataricus*. El símbolo ● indica un átomo de ión Cu^+ o Cu^{2+} (no se ha determinado). Los signos ? señalan los pasos que no se han estudiado y se mantienen como supuestos (Ettema y col., 2006).

Por otra parte, en estudios realizados recientemente en la cepa de *S. solfataricus* 98/2, se ha demostrado que el grupo de genes *cop* se transcriben formando una sola unidad transcripcional, *copRTA* (referido como *copTMA* en *S. solfataricus* P2), mientras que en presencia de exceso de Cu aumenta sólo la expresión del policistrón *copTA*, que codifica para la metalochaperona y la ATPasa de cobre respectivamente. Así, los autores proponen

un modelo para la homeostasis de Cu en *S. solfataricus* 98/2 que se basaría en el eflujo y el secuestro de Cu (Villafane y col., 2009).

En estudios realizados en el arqueón mesoacidófilo *Ferroplasma acidarmanus* se han obtenido resultados similares a los de *S. solfataricus* P2. En *F. acidarmanus*, capaz de crecer en altas concentraciones de cobre (hasta 312 mM de CuSO_4), los niveles del mRNA policistrónico *copZB* (*copMA* en *S. solfataricus* P2) aumentan en respuesta a altas concentraciones de Cu^{2+} (Baker-Austin y col., 2005a). Adicionalmente, mediante estudios de la expresión diferencial de proteínas en *F. acidarmanus* expuesto a CuSO_4 se reveló la inducción de proteínas de estrés asociadas con los procesos de plegamiento de proteínas y la reparación del DNA (subunidades del termosoma, chaperonas moleculares). Estos resultados sugieren que la respuesta a altas concentraciones de cobre en el *F. acidarmanus* involucraría un sistema activo de expulsión del metal, replegamiento de proteínas y reparación del DNA (Baker-Austin y col., 2005a).

La capacidad que muestra *S. metallicus* de crecer en concentraciones de cobre similares a *F. acidarmanus*, permite sugerir que este microorganismo podría presentar mecanismos de resistencia a cobre similares al descrito, hasta ahora, para esta arquea. Debido a que aun no se dispone de la secuencia genómica de *S. metallicus*, desconocemos si el grupo de genes *cop* estaría presente en esta arquea. A pesar de esto, recientemente nuestro laboratorio estudió la expresión diferencial de las proteínas totales en respuesta al cobre en *S. metallicus*, con el fin de buscar determinantes de resistencia que pudieran expresarse en respuesta a este metal. Este análisis reveló la inducción de proteínas relacionadas con la producción y transporte de energía, la biosíntesis de aminoácidos, la respuesta a estrés, y la regulación de la transcripción. Entre ellas, se identificaron oxidoreductasas que

responderían al estrés oxidativo causado por el exceso de cobre y la subunidad de la chaperonina HSP60 que jugaría un papel en asegurar la calidad y funcionalidad de las proteínas (Remonsellez, 2007).

1.4. Los polifosfatos inorgánicos (poliP)

1.4.1. Aspectos generales de los poliP

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son polímeros lineales de decenas o centenas de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido (Kornberg y col., 1999) (Fig. 5). Los poliP se observan, mediante microscopía electrónica, como gránulos densos a los electrones que desaparecen rápidamente bajo el haz de electrones, diferenciándose así de la cromatina (Wiame, 1947). Se ha encontrado poliP en todos los seres vivos en los que se ha buscado: bacterias, hongos, protistas, plantas y animales (Wood y Clark, 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y col., 1990; Remonsellez y col., 2006).

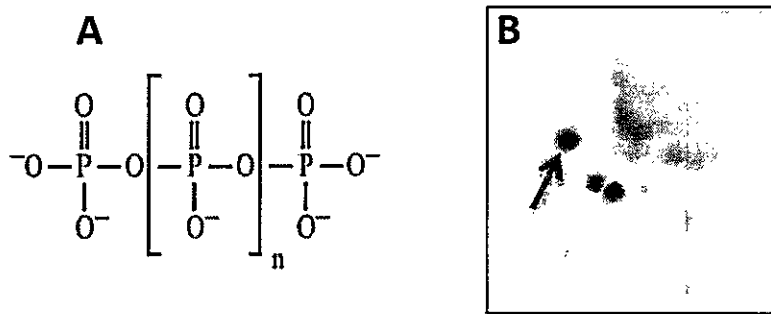
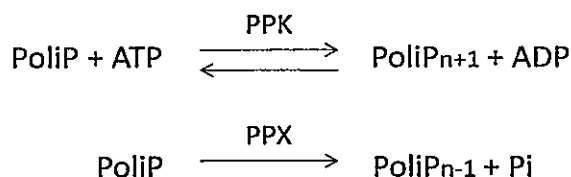


Figura 5. Polifosfatos inorgánicos (poliP) y gránulos de poliP en *S. metallicus*. (A) Entre corchetes [] se muestra un monómero de ortofosfato, y *n* representa el número de repeticiones del monómero. (B) Observación de una de una célula de *S. metallicus* sin tinción mediante TEM. La flecha indica uno de los gránulos de poliP.

La formación y degradación de este polímero en bacterias está controlada enzimáticamente, de acuerdo a las siguientes reacciones:



La enzima PPK es la encargada de la síntesis de los poliP en una reacción reversible que utiliza el polímero y ATP como sustratos, liberándose una molécula de ADP y obteniéndose la extensión en un residuo en el poliP. Se determinó que la reacción de la PPK es reversible, es decir los poliP en determinadas condiciones celulares se utilizan como fuente de energía (Akiyama y col., 1992; Kato y col., 1993). Sin embargo la reacción más favorecida es la de formación de poliP, ya que solo cuando la relación ADP/ATP es igual o mayor a 10, se desplaza el equilibrio de la reacción hacia la formación de ATP a partir de poliP, es decir, cuando la célula ha utilizado la mayor parte de su contenido de ATP (Kornberg y col., 1999). Con respecto a la degradación de los poliP, más allá de la reacción reversa de la PPK, se demostró la existencia de una enzima exopolifosfatasa (PPX) que hidroliza los enlaces fosfodiéster de los poliP con la consiguiente liberación de fosfato inorgánico (Akiyama y col., 1993; Rangarajan y col., 2006).

En eucariontes aún no se conoce con certeza si existe una o más enzimas responsables de la síntesis de poliP. Se ha descrito una actividad dolicol pirofosfato:polifosfato fosfotransferasa asociada a la síntesis de glicoproteínas en levadura. Esta enzima cataliza la transferencia de fosfato desde el dolicol fosfato hacia el poliP

(Kulaev y col., 1999). Por su parte, se han caracterizado varias polifosfatasas a nivel genético en levadura. Una de éstas es la exopolifosfatasa citosólica codificada por el gen *ppx1* (Wurst y Kornberg, 1994; Wurst y col., 1995), que no presenta ninguna similitud con las exopolifosfatasas bacterianas. También se ha descrito una endopolifosfatasa vacuolar (Ppn1) en levadura (Sethuraman y col., 2001).

Si bien se ha demostrado la ocurrencia de los poliP en representantes del dominio *Archaea*, a la fecha no se ha descrito la actividad enzimática responsable de la síntesis de este polímero. No obstante trabajos en nuestro laboratorio, permitieron identificar un gen *ppx* en *S. solfataricus* con similitud a su ortólogo en *E. coli*, que codifica para una exopolifosfatasa funcional (Cardona y cols., 2002). El gen *ppx* está presente en la mayoría de los genomas de las arqueas secuenciadas a la fecha.

1.4.2. Funciones de los poliP.

Considerados clásicamente como componentes con función de reserva energética, la regulación y función de los poliP en los seres vivos permaneció desconocida por muchos años. Recientemente se han estudiado sus posibles funciones fisiológicas y potenciales aplicaciones industriales. Entre las funciones propuestas se ha postulado que el poliP actúa como sustituyente de ATP en reacciones catalizadas por proteínas quinasas (Kornberg y col., 1999). También es una reserva de fosfato, debido a que el poliP puede ser convertido a Pi por la acción de polifosfatasas (Kornberg y col., 1999). Por otra parte, se ha demostrado que colabora en la mantención del pH intracelular pues puede actuar como tampón contra el álcali (Kornberg y col., 1999). Existen otras funciones del poliP, como por ejemplo participar en la regulación de la expresión de ciertos genes tales como *rpoS*, un factor sigma

de fase estacionaria (Shiba y col., 1997) y de los genes SOS, sistema global de respuesta ante distintos tipos de estrés (Tsutsumi y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que la proteasa Lon de *E. coli* forma un complejo con poliP. Este complejo es responsable de la degradación de proteínas ribosomales en respuesta a la carencia de aminoácidos (Kuroda y col., 2001).

1.4.2. El papel de los poliP en la resistencia a metales pesados

Con respecto a la resistencia a metales pesados, se han propuesto al menos tres potenciales funciones de los poliP. La primera, y quizás la más obvia, tiene que ver con las características químicas de este polímero, ya que su alta densidad de cargas negativas y la flexibilidad de su enlace lo convierte en un buen quelante de iones metálicos (Kornberg, 1999). La segunda función se basa en estudios desarrollados en *E. coli*, donde se determinó que al clonar y expresar los genes codificantes para la PPK y PPX aumentaba considerablemente la resistencia a cadmio de la cepa recombinante (Keasling y Hupf, 1996). A partir de estos resultados se propuso que la degradación de los poliP por parte de la PPX generaría moléculas de fosfato inorgánico, los que en esas condiciones se asociarían a metales pesados y otros cationes tóxicos, los que serían eliminados de la célula mediante transportadores de fosfato inorgánico ubicados en la membrana plasmática (van Veen y col., 1994a) (Fig. 6). La tercera función propuesta para los poliP es la de ser un reservorio de energía (Kornberg y col., 1999), particularmente por la reacción reversa de la PPK, participando en los mecanismos de resistencia a metales de manera indirecta, más bien como una fuente de ATP.

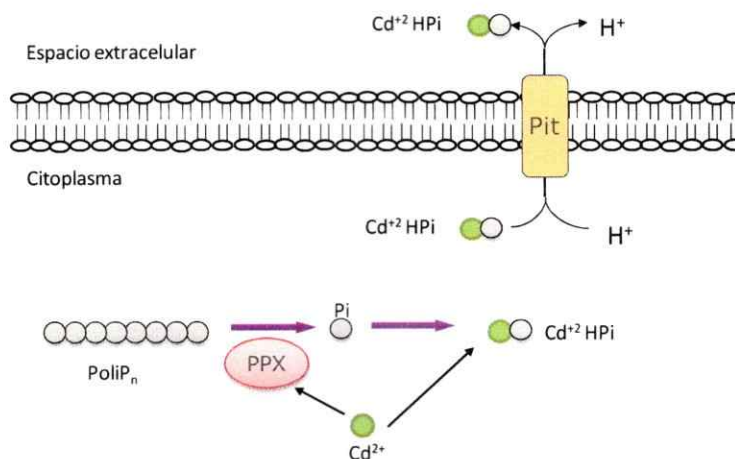


Figura 6. Modelo de detoxificación de metales pesados mediado por los poliP en bacterias. La concentración intracelular del metal regula la actividad exopolifosfatasa (PPX), afectando directamente los niveles de poliP. El fosfato liberado (Pi) desde el poliP es transportado fuera de la célula con el ión metálico a través de un transportador de fosfato tipo Pit (van Veen y col., 1994b; Keasling, 1997).

Recientemente, en estudios realizados por nuestro grupo se describió una relación directa entre los microorganismos que resisten altas concentraciones de cobre y su capacidad para acumular grandes cantidades de poliP (Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006). Así, se determinaron los niveles de poliP en 3 especies del género *Sulfolobus*: *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* y *S. metallicus*. Si bien los 3 microorganismos sintetizan poliP durante su crecimiento, se encontró que *S. metallicus* acumula grandes cantidades de este polímero. Adicionalmente, se demostró que cuando *S. metallicus* es expuesto a altas concentraciones de cobre, estos poliP comienzan a ser progresivamente degradados, lo que es acompañado por el eflujo de iones fosfato, y supuestamente de cationes de cobre (Remonsellez y col., 2006). Este fenómeno fue también descrito en otro microorganismo con altos niveles de resistencia al cobre y relacionado a procesos de biominería: la bacteria

Acidithiobacillus ferrooxidans (Alvarez y Jerez, 2004). Se reportó, además, que *S. solfataricus*, que acumula 10 veces menos poliP que *S. metallicus*, es tan sólo capaz de crecer en concentraciones de cobre 40 veces inferiores a las reportadas para *S. metallicus* (Rémonsellez y col., 2006). Estos resultados sugieren que el mecanismo de resistencia a metales pesados mediado por los poliP sería funcional en *S. metallicus* y debido a su capacidad de acumular poliP, presentaría una ventaja sobre las otras especies del género *Sulfolobus* para enfrentar un estrés por cobre.

En base a los antecedentes expuestos en este capítulo, es de gran interés para esta Tesis doctoral estudiar los mecanismos moleculares que le permitirían a *S. metallicus* resistir tan altas concentraciones de cobre. La comprensión de estos potenciales mecanismos operantes en *S. metallicus* podría ser un aporte tanto desde punto de vista básico como para una eventual optimización de los procesos industriales de biolixiviación. Es así como se plantea como **Hipótesis:** Que la resistencia al cobre en *Sulfolobus metallicus* está dada por la presencia de determinantes genéticos codificados en su genoma y por su alto contenido de poliP, los que funcionan como un mecanismo de detoxificación complementario.

Para validar esta hipótesis se propuso como **Objetivo general:** Determinar la presencia de determinantes genéticos de resistencia al cobre en *S. metallicus*, y evaluar la contribución del metabolismo de los poliP en la resistencia al cobre en especies del género *Sulfolobus*.

En este trabajo de tesis se identificaron y aislaron 2 grupos de genes *cop* homólogos, no idénticos, de resistencia a cobre en el genoma de *S. metallicus*, constituyendo a la fecha el primer reporte de una versión duplicada de este grupo de genes en un representante del dominio *Archaea*. Junto con esto, se caracterizó y determinó la expresión de estos genes en

respuesta al cobre. Adicionalmente, a través de una aproximación proteómica se identificaron otros posibles determinantes de resistencia al cobre. Entre ellos, se encontraron proteínas relacionadas con los procesos de plegamiento y degradación de proteínas, y estrés oxidativo. Finalmente, mediante la generación de una cepa recombinante de *S. solfataricus*, incapaz de acumular poliP, se evaluó el papel de este polímero en la resistencia al cobre. Así, esta cepa recombinante mostró ser más sensible al cobre, demostrándose experimentalmente la contribución de los poliP en la resistencia al cobre. Adicionalmente, un estudio preliminar sobre los cambios en el proteoma de la cepa de *S. solfataricus* deficiente de poliP nos permitió revelar las posibles funciones energéticas y regulatorias de los poliP en esta arquea, y de cómo la carencia de este polímero podría afectar su resistencia al cobre.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas y condiciones de cultivo

2.1.1. *Sulfolobus metallicus*

Se utilizó la cepa de *S. metallicus* DSM6482. El microorganismo se creció a 65 °C y a 120 rpm (agitación orbital) en medio 88 ajustado a pH 2, que contiene 1,3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,28 g/l KH_2PO_4 , 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,07 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,02 g/l $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 1,8 mg/l $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 4,5 mg/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$, 0,22 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,05 mg/l $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,03 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,03 mg/l $\text{V}_2\text{O}_5 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ y 0,01 mg/l $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$. El medio se suplementó con 0,05 % (p/v) de azufre elemental y 0,02 % (p/v) de extracto de levadura. Todos los cultivos se inocularon a una concentración final de 1×10^7 células/ml. Para los experimentos en presencia de metales pesados se inoculó el microorganismo en las condiciones descritas anteriormente y en la presencia de CuSO_4 (5, 20 ó 50 mM), CdSO_4 (5 mM), NiSO_4 (15 mM), ZnSO_4 (50 mM) ó AgSO_4 (0,08 mM). Para el crecimiento en calcopirita (CuFeS_2) el medio se suplementó con 1 % (p/v) de un concentrado de calcopirita donado gentilmente por la empresa minera PUCOBRE. El análisis de la composición mineralógica del concentrado de calcopirita se muestra en el anexo n°1. El crecimiento se determinó por el aumento del número de células no teñidas mediante un microscopio óptico Olympus BX50 y utilizando una cámara de conteo Petroff-Hausser.

2.1.2. *Sulfolobus solfataricus*

Se utilizaron las cepas de *S. solfataricus* M16, M16-PPX y DSM1617. M16 es una cepa mutante *pyrEF*, auxótrofa de uracilo. M16-PPX es una cepa recombinante generada en esta

tesis (ver sección 2.5) que sobreexpresa el gen *ppx* endógeno que codifica para la exopolifosfatasa (PPX). Estas cepas se crecieron a 75°C y con agitación orbital a 120 rpm. Se utilizó medio Brock ajustado a pH 3, que contiene: 1,3 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,28 g/l KH_2PO_4 , 0,25 g/l $\text{MgCl}_2 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/l $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 1,8 mg/l $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 4,5 mg/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$, 0,22 mg/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,06 mg/l $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,03 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,03 mg/l $\text{V}_2\text{O}_5 \times 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,01 mg/l $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Este medio salino se suplementó con 0,1 % (p/v) de N-Z amina (Fukla®). Para el crecimiento de la cepa M16, además de N-Z amina, fue necesario suplementar con 0,01 mg/ml de uracilo. Para los experimentos de inducción de la enzima PPX recombinante se adicionó al medio de cultivo 0,2 % de D-arabinosa (Sigma-Aldrich®). El preinóculo consistió en 2 ml de un cultivo crecido hasta la fase exponencial media (DO_{600} 0,25) y mantenido en medio Brock con 50 % de Glicerol, a -80°C. El mismo se inoculó en 50 ml de medio de cultivo y cuando alcanzó una densidad óptica de 0,25 a 600 nm (DO_{600}), se utilizó como inóculo al 2% (v/v). El crecimiento se determinó midiendo la DO_{600} .

2.1.3. *Escherichia coli*

Se utilizaron distintas cepas de *E. coli* para los experimentos de clonamiento molecular: JM109 (Promega®), TOP10 (Invitrogen®) y Stable4 (Invitrogen®). Estas se crecieron en medio LB (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l) y cuando fue requerido, los cultivos se suplementaron con ampicilina (Amp) a una concentración final de 100 µg/ml. Para la preparación de placas de medio sólido, al medio LB se le adicionó agar (Difco®) al 1,5 % (p/v).

2.2. Técnicas generales de biología molecular

2.2.1. Extracción de DNA genómico

Las células de *S. metallicus* provenientes de 200 mL de cultivo crecido hasta alcanzar la fase exponencial media (6×10^7 células/ml) se colectaron por centrifugación ($6.000 \times g$ durante 10 min) y se lavaron tres veces con medio 88. Para la extracción del DNA cromosómico, se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del kit Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega®). Éste se basa en un paso de lisis celular seguido de una digestión enzimática del RNA, con posterior precipitación del DNA genómico con isopropanol y solubilización en agua. La extracción del DNA genómico de *S. solfataricus* P se realizó desde un cultivo de 50 ml crecido exponencialmente.

2.2.2. Extracción de DNA plasmidial

Para todas las extracciones plasmidiales se utilizaron 2,5 ml de cultivos de *E. coli* crecidos durante 16 h en LB-Amp. Las construcciones plasmidiales derivadas de pCR2.1-TOPO (Invitrogen®) y pMZ se extrajeron utilizando el kit HiYield Plasmid Mini (RBC Bioscience®). El método se basa en una lisis celular alcalina, seguida de neutralización y centrifugación. Para las construcciones plasmidiales derivadas de pJM0305 se utilizó el kit QUIAEX II (Quiagen®). Este kit permite la extracción de DNA plasmidial de alto peso molecular (> 10 Kpb). Se basa en la unión de los fragmentos de DNA a micro partículas de sílice en la presencia de sales caotrópicas. El DNA unido a las micro partículas se centrifuga brevemente, se lava, y el DNA plasmidial se eluye en tampón Tris o en agua. Se siguió el protocolo recomendado por el proveedor sin cambios.

2.2.2. Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA genómico y DNA plasmidial se realizó por la medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un equipo espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Para la cuantificación de DNA genómico se utilizó 1µl de una dilución de 50 veces, mientras que el DNA plasmidial se midió directamente, también utilizando 1µl. Una A_{260} igual a 1 corresponde a una solución de DNA de 50 µg/ml. La pureza se determinó obteniendo la razón de A_{260}/A_{280} . Se utilizó una preparación de DNA con una razón $A_{260}/A_{280} > 1,8$.

2.2.3. Purificación de amplificados de PCR desde geles de agarosa y de otros fragmentos de DNA.

Para la purificación de productos de PCR desde los geles de agarosa se utilizó el kit HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction (RBC Bioscience®). El protocolo se basa en la escisión de la banda desde el gel de agarosa con bisturí y fundido de la agarosa a 65°C en presencia de una resina que une el DNA. La resina se aplica a una mini columna de silicato que retiene los ácidos nucleicos y luego de dos lavados con isopropanol, el DNA se eluye con agua libre de nucleasas y estéril mediante centrifugación. Se utilizó este mismo kit para limpiar los productos de digestión del DNA genómico. Los productos de digestión se mezclaron directamente con la resina que une el DNA y luego se siguió el protocolo sin cambios.

2.2.3. Electroforesis del DNA en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 1 % ó al 1,5 % en tampón TAE 0,5 X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6 X (glicerol 25 % (v/v), SDS 0,5 % (p/v), 0,025 % (p/v) azul de bromofenol, y EDTA 12 mM). Para la tinción del DNA se utilizó una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,2 µg/mL preparado en amortiguador TAE 0,5 X. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta.

2.2.2. Reacciones de PCR

Se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa (Promega®) siguiendo las especificaciones del fabricante. Cada reacción de PCR se montó en un volumen final de reacción de 25 µl ó 50 µl y se utilizaron 1ng/µl de DNA genómico de *S. metallicus* ó *S. solfataricus* (dependiendo del experimento), 5 ng/µl de cada partidor, 0,1 mM dNTPs, DMSO al 5 % (v/v), 0,1 U/µl de *Taq* DNA polimerasa y un amortiguador adecuado para la actividad de dicha enzima. Para la amplificación, se utilizó el siguiente programa: 3 min a 95 °C, seguido de 25 a 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 55-62 °C (de acuerdo a los partidores utilizados), 0,5- 2 min a 72 °C, para finalizar con un paso de 10 min a 72 °C. Para los experimentos de RT-PCR se utilizó una dilución 1:10 de cDNA.

2.4.3. Reacciones de PCR en tiempo real

Para cuantificar la expresión de los genes *copA* y *copT* de *S. metallicus*, se utilizó la metodología de RT-PCR en tiempo real. Estos experimentos se desarrollaron en el equipo Corbett Rotor Gene 6000 (Corbett Research) y las reacciones se hicieron en tubos del tipo

“Strip tube” de 0,1 mL (Corbett Research) en un volumen final de 15 μ L para cada reacción. Para las mediciones de los genes *copA* y *copT* se usó 1 μ L de una dilución 1:10 de cada cDNA previamente obtenido (ver sección 2.4.2.) y 1:100 para el gen del rRNA 16S, 0,5 μ M final de cada partidor y 1,5 μ L de “master mix” QuantiFast SYBR Green (Quiagen). Las condiciones de amplificación fueron de 10 min de desnaturalización y activación enzimática a 95°C, seguido de 30 ciclos de 10 s a 95°C (desnaturalización) y 30 s a 60 °C (apareamiento y extensión). La especificidad de las amplificaciones se comprobó por análisis de curvas de fusión realizado en el mismo equipo. El análisis se realizó luego de terminar el programa de amplificación y consiste en determinar la fluorescencia de cada producto de reacción a medida que aumenta la temperatura. Posteriormente se determina la razón de cambio de la fluorescencia con la temperatura y se grafica en función de la temperatura. Cada producto específico mostró una temperatura de fusión determinada. Para la cuantificación del cDNA se construyeron curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de DNA genómico de *S. metallicus* cuyo rango fue desde 16 ng a 1,6 pg. Al graficar el valor de Ct, ciclo en el cual la amplificación comienza a ser exponencial, versus el logaritmo de la concentración de DNA se obtiene una recta con pendiente negativa, mediante la cual podemos calcular el número de copias del cDNA amplificado bajo estas mismas condiciones (Anexo 4). Para estos experimentos se desarrollaron 3 réplicas biológicas, con preparaciones independientes de RNA y de cDNA. El número de copias de los genes *copA* y *copT* medido en cada condición se normalizó con respecto al valor obtenido para el gen del rRNA 16S, el cual se preparó a partir del mismo RNA utilizado para la cuantificación de los transcritos de interés.

2.2.3. Clonamiento de los productos de PCR

Para las clonaciones de los fragmentos amplificados por PCR, DOP-PCR, CODEHOP-PCR y "Genome Walking" se utilizó como vector el plasmidio pCR2.1-TOPO (Invitrogen®). Este vector está diseñado para el clonamiento de productos de PCR ya que posee nucleótidos de timina en sus extremos 5', los que se complementan con los nucleótidos de adenina del extremo 3' del amplificado agregados por error por la *Taq* DNA polimerasa. La reacción de ligación se lleva a cabo mediante la actividad Topoisomerasa I, cuya enzima está unida covalentemente al extremo 5' del vector. Generalmente, para la ligación se incubaron 20 ng del producto de PCR con 10 ng de vector siguiendo las instrucciones del proveedor. La reacción se desarrolló durante 30 min a temperatura ambiente, y esta reacción de ligación se usó para transformar células quimio-competentes comerciales *E. coli* TOP10 (Invitrogen®), siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. Para la detección de los clones que presentaban insertos de PCR se realizó PCR en colonias. Para ello, se utilizó como molde 2 µl de una suspensión celular obtenida picando cada colonia con una punta estéril y resuspendiéndola en 60 µl de agua destilada estéril. La reacción se realizó en un volumen de 10 µl conteniendo 15 pmol de partidores (M13F y M13R), 0,1 mM dNTP y 0,2 U de *Taq* DNA polimerasa. Posteriormente se realizó una purificación plasmidial de los clones seleccionados, los que finalmente se secuenciaron.

2.2.4. Secuenciación de DNA

Se utilizó el servicio de secuenciación de DNA ofrecido por MacroGen Inc. Para la secuenciación de productos de los PCR se enviaron 10 µl de una solución a una

concentración de 50 ng/ μ l y para los plasmidios recombinantes se utilizaron 10 μ l de una solución a una concentración de 100 ng/ μ l.

2.3. Búsqueda y aislamiento de los genes *cop* en el genoma de *S. metallicus*

Se utilizaron las técnicas de DOP-PCR, CODEHOP-PCR y Genome walking para buscar y aislar desde el genoma de *S. metallicus* los genes *copM*, *copA* y *copT*.

La técnica de DOP-PCR ("degenerate oligonucleotide primers"-PCR) consiste en diseñar partidores degenerados utilizando las regiones conservadas dentro de un alineamiento de secuencias aminoacídicas de proteínas homólogas a la proteína de interés. Una desventaja de esta técnica radica en el alto grado de degenerancia de los partidores dado por la degeneración del código genético (Telenius y col., 1992).

Por su parte, la técnica de CODEHOP-PCR ("consensus-degenerate oligonucleotide primers"-PCR) es una modificación del DOP-PCR y consiste en la utilización de partidores consenso degenerados, que al igual que DOP-PCR, se diseñan a partir de regiones conservadas de un alineamiento de secuencias aminoacídicas. Cada partidador consiste en una zona 3' de carácter degenerado y una zona 5' de consenso. De esta forma, sólo se necesitan 3 a 4 aminoácidos conservados para el diseño de la zona 3'. La zona de consenso 5', que abarca dos tercios de la longitud del partidador, proporciona mayor estabilidad en el apareamiento del partidador y aumenta la eficiencia en los primeros ciclos de la amplificación. Por estas características el CODEHOP-PCR muestra ventajas por sobre el DOP-PCR (Rose y col., 1998).

2.3.1. Diseños de los partidores DOP y CODEHOP

Para el diseño de los partidores DOP y CODEHOP se utilizaron las secuencias aminoácidas CopM, CopA y CopT de las arqueas *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* y *S. tokodaii*. Se diseñaron partidores CODEHOP a partir de las proteínas CopA y CopT, los bloques conservados dentro de las secuencias se identificaron mediante el uso del programa “Block Maker” (http://blocks.fhcrc.org/blockmkr/make_blocks.html) (Rose y col., 2003). Este mismo programa entregó las secuencias de los partidores CODEHOP. Para CopM se diseñaron partidores DOP, para ello las secuencias aminoácidas se alinearon mediante el programa “Clustal W” (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>), se identificaron los bloques conservados y los partidores se diseñaron manualmente. Los alineamientos de secuencias y la identificación de los bloques conservados se muestran en el Anexo 2. En la tabla A3 se listan las secuencias de los partidores utilizados.

2.3.2. Reacciones de PCR utilizando partidores degenerados (DOP-PCR) y partidores consenso degenerados (CODEHOP-PCR)

Para las reacciones de DOP-PCR y CODEHOP-PCR se tomó 1 μ l de DNA molde (40 ng/ μ l), 4 μ l de partidador directo (F) a una concentración de 100 ng/ μ l, 4 μ l de partidador reverso (R) a una concentración de 100 ng/ μ l, 5 μ l de dNTPs (1 mM), 10 μ l de Buffer 5X (250 mM de KCl; 50 mM Tris-HCl; pH 9,0; 0,5% Triton X-100), 5 μ l de MgCl₂ (25 mM). El volumen de reacción fue de 50 μ l. Todas las reacciones se hicieron con partida en caliente (“Hot Start”). Se utilizó el termociclador MultiGene (Labnet) y el esquema general de amplificación fue el siguiente: 3 min a 95°C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a la temperatura de hibridación (X), con Y min de síntesis a 72°C. Finalizando con 7 min de

síntesis a 72°C. La temperatura de hibridación (X) y el tiempo de síntesis (Y) son función del tamaño del amplificado a obtener y de la T_m de los partidores utilizados.

2.3.3. Experimentos de “genome walking”

La estrategia de “genome walking” permite aislar segmentos de DNA de secuencia desconocida que están adyacentes a una región de secuencia conocida. La metodología consiste básicamente en la digestión de DNA genómico con distintas endonucleasas de restricción, cuyos productos se ligan a una secuencia corta de DNA (entre 20 – 40 nucleótidos) de secuencia conocida, denominado el Adaptador. La mezcla de productos de cada digestión ligados al Adaptador se denomina biblioteca de digestión. Así, la región de DNA que se desea aislar se amplifica mediante PCR utilizando un partidor específico al Adaptador y un partidor específico a la región de DNA de secuencia conocida. De esta forma tanto la región 5' como la región 3', que flanquean la secuencia conocida pueden amplificarse y la dirección va a depender exclusivamente de la orientación del partidor específico a la región de secuencia conocida. Durante esta tesis se utilizó la estrategia de “genome walking” descrita por Acevedo y cols. (2008) (Acevedo y col., 2008). La figura 7 muestra esquemáticamente los pasos descritos para esta metodología.

2.3.3.1. Construcción de un Adaptador de DNA

Se construyó un Adaptador de DNA de doble hebra mediante el apareamiento de 2 oligonucleótidos desfosforilados y de secuencia complementaria, AdaptF: (5'-CTAGGCCACGCGTCGACTAGTACTAGCTT-3') y AdaptR: (5'-AGCTAGTACTAGTCGACGCGTGGCCTAG-3'). El apareamiento se logró incubando una mezcla de los 2 oligonucleótidos (10 µM) a 95°C durante 5 min y seguido de

enfriamiento a temperatura ambiente. Este Adaptador de DNA (AdapT) presenta una timina desapareada en su extremo 3' que permite su ligación a productos de digestión de DNA genómico para la generación de las bibliotecas de digestión.

2.3.3.2. Construcción de las bibliotecas de digestión

Para la construcción de las bibliotecas de digestión ligadas al adaptador AdapT se realizaron 6 digestiones independientes de 1 µg de DNA genómico de *S. metallicus* utilizando las siguientes endonucleasas de restricción: *Hind*III, *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Nco*I, *Pst*I. Para cada reacción de digestión se agregaron 10 U de la enzima y 2 µl del Buffer 10X correspondiente a la enzima utilizada. El volumen final de reacción fue de 20 µl y la incubación se realizó a 37°C durante 16 h. Para completar los extremos 3' recesivos y adicionar una base de adenina desapareada en 3', los productos de digestión purificados (500 ng) se incubaron con 5 U de *Taq* DNA polimerasa (promega®), 1 µl de dNTPs (10 mM) y 5 µl de tampón 10X de *Taq* DNA polimerasa. Se completó a un volumen final de 50 µl y se incubó a 70°C por 45 min. Siete µl de esta mezcla se incubaron con 15 pmol de adaptador AdapT, 1 U de T4 DNA ligasa (promega®) y 2µl de amortiguador T4 ligasa 5X en un volumen final de 10 µl. La reacción de ligación se incubó a 16°C durante 16 h.

2.3.3.3. Primera PCR: amplificación lineal

Se utilizaron 5 µl de una dilución 1:10 de la biblioteca de digestión como molde para la PCR. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 50 µl y las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: 1X de amortiguador Elongasa, 1,9 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 5 U de elongasa (Invitrogen®) (mezcla de polimerasas de DNA) y 0,5 µM de partidor específico 1 (SP1) (diseñado a partir de la secuencia conocida del gen que se está aislando). Las secuencias de los partidores utilizados

se muestran en la tabla A3. Para la amplificación de la región 3' se utilizó un SP1 directo, y para amplificar la región 5' se usó un SP1 reverso. La amplificación se desarrolló mediante el siguiente programa: 1 ciclo a 94°C por 1 min, 20 ciclos de 94°C por 32 s y 68°C por 5 min, y un ciclo adicional a 70°C por 7 min. El producto de PCR se diluyó 10 veces y se utilizaron 3 µl de esta dilución como molde en la segunda PCR.

2.3.3.4. Segunda PCR: amplificación exponencial

La segunda amplificación se realizó en un volumen de 50 µl, donde las concentraciones finales fueron: 1X de amortiguador Elongasa, 1,9 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM de primer específico 2 (SP2), 0,2 µM primer del adaptador (AdaptF2: 5'-CACGCGTCGACTAGTACTAGCTT - 3') y 5 U de Elongasa. Se utilizó el siguiente programa de amplificación: 1 ciclo a 94°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 32 s y 68°C por 5 min, y un ciclo adicional a 70°C por 7 min. Los productos de PCR se purificaron desde geles de agarosa y se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen®) para finalmente ser secuenciados.

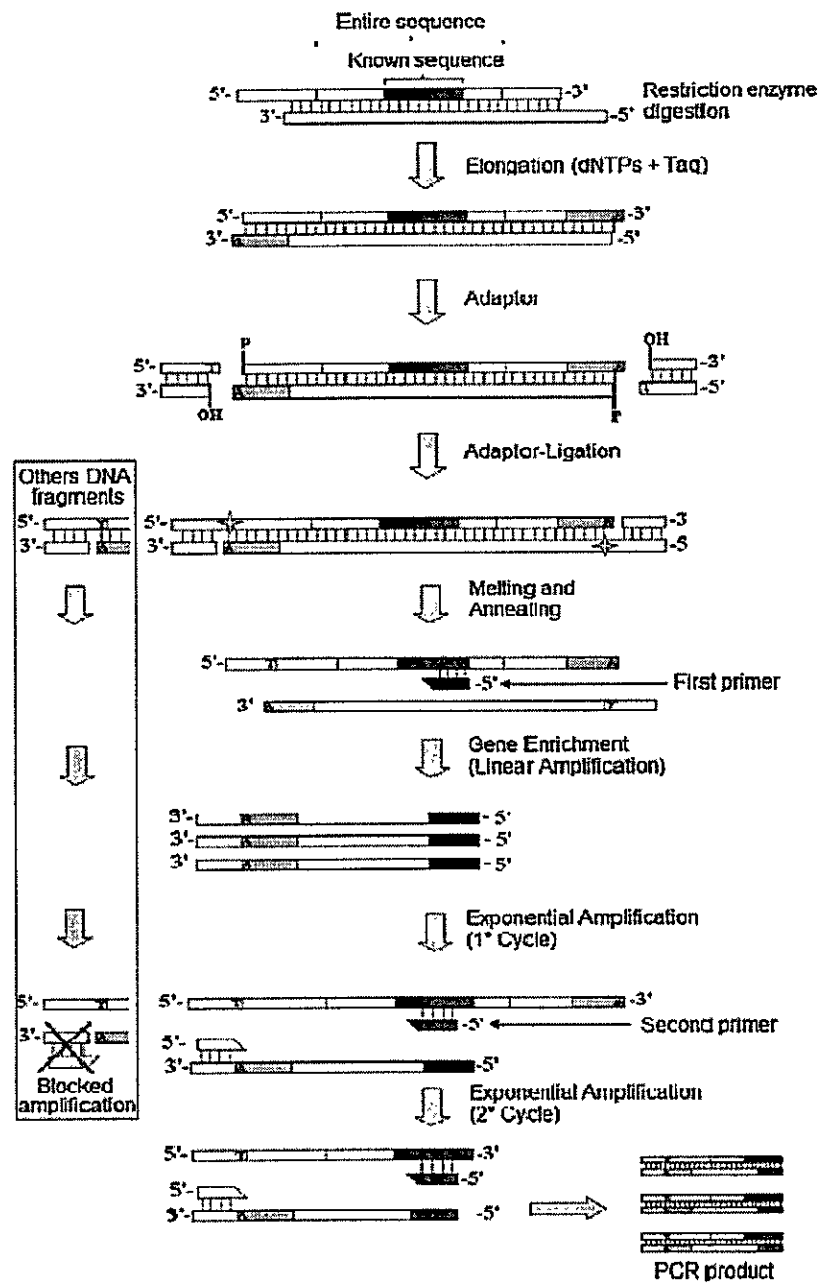


Figure 7. Estrategía de “genome Walking” desarrollada por Acevedo y col. (2008). El esquema muestra la amplificación del extremo 5' de un gen a partir de una región de secuencia conocida. Los pasos que se indican en el recuadro ejemplifica los resultados hipotéticos en el caso de una amplificación inespecífica.

2.4. Técnicas con RNA

2.4.1. Extracción del RNA total

El RNA total de *S. metallicus* se extrajo durante la fase exponencial tardía del crecimiento (aproximadamente 1×10^8 cels/mL). Para ello, se modificó el protocolo de extracción descrito para el reactivo TRIzol (Invitrogen®). Las células se colectaron por centrifugación a $6.000 \times g$ por 15 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con medio 88. Para la obtención del RNA se tomaron fracciones de 15 mg (peso húmedo) de sedimento de células y se resuspendieron en 60 μ L de tampón TEN (20 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA y 100 mM NaCl). Esta suspensión se mezcló con 60 μ L de solución de lisis (tampón TEN suplementado con 1,6 % de lauroylsarcosyl de sodio y 0,12 % de Triton X-100) y se incubó durante 10 min a T° ambiente. A cada una de las suspensiones se agregó 1 ml de reactivo TRIzol y se incubó durante 5 min a T° ambiente. Luego se adicionó 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 30 s y se centrifugó a $12.700 \times g$ durante 15 min, seguido de la recolección de la fase superior acuosa. El RNA se precipitó incubando la fase acuosa a T° ambiente con 250 μ L de isopropanol y 250 μ L citrato de sodio (0,8 M) durante 15 min. Luego de la precipitación, el RNA se recuperó por centrifugación a $12.700 \times g$ por 15 min a 4 °C y se lavó 2 veces con etanol al 70 %, finalmente se resuspendió en 20 μ L de agua libre de nucleasas. Para eliminar los restos de DNA presentes en la preparación, el RNA se trató por 1h a 30 °C con 30 U de DNAsa I (Roche®) en un volumen final de 200 μ L en presencia de 6 mM MgCl₂. La enzima se inactivó con la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM y una posterior incubación por 15 min a 65 °C. Luego de la digestión del DNA, el RNA se extrajo una vez con 400 μ L de fenol/cloroformo ácido y dos veces con 400 μ L de cloroformo. Luego, se precipitó con

1:10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 a 3 volúmenes de etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche o alternativamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Después de dos lavados con etanol al 70 %, el RNA se resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas. La integridad del RNA se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Para determinar la concentración del RNA se utilizó 1 μL de la suspensión y se midió la A_{260} en un equipo espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific[®]). Se utilizó la relación $1\text{ DO}_{260} = 40\text{ }\mu\text{g RNA/mL}$. La pureza del RNA se estimó por la razón A_{260}/A_{280} . Se utilizó una preparación de RNA con una razón $A_{260}/A_{280} > 1,8$.

2.4.2. Transcripción reversa

Para cada una de las reacciones de transcripción reversa se utilizó 1 μg de RNA total. En los experimentos de RT-PCR se adicionó 400 ng del partidior reverso respectivo y para los ensayos de RT-PCR en tiempo real se utilizaron hexámeros de oligonucleótidos como partidiores (500 ng). En un primer paso se mezcló el RNA con el ó los partidiores en un volumen final de 14 μL y esta mezcla se incubó a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, para luego ponerla en hielo e incubar durante 2 min. Este paso tiene por objetivo permitir la desnaturación de las posibles estructuras secundarias del RNA y facilitar el acceso del partidior a su zona de hibridación. Luego, se agregó la mezcla de reacción que comprendía: amortiguador ImpromII (“Moloney Murine Leukemia Virus”) 1X, dNTPs 0,8 mM y 200 U de transcriptasa inversa (RT) MMLV (Promega[®]). La síntesis del cDNA se realizó durante 1 h a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la enzima se inactivó incubando la mezcla por 10 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4.3. Experimentos de Northern Blot

2.4.3.1. Preparación de geles para Northern Blot

Se preparó un gel de agarosa al 1% que contenía MOPS 1X (1L de MOPS 10X contiene 46,3 g de MOPS (sal sódica), 4,1 g de acetato de sodio, 2 mL de EDTA 0,5 M pH 7) como amortiguador y formaldehído 0,4 M final. Para la preparación del gel, la agarosa en la cantidad de agua adecuada se calentó hasta ebullición y se dejó enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 50°C. Luego, se agregó formaldehído y MOPS a las concentraciones indicadas anteriormente, y esta mezcla se dejó gelificar bajo campana de extracción.

2.4.3.2. Tratamiento de las muestras de RNA

Las muestras de RNA para los experimentos de Northern Blot, se llevaron hasta 8 µL en agua con DEPC y a esta solución se agregaron: 2 µL de MOPS 10X, 8 µL de solución B (350 µL de formaldehído, 1 mL de formamida) y 2 µL de solución de carga (300 µL de glicerol, 700 µL de agua con DEPC, 2,5 mg de azul de bromofenol y 2,5 mg de azul de xilencianol). Las muestras se desnaturaron a 100 °C durante 10 min, se incubaron en hielo por un tiempo mínimo de 5 min, y se aplicaron en un gel de agarosa-formaldehído preparado como se describió anteriormente.

2.4.4.3. Electroforesis de las muestras de RNA en geles con agarosa-formaldehído

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente bajo campana de extracción a un voltaje constante de 70 V hasta que el frente de corrida se alcanzó la base de la cámara de electroforesis.

2.4.3.4. Transferencia desde gel de agarosa-formaldehído a membranas de nitrocelulosa

Una vez fotografiado el gel bajo luz UV, este se incubó de manera sucesiva en 100 mL de las siguientes soluciones: NaOH 50 mM durante 10 min, Tris-HCl 0,1 M pH 7,4

durante 20 min y finalmente SSC 20X durante 30 min. Luego el RNA presente en el gel se transfirió a una membrana de nylon (Hybond) por capilaridad. Para ello el gel se depositó con su parte inferior hacia arriba sobre papel Whatman 3MM humedecido previamente en SSC 20X. Sobre el gel se colocó una membrana Hybond del tamaño del gel también previamente humedecida en SSC 20X, y sobre ésta 3 papeles Whatman 3MM también humedecidos en esta solución salina. El sistema de transferencia se completó con servilletas y sobre ellas se colocó un peso aproximado de 500 g. El tiempo de transferencia fue de aproximadamente 18 h. Posteriormente la membrana se lavó por 10 min en SSC 6X y se dejó secar al aire por 30 min (tiempo suficiente para que quede completamente seca). Finalmente, el RNA se entrecruzó a la membrana mediante irradiación con luz UV (254 nm) a una potencia total de $0,12 \text{ J/cm}^2$ en un horno de hibridación Hibrilinker HL-200 (UVP Laboratory Products).

2.4.3.5. Hibridación y lavado de las membranas

Luego de fijar el RNA a las membranas de nitrocelulosa, éstas se humedecieron en amortiguador SSPE 2X (SSPE 10X: NaCl, 1,8 M; fosfato de sodio, 100 mM pH 7,7; EDTA, 10 mM) durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se pre-hibridaron en 7,5 mL de solución de hibridación sin sonda (SSPE, 5X; SDS, 2%; solución de Dendhardt's, 1X; DNA de esperma de salmón, 100 $\mu\text{g/mL}$) a 65 °C por 2 h. La hibridación se realizó con 5 mL de la solución de hibridación fresca precalentada a 65°C a la cual se le agregó la sonda de DNA desnaturalada previamente en agua hirviendo por 5 min. Se colocó una cantidad de entre $1,5\text{-}2,5 \times 10^6$ cpm/mL de solución de hibridación. Las membranas se incubaron con agitación rotatoria a 65°C durante toda la noche.

Luego de finalizada la hibridación se recuperó la sonda y la membrana se lavó varias veces con una solución que comprendía SSPE, 0,5X y SDS, 0,2%: 2 lavados de 5 min cada

uno con agitación y a temperatura ambiente, y posteriormente 2 lavados de 20 min cada uno con agitación a 65 °C.

2.4.3.6. Obtención de las imágenes

Las membranas hibridadas y lavadas como se describió anteriormente se envolvieron en papel celofán y se expusieron en una pantalla K-Screen (Kodak) por tiempos variables de entre 1 a 2 días, la que posteriormente se escaneó en un PhosphorImager (Molecular Imager FX system, Bio-Rad) a una resolución de 50 µm/pixel para obtener imágenes en formato TIFF.

2.5. Generación de una cepa recombinante de *S. solfataricus* capaz de sobreexpresar el gen *ppx* endógeno

2.5.1. Subclonamiento del gen *ppx* de *S. solfataricus* (*ppxS.so*) en pMZ1

El gen *ppx* se amplificó mediante PCR a partir del DNA genómico de *S. solfataricus* P2 con los partidores 5'*ppxS.so**Nco*I: 5'CCATGGTATCGGCAGTTATAGATTG y 3'*ppxS.so**Bam*HI: 5'GGATCCTACTCTTACACCGACAACG. El producto de PCR se purificó desde un gel de agarosa. Para la ligación, se utilizó el sistema pCR2.1-TOPO (Invitrogen®). Veinticinco ng del vector pCR2.1-TOPO y 10 ng del amplificado de PCR se incubaron a T° ambiente en un volumen final de 6 µl durante 30 min. Se utilizaron 2 µl de la reacción para la transformación de células *E. coli* JM109 quimio-competentes, siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor. Luego, se purificó el plasmidio pCR2.1-TOPO-*ppxS.so* desde un clon positivo, seleccionado mediante PCR en colonias. 0,5 µg del plasmidio pCR2.1-TOPO-*ppxS.so* se digirió con 5 U de cada una de las enzimas de restricción *Nco*I y *Bam*HI, utilizando amortiguador Tango 1X (Fermentas) en un volumen

final de 20 μ L. Esta mezcla se incubó durante 2 h a 37°C y el producto de digestión se purificó desde un gel de agarosa. Este producto de digestión se ligó al vector pMZ1 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Para ello, se incubaron 2 μ l del vector pMZ1 (25 ng) y 8 μ l del producto de digestión (50 ng) en amortiguador T4 DNA Ligasa 1X y 5 U de T4 DNA Ligasa. La mezcla se completó con H₂O estéril hasta un volumen final de 20 μ l y se incubó durante 2 h a 37°C. Para la transformación de células *E. coli* JM109 quimio-competentes se utilizaron 5 μ l de la reacción de ligación. Luego de la selección por resistencia a Amp y de verificar la presencia del gen *ppxS.so* mediante PCR en colonias, se eligió un clon positivo y se purificó el plasmidio pMZ1-*ppxS.so*. La integridad del gen *ppx* se verificó mediante la secuenciación de las dos hebras del DNA.

2.5.2. Clonamiento del gen *ppxS.so* recombinante (*ppxS.so_r*) en el vector de expresión pMJ0503

Para la sobreexpresión del gen *ppxS.so_r* en *S. solfataricus* se utilizó el vector de expresión inducida pMJ0503. Este es un vector binario (*E. coli/S. solfataricus*) de integración cromosomal en *S. solfataricus* e inducible por D-arabinosa. Adicionalmente el vector posee un marcador de selección *pyrEF*, que permite su selección en mutantes auxótrofos de uracilo (Albers y col., 2006). Para la clonamiento del gen *ppxS.so_r* en pMJ0503 se digirió el plasmidio pMZ1-*ppxS.so* con 4 U de las enzimas de restricción *BlnI* y *EagI* en un volumen final de 20 μ l, utilizando 1X de amortiguador NEB3 (New England Biolabs). Esta mezcla se incubó durante 2 h a 37°C. El producto de digestión se purificó desde un gel de agarosa. Se utilizaron 40 ng del producto de digestión y 5 ng del vector pMJ0503 previamente digerido, con las enzimas de restricción *BlnI* y *EagI*, y se mezclaron con amortiguador T4 DNA

Ligasa 1X y 5 U de la enzima T4 DNA Ligasa. La reacción de ligación se incubó durante 16 h a 4°C. Se tomaron 5 µl de esta reacción para electrotransformar células de *E. coli* Stable4, según las indicaciones proporcionadas por el proveedor. Posterior a la selección mediante la resistencia a Amp, se seleccionaron clones positivos mediante PCR en colonia con partidores específicos para el gen *ppxS.so*. Finalmente se purificó el plasmidio pJ0503-*ppxS.so_r* y se secuenció para verificar la integridad del fragmento clonado.

2.5.3. Transformación de *S. solfataricus* M16 con pJ0503-*ppxS.so_r*

Para la electrotransformación se utilizaron 50 ml de un cultivo de *S. solfataricus* M16 crecido hasta la fase exponencial media ($DO_{600} \sim 0,3$). El cultivo, previamente enfriado en hielo, se centrifugó por 20 min a 2.800 x g durante 30 min y a 4°C. El sedimento celular se lavó en frío en 50 ml de una solución de 20 mM de sacarosa, pH 5,6. Para disminuir la cantidad de sales residuales, las células se lavaron 2 veces más con la solución de sacarosa en 1/10 del volumen original y a continuación en 1/50 del volumen. Por último, el sedimento celular se resuspendió en 20 mM de sacarosa a una concentración de $\sim 10^{10}$ células por ml. Alícuotas de 50 µl de estas células se mezclaron con diferentes cantidades del plasmidio pJ0503-*ppxS.so_r* (150 ng, 300 ng, 450 ng), previamente dializado contra H₂O desionizada. Estas mezclas se traspasaron a cubetas de electroporación de 1 mm (BioRad) y se incubaron en hielo durante 5 min. La electroporación se realizó con aparato Gene Pulser Electroporator (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones de pulso: 1,5 kV, 25 µF, 400 Ω. Seguidamente, las mezclas de células se diluyeron en 1 ml de medio Brock suplementado con 0,1 % de N-Z amina y se incubaron durante 1 h a 75°C y con agitación vigorosa. Posteriormente las células se inocularon en 50 ml de medio Brock

suplementado con 0,1 % de N-Z amina y 0,01 mg/ml de uracilo. Estos cultivos se incubaron por 2 a 3 días y aquellos que alcanzaron una DO_{600} de $\sim 0,5$ se tomaron como inóculos para cultivos de 50 ml de medio selectivo sin uracilo (Medio Brock + 0,1 % de N-Z amina). Los cultivos que fueron capaces de crecer en el medio selectivo se indujeron con D-arabinosa para ensayar la expresión de la proteína recombinante (ver sección 2.6.8). Finalmente, se guardaron a -80°C alícuotas de los cultivos que mostraron ser capaces de expresar la proteína PPX recombinante.

2.6. Métodos de extracción y cuantificación de polifosfato (poliP)

2.6.1. Extracción del poliP endógeno de *S. solfataricus*

La extracción de poliP se realizó según Ault-Riché y col. (1998). A los tiempos correspondientes, alícuotas de 5 ml provenientes de cultivos de *S. solfataricus* M16 ó M16-PPX se centrifugaron durante 5 min a 13.000 g. Los sedimentos se resuspendieron en 0,3 ml de 4 M GITC, 50 mM Tris-HCl pH 7,0 calentado previamente a 95°C . La suspensión se mezcló por vortex y se incubó a 95°C por 3 min para conseguir una lisis rápida. Se reservó una alícuota de 10 μl de esta fracción para la determinación de proteínas. A cada tubo se agregó 30 μl de 10 % SDS y luego de una incubación a 95°C durante 2 min, se agregó 300 μl de 96 % etanol y 5 μl de una suspensión de microperlas de sílice, "Glassmilk" (Bio 101[®]). Luego de agitación por vortex y de incubar 30 s a 95°C , los tubos se centrifugaron a 13.000 x g durante 1 min y el sedimento de Glassmilk[®] se resuspendió por vortex en 0,5 ml de tampón "New Wash" (5 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 % etanol) frío en hielo y se centrifugó a 13.000 x g durante 30 s. El sedimento que contenía el

poliP, DNA y RNA unido al Glassmilk se resuspendió en 100 μ l de la solución "N.A. digest" (50 mM Tris-HCl pH 7,0; 5 mM MgCl₂; 5 μ g/ml de DNasa y 5 μ g/ml de RNasa) y se incubó a 37 °C por 30 min. Luego el sedimento se lavó dos veces con 200 μ l de tampón "New Wash" frío en hielo para eliminar los productos de la degradación de los ácidos nucleicos. El poliP unido a Glassmilk se eluyó en dos pasos resuspendiendo el sedimento por vortex en 50 μ l de agua cada vez, incubando 2 min a 95°C y centrifugando a 13.000 x g para tomar el sobrenadante. El poliP soluble recuperado en esta fracción (100 μ l) se congeló a -20 °C hasta su cuantificación.

2.6.2. Cuantificación del poliP endógeno de *S. solfataricus*

La cuantificación del poliP se realizó determinando la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) liberado producto de la hidrólisis ácida del poliP. El Pi producido se cuantificó mediante el kit "EnzCheck Phosphate Assay" (invitrogen®). Este método se basa en la conversión enzimática del ribósido 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina (MESG) en presencia de Pi mediante la enzima fosforilasa de nucleósido de purina (PNP). Uno de los productos de esta reacción, el 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina, se cuantifica midiendo la absorbancia a 360 nm. Debido a que el reactivo MESG está en exceso, la cantidad de 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina producido estará en relación directa con la cantidad de Pi. El método tiene una sensibilidad en el rango de 2 μ M a 150 μ M (1 a 75 nmoles de Pi en un volumen de 500 μ l).

Para la hidrólisis ácida del poliP se incubaron 30 μ l de la suspensión de poliP en igual volumen de HCl 1 M durante 30 min a 95°C. La reacción se neutralizó agregando 60

μl de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 10. Esta mezcla se utilizó como sustrato para la reacción PNP en un volumen final de 500 μl , y se siguieron las indicaciones proporcionado por el proveedor. Para la curva de calibración se utilizaron diluciones de una solución de 50 mM de K_2HPO_4 , suministrada en el kit. Las diluciones se prepararon en las mismas condiciones en que se desarrolló la hidrólisis de los poliP. Finalmente la cantidad de poliP se expresó en nmoles de Pi por miligramo de proteína.

2.7. Ensayos de resistencia al cobre en *S. solfataricus* M16-PPX

2.7.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cobre en *S. solfataricus* M16-PPX

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cobre se crecieron cultivos de 50 ml en medio Brock suplementado con 0,1 % de N-Z amina, 0,2 % de D-arabinosa y con distintas concentraciones de CuSO_4 (0,25 a 4 mM). Para los cultivos control se utilizó 0,1 % glucosa en vez de D-arabinosa, debido a que este azúcar no induce la expresión de la PPX recombinante. Todos los cultivos se realizaron en triplicado y se utilizaron matraces iguales para evitar diferencias en el crecimiento. Los cultivos se incubaron durante durante 94 h a 75°C y con agitación orbital a 120 rpm. Al cabo de este tiempo se registró la DO_{600} alcanzada. Los resultados se expresaron como porcentaje de crecimiento con respecto al cultivo control en ausencia de CuSO_4 . Se definió la CMI como la concentración de CuSO_4 capaz de inhibir el 50 % del crecimiento respecto al control en ausencia de cobre.

2.8. Métodos para el análisis de proteínas

2.8.1. Preparación de extractos proteicos totales de *S. metallicus* y *S. solfataricus*

Se prepararon extractos de proteínas totales de *S. metallicus* provenientes desde cultivos crecidos hasta fase exponencial tardía (10^8 células/ml) en ausencia ó presencia de 5, 20 ó 50 mM de CuSO_4 . Las células se colectaron mediante centrifugación a $7.700 \times g$ durante 15 min y luego se lavaron 3 veces con medio 88 para remover el azufre. En el caso de *S. solfataricus* (cepas M16 y M16-PPX) los extractos se prepararon desde células crecidas hasta la fase exponencial media ($0,3 \text{ DO}_{600}$) y en presencia de D-arabinosa (0,2 % p/v) y uracilo (0,01 mg/ml). Las células se cosecharon mediante centrifugación ($7.700 \times g$ por 15 min) y se lavaron 3 veces en medio Brock. Para la preparación de los extractos proteicos los sedimentos celulares (*S. metallicus* ó *S. solfataricus*) se resuspendieron en solución amortiguadora de sonicación (50 mM Tris-HCl pH 8,15, 10 mM EDTA y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF), a una razón de 10 μl de amortiguador por 1 mg de peso húmedo de células. La lisis se realizó mediante 2 ciclos de congelamiento a -80°C , seguido de un descongelamiento rápido y un programa de sonicación en hielo, que consistió en 6 ciclos de 20 seg e intervalos de 30 seg de detención. Se utilizó un equipo sonicador Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR[®]. Consecutivamente, las suspensiones se centrifugaron a $9.800 \times g$ durante 5 min para eliminar las células enteras y restos celulares.

2.8.2. Cuantificación de proteínas

Los extractos de proteínas totales se cuantificaron según el método de Bradford (1976) usando el sistema comercial Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce[®]). Las

muestras de proteínas de membrana se cuantificaron mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) (Smith y col., 1985), y para ello se usó el sistema comercial "BCA Protein Assay" (Pierce®).

2.8.3. Electroforesis de proteínas en minigeles de poliacrilamida-SDS

Para analizar las muestras de proteínas totales ó para desarrollar ensayos de Western blotting se realizó electroforesis en geles SDS-PAGE. Para ello se mezcló 2 volúmenes de la suspensión que contenía 5-20 µg de proteínas con 1 volumen de amortiguador de carga 3X (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, se centrifugaron brevemente y 1 a 5 µL del sobrenadante se aplicaron en los pocillos de geles de poliacrilamida al 12,5 %. La electroforesis se corrió a 200 V hasta que el colorante indicador alcanzó el borde inferior del gel. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Comassie R-250 (0,2 % de azul de Comassie en metanol 25 % y ácido acético 7,5 %).

2.8.4. Preparación de las muestras de proteínas de membrana de *S. metallicus* para electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE (2D-PAGE)

Los extractos de proteínas totales de *S. metallicus* (ver sección 2.8.1) se sometieron a ultracentrifugación a 100.000 x g durante 1 h a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento de membrana total se lavó por resuspensión cuidadosa con solución amortiguadora de sonicación (50 mM Tris-HCl pH 8,15, 10 mM EDTA). Esta suspensión se ultracentrifugó nuevamente a 100.000 x g por 1 h a 4°C. El sedimento de membrana total se resuspendió en tampón ACA750 (ε-ácido aminocaproico 750 mM, EDTA 0,5 mM,

50 mM Bis-Tris HCl pH 7,0) y las proteínas se cuantificaron con el método del ácido bicinonínico (BCA). Se tomaron 450 µg de proteínas y esta suspensión se solubilizó mediante la utilización del detergente η-dodecil-β-D-maltósido (DM) a una concentración final de 5 % (p/v). Esta mezcla se incubó en hielo durante 2 h, y cada 20 min se agitó mediante vortex por 20 seg. Luego de la solubilización, las proteínas se limpiaron mediante precipitación utilizando el sistema comercial "ReadyPrep 2-D Cleanup" (Biorad®). Finalmente las proteínas se resuspendieron en 50 µl de H₂O nano pura.

2.8.5. Electroforesis bidimensional de proteínas IEF/SDS-PAGE (2D-PAGE)

Básicamente se utilizó el mismo procedimiento de electroforesis 2D-PAGE tanto para muestras de extractos de proteína total de *S. solfataricus* como para los extractos de proteínas de membrana de *S. metallicus*, sólo se introdujeron algunas modificaciones en la composición del amortiguador de rehidratación de la muestra. En el caso de las muestras de extractos de proteína total de *S. solfataricus* se utilizaron 300 µg de proteína y estas se mezclaron con un amortiguador de rehidratación, que contiene 8 M de urea, CHAPS al 2 % (p/v), 10 mM de DTT y anfolitos Bio-Lyte pH 3-10 al 0,2 % (p/v) para obtener una concentración final de proteína de 0,3 mg/mL. Por su parte, se utilizaron 450 µg de proteínas para la electroforesis 2D de extractos de proteína de membrana de *S. metallicus*, y el amortiguador de rehidratación contenía DM al 2 % en sustitución de CHAPS. Las muestras rehidratadas se agregaron sobre un gel de agarosa (ReadyStrips IPG, pH 3-10 no lineal, Biorad) y se incubaron durante 1 h a T° ambiente para permitir la incorporación de la muestra al gel. Finalmente, se agregó aceite mineral con una pipeta sobre la tira para

prevenir la deshidratación y la precipitación de la urea. El IEF se desarrolló en un equipo PROTEAN IEF de Biorad®, y previo al programa de focalización la tira se rehidrató durante 12 h bajo condiciones activas (voltaje aplicado de 50 V). La tira se enfocó para un total de 120.000 V/h utilizando el siguiente programa de corrida: 250 V por 15 min lento, 2.000 V por 2 h lento, 8.000 V por 4 h lineal, 10.000 V por 11 h lineal. La temperatura de la plataforma de Peltier se fijó durante toda la corrida a 20 °C. Para preparar la tira de ReadyStrip IPG para la segunda dimensión, ésta se quitó de la bandeja de focalización y se equilibró durante 15 min en 5 mL del primer amortiguador de equilibrio (Tris-HCl 50 mM, pH 8,8, urea 6 M, SDS 2 %, glicerol 30 %, y DTT 1 %). Luego se pasaron las tiras a un segundo amortiguador de equilibrio con la misma composición que el paso anterior pero con yodoacetamida al 1,5% en sustitución del DTT. Para la segunda dimensión (SDS-PAGE) las tiras de ReadyStrip IPG se transfirieron a geles SDS-PAGE (12,5 % de acrilamida) y se cubrieron con agarosa al 0,5 % en amortiguador de Laemmli luego de aplicar el patrón de peso molecular (BenchMark™ Ladder, Invitrogen®). Los geles se corrieron toda la noche a bajo voltaje (~ 50 V). Luego de la electroforesis, los geles se removieron y se tiñeron con nitrato de plata.

2.8.6. Tinción con nitrato de plata de los geles bidimensionales

Luego de la electroforesis los geles se fijaron con 30 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) ácido acético en agua destilada durante toda la noche. Después se lavaron tres veces con 30 % (v/v) etanol en agua destilada durante 20 min, y adicionalmente una vez con agua durante 15 min para remover el ácido remanente. Los geles se sensibilizaron durante 1 min en una solución que contiene 0,25 g/l de ditionito, y estos se lavaron con dos cambios de

agua destilada durante 1 min cada uno. Posterior al lavado, los geles se sumergieron en una solución de 0,2 % (p/v) de AgNO_3 , 1 mM formaldehído, y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min. La solución de AgNO_3 se descartó y los geles se lavaron con agua destilada por 1 min. Los geles se desarrollaron con una solución que contiene 6 % (p/v) Na_2CO_3 , 6 mM formaldehído, 20 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, y se agitó vigorosamente hasta que la solución adquirió un color amarillo, en este momento se descartó la solución y se reemplazó por una porción fresca. Es fundamental que el desarrollo se realice en una solución transparente. Una vez que se adquirió la intensidad deseada de la tinción, la solución de desarrollo se descartó, se agregó 5 % (v/v) ácido acético en agua destilada, y se dejó en agitación por 10 min. Finalmente, los geles se lavaron cuatro veces con agua destilada, y se guardaron a 4 °C en 1 % (v/v) ácido acético en agua destilada hasta ser utilizados.

2.8.7. Selección de proteínas de los geles 2D-PAGE y secuenciación por espectrometría de masas

Las intensidades de las señales de las proteínas de interés se determinaron mediante el programa computacional de tratamiento de imágenes PDQuest (Biorad®). Se seleccionaron las manchas que mostraron un cambio relativo por sobre $\pm 1,5$ veces. Las manchas seleccionadas se aislaron del gel de SDS-PAGE y se enviaron para su posterior secuenciación mediante espectrometría de masas (MS) con un equipamiento de desorción/ionización de láser asistida por matriz y un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). Las muestras se procesaron en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología de España (CSIC). Los datos de los iones MS/MS producidos con este método se utilizaron para identificar las proteínas mediante su búsqueda en las

bases de datos de secuencias aminoacídicas de proteínas (Mascot, Matrix Science). Los parámetros de tolerancia del péptido (± 2 Da) y la tolerancia de MS/MS ($\pm 1,2$ Da) se limitaron y el tipo de instrumento se fijó en MALDI-TOF. Las búsquedas se realizaron contra la base de datos de proteínas anotadas para el genoma secuenciado de *S. solfataricus* P2 (DSM1617).

2.8.8. Expresión y purificación de la proteína PPX recombinante (PPXr) de *S. solfataricus*

Para la inducir la expresión de la proteína PPXr se crecieron 400 mL de cultivo de la cepa M16-PPX de *S. solfataricus* hasta alcanzar una DO_{600} de 0,4 y se adicionó D-arabinosa (0,2 %) seguido de incubación durante 4 h. Luego de la inducción, las células se colectaron por centrifugación durante 15 min a $4.500 \times g$ y el sedimento de células se lisó mediante sonicación de acuerdo al protocolo descrito en la sección 2. El lisado se sometió a ultracentrifugación a $100.000 \times g$ durante 1 h a $4^{\circ}C$. El sobrenadante obtenido (5 ml) se aplicó sobre una columna que contenía 1 mL de resina his-NTA cargada con $NiSO_4$ (Sigma-Aldrich). La columna se lavó 3 veces con 800 μL de amortiguador de lavado (Hepes, 50 mM, pH 8,5, KCl, 50 mM e imidazol, 30 mM). Finalmente la proteína PPXr se eluyó en 3 fracciones, cada una con 400 μL amortiguador de elución (Hepes, 50 mM, pH 7,0, KCl, 50 mM e imidazol, 250 mM). Las fracciones colectadas (0,5 mL) se analizaron mediante SDS-PAGE y “Western-blotting”.

2.8.9. Detección inmunológica de las proteína PPXr de *S. solfataricus* mediante "Western- blotting"

La expresión de la proteína PPXr de *S. solfataricus* se detectó mediante "Western-blotting". Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa. Se aplicó una corriente constante de 80 mA durante 60 min. La eficiencia de la electrotransferencia se confirmó mediante el uso de marcadores moleculares preteñidos (New England Biolabs) y tiñendo el gel después de la electrotransferencia con azul de Comassie R-250.

La membrana que contenía las proteínas transferidas se incubó por 2 h con amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM (TBS), Tween-20 0,1 % (TBS-T) y seroalbúmina bovina (BSA) 1 % (TBS-T-BSA). Luego se lavó tres veces por 15 min cada vez con TBS-T y se incubó por toda la noche con el anticuerpo monoclonal anti-His de conejo en una dilución 1/5.000. Seguidamente, la membrana se lavó tres veces por 20 min cada vez con TBS-T. Se incubó por 2 h con anticuerpos monoclonales anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Amersham) como anticuerpo secundario a una dilución 1/5.000. Se hicieron tres lavados de la membrana con TBS-T. La detección de la reacción antígeno-anticuerpo sobre la membrana se realizó mediante el método colorimétrico de Promega. Este consistió en incubar la membrana con amortiguador TBS que contenía metanol al 20 %, 0,5 mg/mL 4-cloro-1-naftol (Biorad), 0,15 % H₂O₂ (Merck) por 5-15 min. La reacción se realizó en la oscuridad y luego se visualizaron las bandas.

2.9. Métodos bioinformáticos

Se utilizó el programa Artemis 9.0 para el análisis de las secuencias genómicas de *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* y *S. tokodaii*. Los marcos de lectura abiertos y sus secuencias aminoacídicas se analizaron con el programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). El análisis de las identidades y similitudes en los bancos de datos se realizó mediante los programas BLASTx y BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se utilizaron diferentes tipos de matrices (BLOSUM y PAM). Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) y se editaron con el programa BOXSHADE 3.21. Las secuencias de los genes *cop* de *S. metallicus* se ensamblaron en el programa vector NTi 10.0 (Invitrogen®). La búsqueda de dominios conservados en las secuencias aminoacídicas se realizaron con el programa SMART4.0 (<http://smart.embl.de/>) (Letunic y col., 2004). Todos los partidores utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real se diseñaron con el programa WEB Primer Quest (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>).

3. RESULTADOS

3.1. Búsqueda de genes *cop* de resistencia al cobre en el genoma de *S. metallicus*

3.1.1. Determinación de la presencia de genes *cop* en el genoma de *S. metallicus*

El operón *cop* de resistencia al cobre está altamente conservado en *Archaea*, e incluye un regulador transcripcional (*copT*), una metalochaperona de cobre (*copM*) y una ATPasa para la expulsión del metal (*copA*) (Ettema y col., 2003). Debido a que aún no se dispone de la secuencia genómica de *S. metallicus*, se realizaron experimentos de DOP-PCR y CODEHOP-PCR para determinar la presencia de estos genes en el genoma del microorganismo.

Se diseñaron partidores DOP (“degenerate oligonucleotide primers”) y CODEHOP PCR (“consensus-degenerate oligonucleotide primers”) a partir de las regiones de consenso en las secuencias aminoacídicas CopA, CopM y CopT codificadas en el genoma de las arqueas *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* y *S. tokodaii* (Anexo 2). En la figura 8 se representa esquemáticamente el tipo de partidor utilizado para los ensayos de PCR y su ubicación aproximada dentro de la secuencia nucleotídica, tomando como referencia la organización de los genes *cop* en el genoma de *S. solfataricus*. Las secuencias de los partidores utilizados se detallan en el Anexo 3.

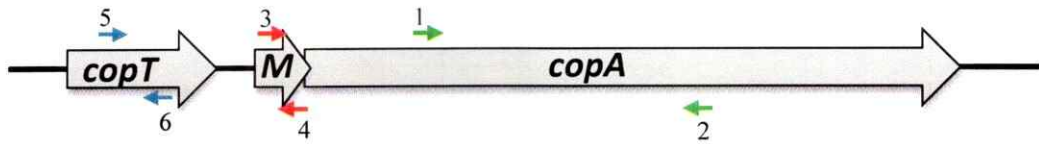


Figura 8. Representación esquemática del grupo de genes *cop* en *S. solfataricus*. Las flechas en verde representan los partidores CODEHOP (1: *copA_cdegF* y 2: *copA_cdegR*) diseñados para la amplificación del gen *copA*. En rojo se muestran los partidores DOP (3: *copM_degF* y 4: *copM_degR*) sobre la secuencia del gen *copM*. Para la amplificación del gen *copT* se utilizaron partidores específicos al gen *copT* de *S. solfataricus* (flechas azules) (5: *copT_S.soF* y 6: *copT_S.soR*).

Los resultados de los ensayos de PCR utilizando los partidores DOP para *copM* y CODEHOP para *copA* se muestran en el panel A y B de la figura 9, respectivamente. Estos productos de PCR mostraron los tamaños esperados. Adicionalmente y suponiendo que la organización génica pudiera conservarse en *S. metallicus* igual que en *S. solfataricus*, es decir el gen *copM* río arriba de *copA*, se utilizó la combinación de partidores *copM_degF* y *copA_cdegR* en una PCR (Fig 8). El resultado de este ensayo rindió un amplicón de ~ 2000 pb, que correspondió al tamaño esperado (Fig. 9C). Debido a que en los ensayos de CODEHOP-PCR para el gen *copT* no se obtubieron resultados positivos (resultados no mostrados), se decidió alternativamente diseñar partidores específicos a regiones de consenso a nivel de secuencia nucleotídica, en los genes *copT* presentes en los genomas de los *Sulfolobales*. Esta PCR rindió un producto del tamaño esperado de ~ 350 pb (Fig. 9D).

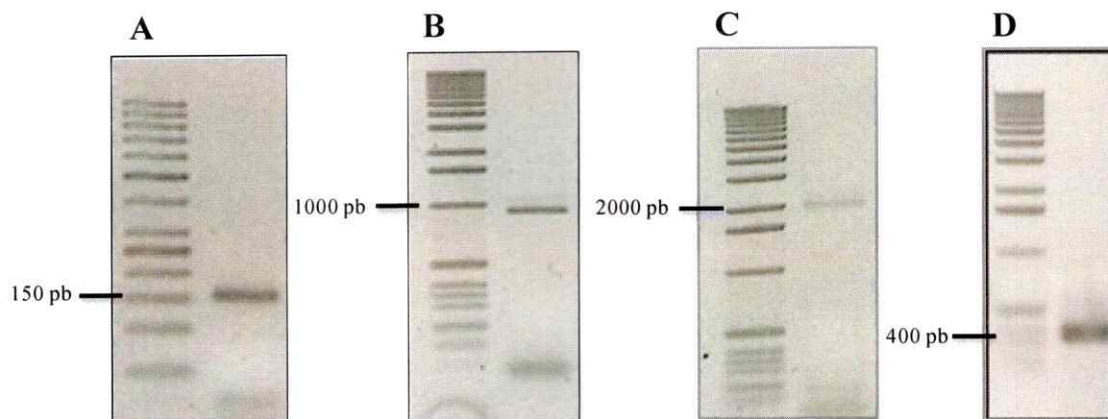


Figure 9. Amplificación parcial de los probables genes *copM*, *copA* y *copT* mediante DOP-PCR, CODEHOP-PCR y PCR específico desde el genoma de *S. metallicus*. Se tomaron las secuencias aminoácidas de CopA y CopM de *S. acidocaldarius*, *S. tokodaii* y *S. solfataricus* y se buscaron bloques conservados mediante el programa Block Maker. Mediante este análisis se diseñaron partidores DOP para *copM* y CODEHOP para *copA*. Alternativamente se diseñaron partidores específicos para regiones nucleotídicas de consenso en las secuencias de genes *copT* presentes en las arqueas mencionadas anteriormente. Los ensayos de PCR utilizando DNA genómico de *S. metallicus* como templado arrojaron los productos de los tamaños esperados: ~150 pb para *copM* (A), ~950 pb para *copA* (B), ~2000 bp para *copMA* y ~350 pb para *copT* (D).

Para conocer la identidad de los fragmentos amplificados, éstos se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO, se secuenciaron y las secuencias nucleotídicas se analizaron mediante el programa Blastx. La secuencia de ~150 pb amplificada a partir de los partidores DOP para *copM*, arrojó un marco abierto de lectura (ORF) que presentó un 63 % de identidad a nivel aminoácido con la proteína CopM de *S. solfataricus* (SSO10823). Esta secuencia incompleta se denominó *copM1_S.m(p)*, donde p es “secuencia parcial”. Al realizar estos mismos análisis sobre la secuencia de ~950 pb (*copA1_S.m(p)*), obtenida con los partidores CODEHOP para *copA*, se obtuvo un ORF que mostró una identidad del 54 % con la proteína CopA de *S. solfataricus* (SSO2651). Por su parte, la secuencia de ~2000 pb (*copMA_S.m(p)*), obtenida de la combinación de los partidores *copM_degF* - *copA_cdegR*, resultó en 2 ORFs, cada uno de ellos mostró una identidad cercana al 90% con las proteínas

CopM y CopA de *S. solfataricus*, respectivamente. Al alinear cada uno de estos ORF con *copM1_S.m(p)* y *copA1_S.m(p)*, respectivamente, éstos no mostraron ser idénticos. La nueva secuencia parcial para *copM* presentó un 66 % de identidad con *copM1_S.m(p)* y el otro nuevo fragmento para *copA* mostró un 52 % de identidad con *copA1_S.m(p)*. El resultado de este análisis sugirió fuertemente que existirían 2 copias para cada uno de los genes *copM* y *copA* en el genoma de *S. metallicus*. Estas nuevas secuencias parciales se denominaron *copM2_S.m(p)* y *copA2_S.m(p)*. Finalmente, el análisis sobre la secuencia de ~ 350 pb amplificada utilizando los partidores *copT_S.soF* y *copT_S.soR* resultó en un ORF incompleto con un 88% de identidad a la proteína CopT de *S. solfataricus* (SSO2652). Ésta secuencia se denominó *copT2_S.m(p)* debido a que el grado de identidad mostrado con *S. solfataricus* es similar al que presentaron las secuencias *copA2_S.m(p)* y *copM2_S.m(p)*, con sus respectivos homólogos. Estos análisis nos permiten suponer que estos genes putativos podrían ubicarse dentro de un mismo grupo en el genoma.

Los resultados obtenidos utilizando las estrategias de DOP-PCR, CODEHOP-PCR y PCR específico sugieren la ocurrencia en el genoma de *S. metallicus* de al menos 2 copias diferentes para cada uno de los genes *copM* y *copA* y 1 copia del gen *copT*. Aunque estos genes putativos no se han aislados completamente, sus secuencias parciales muestran una alta identidad con aquellas presentes en el genoma de *S. solfataricus*. Considerando la longitud promedio que muestran estos mismos genes en otras arqueas, las secuencias conocidas hasta aquí desde *S. metallicus*, corresponderían aproximadamente a un 40% para *copA1*, 88% para *copM1*, 80% para *copA2*, 91% para *copM2* y 65% para *copT2*. Para conocer la secuencia completa de los marcos abiertos de lectura de estos probables genes *cop* en *S. metallicus*, se

utilizó la metodología de “genome walking”. Los resultados de esos ensayos se describen en la sección siguiente.

3.1.2. Aislamiento de los genes *cop* desde el genoma de *S. metallicus* mediante “Genome Walking”

La estrategia de “genome walking” se realizó según lo descrito por Acevedo y cols. (2008). Se construyeron 6 bibliotecas de digestión del DNA génomico de *S. metallicus* utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Nde*I y *Pst*I. A cada una de estas bibliotecas se le ligó un cassette adaptador de DNA en los extremos 3' y 5' de los productos de digestión. Los productos de esta ligación (producto de digestión + cassette adaptador) sirvieron como templado para 2 reacciones de PCR sucesivas. A partir de las secuencias parcialmente conocidas de *copA1_Sm*(p), *copA2_Sm*(p), *copM1_Sm*(p), *copM2_Sm*(p) y *copT2_Sm*(p) se diseñaron 2 partidores específicos para la amplificación de la región 3' terminal y 2 partidores específicos para la amplificación de la región 5' terminal de cada gen. Inicialmente se realizó una amplificación lineal utilizando uno de los partidores específicos (SP1). El producto de esta primera PCR sirvió como templado para la amplificación de las regiones 3' y 5' desconocidas para cada gen, utilizando como partidores el segundo partidor específico (SP2) y el partidor AdaptF que aparece en el cassette adaptador. Algunos de los productos obtenidos a partir de esta segunda PCR se muestran en la figura 10. Estos fragmentos de PCR se clonaron y se secuenciaron.

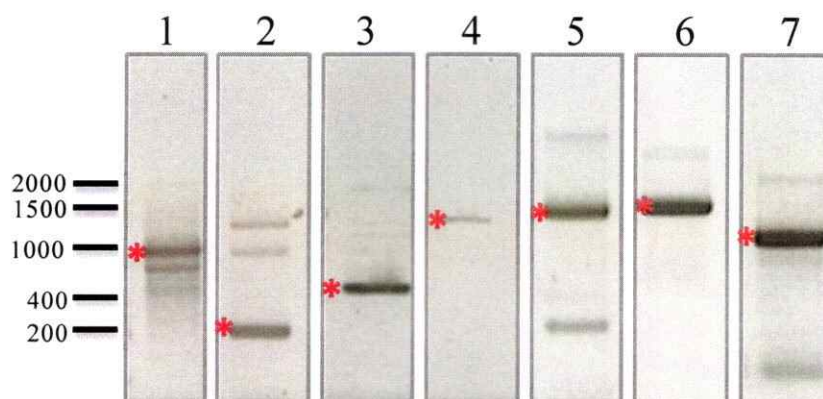


Figura 10. Productos de “Genome Walking” para la identificación de las regiones desconocidas de los genes *cop* de *S. metallicus*. En las líneas (1) y (2) se muestra la amplificación de la región 5' del gen *copA1*, aislados desde las bibliotecas de digestión *EcoRV* y *PstI*, respectivamente. En (3) y (4) la región 3' del gen *copA1*, amplificado desde las bibliotecas *EcoRI* y *PstI*. La línea (5) corresponde a la región 5' del gen *copT1*, aislado desde la biblioteca *EcoRV*. En (6) y (7) se muestra la amplificación de la región 5' y 3' de *copA2*, respectivamente, aisladas desde las bibliotecas *HindIII* y *NdeI*. El símbolo (*) señala el fragmento de PCR que se purificó y secuenció. Las barras negras al costado izquierdo indican los tamaños en pares de bases respecto al estándar de peso molecular utilizado.

A partir de los resultados de la secuenciación de la región 5' de *copA1* se pudo confirmar la presencia del gen *copM1* y establecer además la existencia de un probable gen *copT1*, ubicado río arriba de *copM1* (Fig. 10, líneas 1 y 2). La secuencia parcial de *copT1* se completó posteriormente mediante otros ensayos de “Genome Walking” (Fig. 10, línea 5). Por su parte, los resultados de la secuenciación de la región 5' de *copA2* (Fig. 10, línea 6) también permitió confirmar la presencia de *copM2* y del gen *copT2*, el que había sido identificado mediante los ensayos de PCR específico. Desafortunadamente los ensayos de “genome walking” destinados a conocer la región 5' del gen *copT2* no rindieron resultados satisfactorios, ya que las secuencias de los productos obtenidos no mostraron relación con la secuencia *copT2* (resultados no mostrados).

Finalmente, mediante el ensamblaje de las secuencias aisladas previamente por CODEHOP-PCR, DOP-PCR, PCR específico y las sucesivas secuenciaciones laterales obtenidas por "genome walking" se determinó la presencia en el genoma de *S. metallicus* de 2 loci que codificarían para genes homólogos posiblemente involucrados en la resistencia al cobre. Hemos denominado a cada grupo de genes como locus *cop1* con un total de 4.346 bases nucleotídicas secuenciadas y locus *cop2* con 3.435 bases nucleotídicas (Fig. 11). Estos resultados permiten proponer que *S. metallicus* constituiría, a la fecha, el único representante del dominio *Archaea*, que presenta una versión duplicada de este grupo de genes *cop* en su genoma, a juzgar por los análisis realizados en los 71 genomas de las arqueas disponibles hasta ahora.

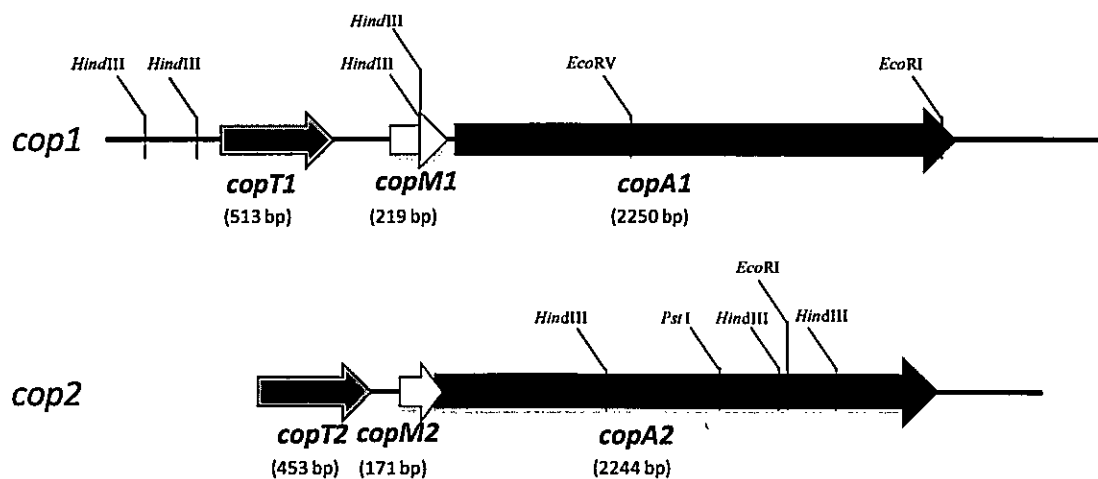


Figura 11. Representación esquemática de los 2 grupos de genes *cop* aislado desde el genoma de *S. metallicus*. El locus *cop1* contiene 3 marcos abiertos de lectura completos, *copT1* (513 pb), *copM2* (219 pb) y *copA1* (2250 pb) y una región intergénica entre *copT1* y *copM1* de 232 pb. Para la región *cop2* fue posible aislar 2 marcos abiertos de lecturas completos, *copM2* (171 pb) y *copA2* (2244 pb), y un marco de lectura abierto incompleto para *copT2* (453pb). En *cop2* los genes *copM2* y *copA2* se superponen en 11 nucleótidos. La región intergénica entre *copT2* y *copM2* es de 89 pb.

Cada una de estas regiones genómicas (*cop1* y *cop2*) contienen 3 ORFs orientados en tándem, que codificarían para un regulador transcripcional (CopT), una metalochaperona de cobre (CopM) y un transportador de tipo ATPasa (CopA) posiblemente involucrado en la expulsión del metal. Adicionalmente, dado que la estructura de cada locus presenta una región no codificante entre los respectivos genes *copT* y *copM* se realizaron análisis para determinar la presencia de posibles secuencias promotoras. Esta búsqueda se efectuó manualmente, ya que las herramientas bioinformáticas no rindieron resultados positivos. Para ello, se utilizaron las secuencias de los elementos BRE y TATA identificadas en la región intergénica *copT-copM* de *S. solfataricus* (Fig. 12) (Ettema y col., 2006). Así, se determinó un posible promotor en el locus *cop2* que mostró una caja TATA idéntica a la descrita para *S. solfataricus* y un elemento BRE que presentó sólo una base nucleotídica distinta (Fig. 12). Estos elementos se ubican río arriba a una distancia similar a la mostrada por *S. solfataricus*, tomando como referencia el codón ATG del gen *copM*.

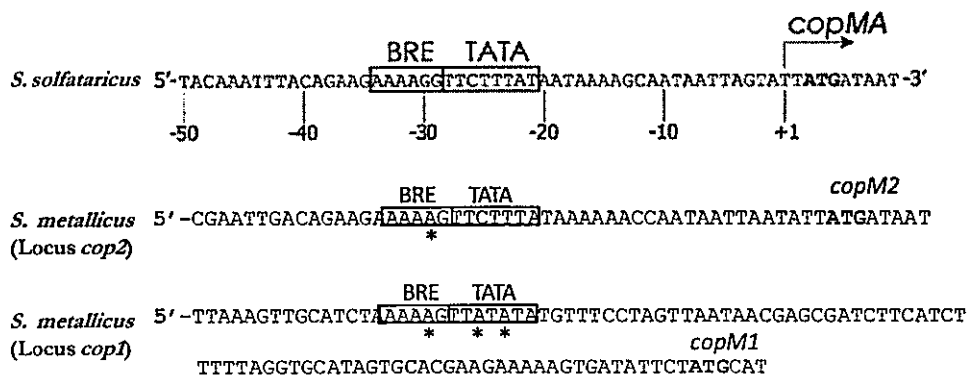


Figura 12. Búsqueda “*in silico*” de secuencias promotoras en los loci *cop* de *S. metallicus*. Se muestran en rectángulos los elementos BRE (caja de unión del factor TFB) y TATA descritos para la región intergénica *copT-copM* de *S. solfataricus*. El +1 indica el inicio de la transcripción (Ettema y col., 2006). Los símbolos * señalan los nucleótidos distintos respecto de la secuencia de *S. solfataricus* y el codón ATG de los respectivos genes *copM* está destacado en “negrita”.

Por su parte, los análisis sobre el locus *cop1* también arrojaron la posibilidad de una secuencia promotora. Sin embargo, esta presentó menor consenso respecto de los elementos descritos para *S. solfataricus* (Fig. 12), y su ubicación resultó aproximadamente 75 pares de bases río arriba respecto del codón ATG del gen *copM1*. Adicionalmente, los análisis realizados en la región no codificante ubicada río arriba del gen *copT1* no mostraron elementos promotores que pudieran estar en consenso con los que se han descrito en *S. solfataricus* (resultados no mostrados).

3.1.3. Análisis de las secuencias aminoacídicas codificadas en las regiones genómicas *cop1* y *cop2* de *S. metallicus*

Las secuencias aminoacídicas codificadas en las regiones genómicas *cop1* y *cop2* de *S. metallicus* se analizaron mediante BLAST y SMART 4.0 con el objeto de establecer la identidad de secuencia con sus ortólogos y para determinar la presencia de dominios y/o motivos de secuencia que pudieran sugerir la funcionalidad de estas proteínas putativas.

En términos generales, las secuencias aminoacídicas mostraron un alto grado de identidad con sus ortólogos presentes en otras arqueas *Sulfolobales* (Tabla 2). Todas las proteínas putativas de *S. metallicus*, con excepción de CopM1, presentaron un mayor grado de identidad con aquellas presentes en *S. solfataricus*. CopM1 mostró mayor identidad con su ortólogo en *S. tokodaii* y *M. sedula* (Tabla 2). Interesantemente, todos los péptidos codificados por la región *cop2* mostraron un grado de identidad cercano al 90% comparado con sus ortólogos codificados en *Sulfolobus solfataricus*. La proteína putativa CopT1 mostró el menor grado de identidad con sus ortólogos (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de las secuencias aminoacídicas codificadas por los genes *cop* de *S. metallicus* con sus ortólogos presentes en otros microorganismos Sulfolobales.

Proteína de <i>S. metallicus</i>	% de identidad con sus ortólogos			
	<i>S. solfataricus</i>	<i>S. acidocaldarius</i>	<i>S. tokodaii</i>	<i>M. sedula</i>
CopA1	51	43	44	45
CopA2	88	46	49	50
CopM1	63	69	71	71
CopM2	89	72	70	77
CopT1	36	27	30	32
CopT2*	90	52	52	53

Las secuencias aminoacídicas se analizaron mediante el programa Blastp. Los números en "negrita" indican el ortólogo con quien presenta la más alta identidad de secuencia.

* Se refiere al análisis de identidad obtenido con la secuencia incompleta de CopT2, que corresponde a un ~ 90 % en longitud de secuencia comparado con CopT de *S. solfataricus*.

Las ATPasas putativas CopA1 (749 aa) y CopA2 (747 aa), que tenían un 51,3 % de identidad entre ellas, presentaron todos los dominios y motivos que son característicos en las ATPasas involucradas en el transporte de metales (Fig. 13). Estos transportadores de metales pertenecen a una sub clase de las ATPasas tipo P, denominadas ATPasas tipo CPx (CPx-ATPasas). Este nombre proviene del motivo de secuencia CPC ó CPH (a veces también motivo SPC) altamente conservado en estas ATPasas, ubicado en el centro de una de las hélices de transmembrana. Más aún, se ha sugerido que los aminoácidos que flanquean este motivo (CPC / CPH / SPC) estarían involucrados en la especificidad del ión a transportar. Así, una CPx-ATPasa con un motivo CPCALVIS se propone para el transporte de Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , o Hg^{2+} , mientras que en la mayoría de las ATPasas que transportan Cu este motivo es CPCALGLA (Solioz y Stoyanov, 2003). La ocurrencia en las

secuencias peptídicas CopA1 y CopA2 de *S. metallicus* del motivo translocador de Cu (CPCALGLA), así como de los dominios característicos de los transportadores ATPasas del tipo CPx, nos permiten suponer que estas proteínas podrían ser funcionales en *S. metallicus* (Fig. 13).

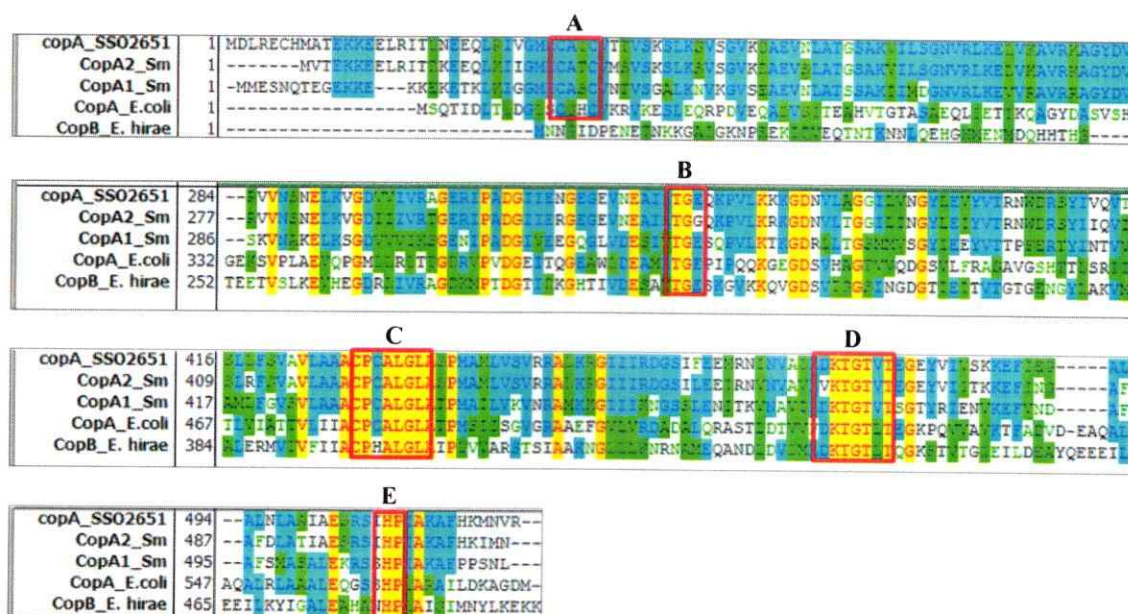


Figura 13. Alineamiento de las proteínas putativas CopA1 y CopA2 de *S. metallicus* con las ATPasas de cobre CopA de *E. coli* y CopB de *E. hirae*. Los dominios y motivos de secuencia conservados se indican en los rectángulos rojos. **A:** dominio CxxC de unión al metal, **B:** dominio de actividad fosfatasa, **C:** dominio translocador del metal, **D:** dominio de fosforilación y **E:** motivo conservado HP. En el alineamiento también se incluye la proteína CopA de *S. solfataricus* (copA_SSO2651).

Por otra parte, los análisis efectuados en las secuencias peptídicas CopM1 (71 aa) y CopM2 (56 aa), arrojaron la presencia de un dominio de unión a metal tipo TRASH (“trafficking, resistance and sensing of heavy metals”) (Fig. 14). Este dominio de cisteínas (C-X_{19,22}-C-X₃-C) se ha descrito recientemente como un componente funcional para el

señalar que en reguladores transcripcionales el motivo que define al dominio TRASH se encuentra extendido en una cisteína (C-X₂-C-X₁₉₋₂₂-C-X₃-C) (Ettema y col., 2003) (Fig. 15).

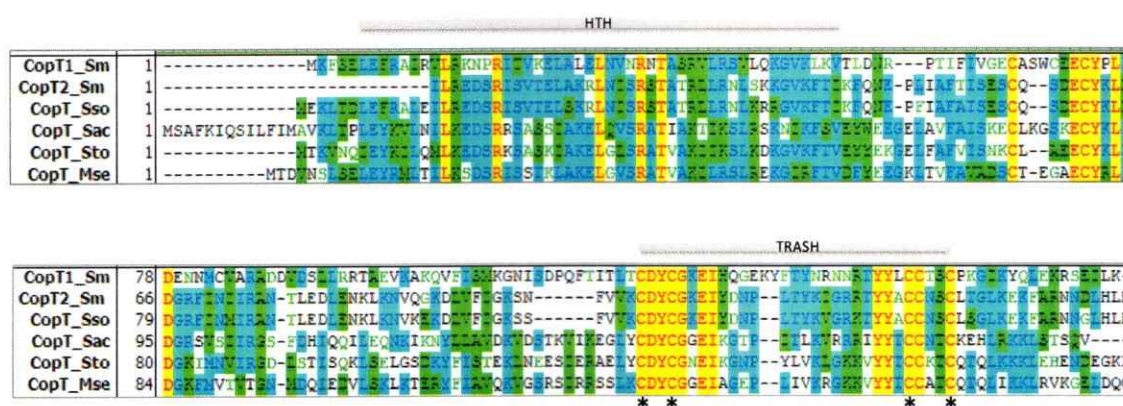


Figura 15. Alineamiento de las proteínas putativas CopT presentes en *S. metallicus* y en otras arqueas *Sulfolobales*. El dominio TRASH y el dominio HTH se indican con una barra gris sobre el alineamiento. Los símbolos * indican la posición de las cisteínas conservadas en el dominio TRASH. S.m: *S. metallicus*, S.so: *S. solfataricus*, S.ac: *S. acidocaldarius*, S.to: *S. tokodaii* y M.se: *M. sedula*.

3.2. Caracterización de la expresión de los genes *cop* putativos de *S. metallicus*

3.2.1. Determinación de la expresión de los genes *copA1* y *copA2* de *S. metallicus* en presencia de distintos metales

Se realizaron ensayos de Northern blot para evaluar la expresión de los genes *copA1* y *copA2* durante el crecimiento de *S. metallicus* en la presencia de varios metales. Para ello, se creció el microorganismo en la presencia de Cu, Zn, Cd, Ni o Ag. Cada uno de estos metales se adicionó desde el inicio del cultivo y a concentraciones reportadas como

permisivas para el crecimiento (Huber y Stetter, 1991). Para los experimentos de Northern blot se extrajo el RNA total cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial tardía en su crecimiento, y se utilizaron como sondas fragmentos de estos ORFs. Como se observa en la figura 16, los genes *copA1* y *copA2* se expresaron específicamente en la presencia de CuSO_4 y CdSO_4 . Este patrón de expresión se ha descrito para *S. solfataricus*, donde la expresión del gen *copA* también aumentó específicamente frente a la exposición a Cu y Cd (Ettema y col., 2006). Por su parte, los tamaños de los transcritos *copA1* y *copA2*, de $\sim 2,5$ Kb, se corresponden con los de los genes individuales, cada uno de ellos de $\sim 2,25$ Kb de longitud desde sus codones de inicio hasta los codones de término.

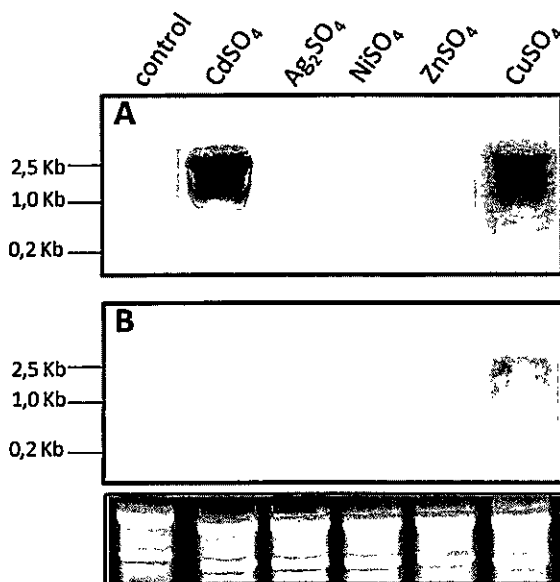


Figure 16. Análisis de Northern blot para determinar la expresión de los genes *copA1* y *copA2* de *S. metallicus* en respuesta a varios metales. Se utilizaron 5 μg de RNA total extraídos desde cultivos de *S. metallicus* crecidos en ausencia (control) o la presencia de CdSO_4 (4 mM), Ag_2SO_4 (0,08 mM), NiSO_4 (15 mM), ZnSO_4 (50 mM) o CuSO_4 (20 mM). En el panel (A) se muestran los resultados obtenidos utilizando una sonda para *copA1*. En (B) se utilizó una sonda para *copA2*. En la parte inferior de la figura se muestran los rRNAs como control del material aplicado en cada carril.

Los resultados obtenidos mediante Northern blot permiten sugerir que la expresión de los genes *copA1* y *copA2* podría estar dando cuenta de un mecanismo de exportación de cobre y cadmio mediado por los transportadores de tipo ATPasas codificadas por estos genes.

3.2.2. Análisis de co-expresión de los genes *copM* y *copA* de *S. metallicus*

La organización genómica que presentan los genes *cop*, orientados en tandem en ambos loci, sugiere que ellos podrían expresarse formando una misma unidad transcripcional. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante Northern blot, donde los transcritos mostraron un tamaño cercano a ~2,5 Kb (Fig. 16), permiten descartar la ocurrencia de los policistrones *copTMA*, quienes deberían presentar un tamaño aproximado de ~3,25 Kb y ~3,0 Kb para las regiones *cop1* y *cop2*, respectivamente. No obstante, estos ensayos de hibridación no descartan una eventual co-transcripción de los respectivos genes *copM* y *copA*, considerando además, que se ha descrito recientemente la ocurrencia de este policistrón *copMA* en las arqueas *F. acidarmanus* y *S. solfataricus* (Baker-Austin y col., 2005; Ettema y col., 2006). Conforme a estos antecedentes se desarrollaron experimentos de RT-PCR para determinar la co-transcripción de los respectivos pares génicos *copMA*. Para ello, se desarrollaron reacciones de PCR utilizando como molde cDNAs sintetizados a partir de RNA total de *S. metallicus* crecido en la presencia de 20 mM de CuSO₄ y parejas de partidores ubicados en los genes contiguos. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 17. Así, al desarrollar una PCR utilizando los partidores señalados se obtuvieron amplificadores de los tamaños correspondientes a un molde que comprende ambos genes.

Este resultado confirma que los genes *copA* y *copM* de cada región *cop* se transcriben formando una misma unidad transcripcional.

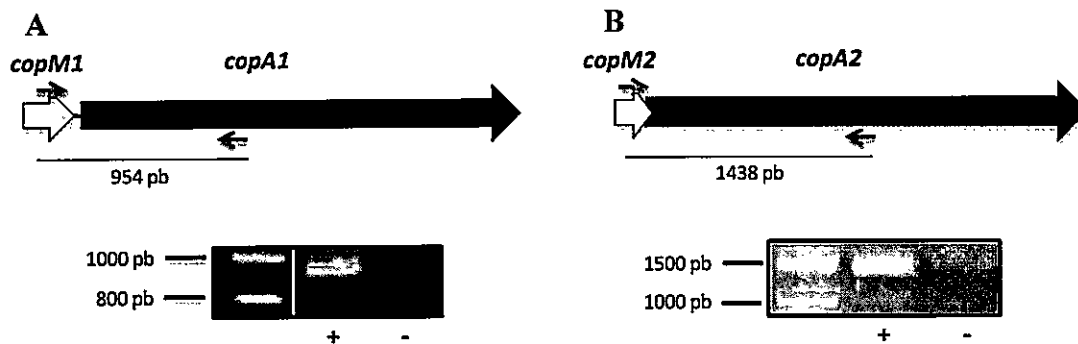


Figura 17. Análisis de la co-expresión de los genes *copM* y *copA* en *S. metallicus*. Se extrajo RNA total de *S. metallicus* crecido en presencia de 20 mM de CuSO_4 . A partir de este RNA, se generaron cDNAs, que sirvieron como molde para una reacción de PCR, utilizando un partidor directo en *copM* y uno antisentido en *copA*, los que se indican mediante flechas en la parte superior del diagrama (paneles A y B). En cada caso, sobre los gels de agarosa el signo (-) indica que a la reacción de síntesis de cDNA no se agregó transcriptasa reversa para detectar una eventual contaminación con DNA genómico, mientras que el signo (+) indica que la reacción se realizó en presencia de la enzima.

3.2.3. Análisis de la expresión diferencial de los genes *copA1*, *copA2*, *copT1* y *copT2* de *S. metallicus* crecido en la presencia de distintas concentraciones de cobre

3.2.3.1. Crecimiento de *S. metallicus* en la presencia de distintas concentraciones de cobre

Hemos demostrado que *S. metallicus* puede desarrollarse en la presencia de hasta 200 mM de CuSO_4 . Sin embargo, en tan altas concentraciones de cobre el crecimiento del microorganismo se ve fuertemente afectado (Remonsellez y col., 2006). Por lo tanto, para los análisis de la expresión diferencial de los genes *cop* se realizaron cultivos de *S. metallicus*

con el fin de determinar un rango de concentraciones de cobre que no afectaran significativamente su crecimiento. Así, la selección de este rango de concentraciones nos permitirá observar sólo la respuesta frente a la adición de cobre y excluir otros fenómenos que pudieran tener relación con una situación de estrés general, producto de la nocividad de las altas cantidades de cobre. Como se observa en la figura 18, cuando *S. metallicus* se creció en la presencia de 5 mM de Cu^{2+} mostró una curva de crecimiento muy similar a la condición control en ausencia de CuSO_4 . Por su parte, la adición de 20 y 50 mM de Cu^{2+} afectó ligeramente las tasas de crecimiento y las densidades celulares alcanzadas en la fase estacionaria del crecimiento fueron levemente inferiores en comparación con el control. No obstante, en la presencia de 100 y 200 mM de CuSO_4 , se observó una fase de latencia más prolongada, así como también una reducción de aproximadamente el 40 % y el 50 %, respectivamente, de la densidad celular al alcanzar la fase estacionaria (Fig. 18).

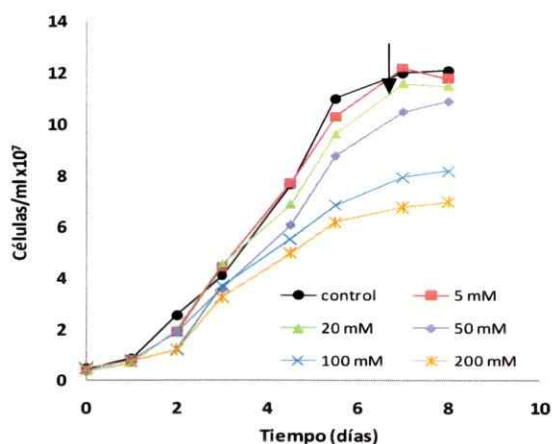


Figura 18. Efecto del cobre en el crecimiento de *S. metallicus*. El microorganismo se inoculó a una concentración de 5×10^6 células/mL y en la ausencia (control) ó la presencia de 5, 20, 50, 100 y 200 mM de CuSO_4 . La flecha indica el tiempo en el cual se cosecharon las células para la extracción del RNA total.

De acuerdo a estos resultados, para los ensayos de la expresión diferencial de los genes *cop* se seleccionaron concentraciones de CuSO_4 que no superen los 50 mM. Adicionalmente, estos resultados permitieron escoger el tiempo de cultivo de 6 días para la extracción de RNA total, ya que en ese momento el microorganismo se encuentra aún en activo crecimiento, y a la vez se dispone de una masa celular suficiente (Fig. 18).

3.2.3.2. Cuantificación de los niveles de transcritos de los genes *copA1*, *copA2*, *copT1* y *copT2* de *S. metallicus* expuesto a distintas concentraciones de cobre

Para determinar si la expresión de los genes *copA1*, *copA2*, *copT1* y *copT2* de *S. metallicus* muestra un patrón diferencial respecto a la cantidad de cobre presente en el medio de cultivo, se realizaron experimentos de RT-PCR cuantitativo (RT-PCR en tiempo real). Para ello, se diseñaron partidores que permitieron la amplificación de estos genes, y se construyeron las curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de un estándar de DNA genómico de *S. metallicus* de concentración conocida. En el Anexo 4 se muestran las curvas de calibración y de fusión para los genes ensayados.

Para la cuantificación de los niveles de transcrito de los genes *copA1*, *copA2*, *copT1* y *copT2* se utilizó RNA total extraído desde cultivos crecidos en la ausencia ó en la presencia de 5, 20 y 50 mM de CuSO_4 o de un concentrado de mineral de calcopirita (CuFeS_4). A partir de estas muestras de RNA se sintetizó el cDNA y este se amplificó mediante PCR en tiempo real. En cada condición ensayada, los valores de expresión obtenidos para cada gen se normalizaron contra los valores de la expresión del gen RNAr *16s*. Cabe mencionar además, que no fue posible cuantificar la expresión de los genes *copM1* y *copM2*, ya que no se obtuvieron partidores apropiados para los ensayos de PCR en tiempo real. Si bien, hemos

demostrados que los pares génicos *copMA1* y *copMA2* se co-transcriben (sección 3.2.2), podría sugerirse que los niveles de expresión de los genes *copM1* y *copM2* serían similares a los de los genes *copA1* y *copA2*, no obstante no podemos descartar modificaciones postranscripcionales que podrían variar los niveles finales de estos transcritos.

Como se observa en la figura 19 (A), los niveles de los transcritos *copA1* y *copA2* aumentaron concomitantemente con el aumento en la concentración de cobre presente en el medio de cultivo. Junto con esto, *copA1* mostró, en todas las condiciones ensayadas, mayores niveles de transcritos en comparación con los niveles de *copA2*. Adicionalmente se puede observar, que los niveles del transcrito *copA1* aumentaron 32,5 veces cuando se comparó la condición de 50 mM de CuSO_4 con la condición control en ausencia del metal (0 mM), mientras que los niveles del transcrito *copA2* mostraron un aumento de sólo 17,5 (Tabla 3).

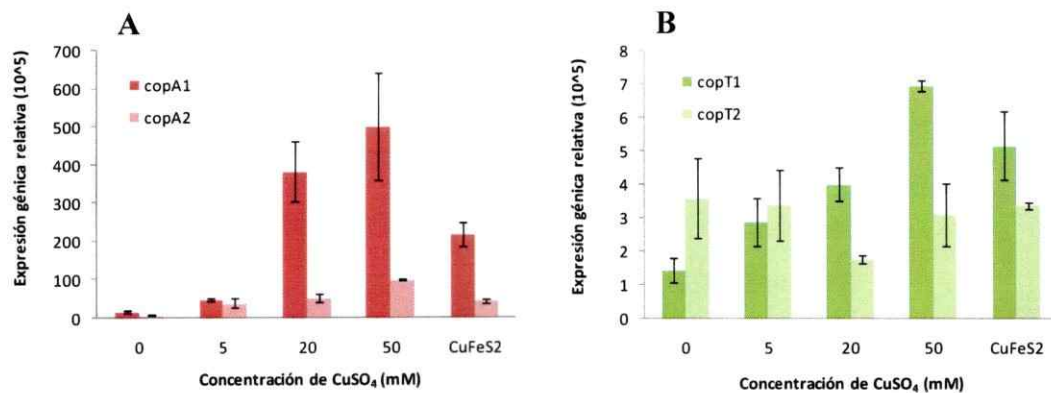


Figura 19. Cuantificación relativa de los niveles de transcritos de los genes *copA1*, *copA2* (A) y *copT1*, *copT2* (B) de *S. metallicus*. La expresión de los genes se evaluó mediante RT-PCR en tiempo real y se normalizó contra la expresión del gen *RNAr 16S*. Los valores promedio y las desviaciones estándar corresponden a los análisis de tres replicas biológicas independientes crecidas en la ausencia (0) ó la presencia de 5, 20 y 50 mM de CuSO_4 ó en un concentrado de mineral de calcopirita al 1% (CuFeS_2).

Se cuantificó también la expresión de los genes *copA1* y *copA2* cuando *S. metallicus* se creció utilizando como fuente de energía un concentrado de mineral calcopirita (CuFeS_2) (Fig. 19A). Debido a que la oxidación de este mineral, mediada por el microorganismo, produce un aumento progresivo de la concentración de ión Cu^{2+} en el medio de cultivo, quisimos conocer si la cantidad de cobre solubilizado induce la expresión de estos genes. Para este experimento se extrajo RNA total desde un cultivo de *S. metallicus* crecido hasta alcanzar la fase exponencial tardía y en la presencia de 1% de CuFeS_2 . Adicionalmente, se tomaron en paralelo alícuotas de sobrenadante (libre de células) para determinar, mediante espectrometría de absorción atómica (AAS), la cantidad de cobre total ($\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^{1+}$) presente en el medio. Así, mediante RT-PCR cuantitativo se determinó que, comparados con el control sin cobre, los niveles de los transcritos *copA1* y *copA2* aumentaron cuando *S. metallicus* se creció en la presencia de CuFeS_2 (Fig. 19A). Junto con esto, se determinó una concentración de $14,4 (\pm 2,1)$ mM de cobre total presente en el medio. Este aumento en la expresión podría ser en respuesta al cobre presente en el cultivo, producto de su solubilización desde el mineral de CuFeS_2 . Como se indica en la Tabla 3, los niveles del transcrito *copA1* aumentaron 14 veces comparados con la condición en ausencia de cobre, mientras que *copA2* mostró un aumento de 7,6 veces en sus niveles de transcritos.

En el panel B de la figura 19 se muestran los resultados de cuantificación de la expresión de los genes *copT1* y *copT2*, predichos como reguladores transcripcionales de respuesta a cobre. Los resultados de PCR en tiempo real mostraron que los niveles del transcrito *copT1* aumentaron concomitantemente con el incremento de las concentraciones de cobre ensayadas, mientras que *copT2*, con excepción de la condición 20 mM de CuSO_4 ,

presentó niveles de transcritos relativamente similares, probablemente dando cuenta de una expresión de tipo constitutiva (Fig. 19, Tabla 3).

Tabla 3. Inducción de los niveles de transcrito de los genes *copA1*, *copA2*, *copT1* y *copT2* de *S. metallicus* en presencia de distintas concentraciones de cobre.

Gen	Veces de aumento de la inducción de los transcritos			
	5mM/0mM	20mM/0mM	50mM/0mM	CuFeS ₂ /0mM
<i>copA1</i>	3,0	24,9	32,5	14,0
<i>copA2</i>	6,8	9,0	17,5	7,6
<i>copT1</i>	2,0	2,8	4,8	3,6
<i>copT2</i>	0,9	0,5	0,85	0,9

Se muestra el nivel de inducción en la condición de presencia de cobre (5, 20 y 50 mM de CuSO₄) ó calcopirita (CuFeS₂) versus la situación en ausencia de cobre (0 mM).

Los resultados obtenidos para *copT2* son consistentes con la hipótesis propuesta para *S. solfataricus*, donde se ha sugerido que el regulador transcripcional *copT*, que muestra una expresión constitutiva, funcionaría como un represor, que en presencia de cobre perdería su afinidad por la región promotora de *copMA* y permitiría la expresión de este policistrón (Ettema y col., 2006). Por su parte, el aumento de los niveles de los transcritos *copA1* y *copT1* concomitante con las mayores concentraciones de cobre presentes en el medio, permite sugerir que el regulador transcripcional putativo CopT1 podría presentar un efecto activador tanto sobre la expresión de *copMA1* como sobre sí mismo (Fig. 19, Tabla 3). Sin embargo, serían necesarios experimentos adicionales para probar este supuesto. Por otra parte, en los ensayos obtenidos en CuFeS₂, los niveles de transcritos de *copT1* aumentaron 3,6 veces respecto al control sin cobre, y *copT2* mantuvo sus niveles sin cambios (Fig. 19 y Tabla 3).

3.3. Efecto del cobre en el proteoma de membrana de *S. metallicus*

El nivel de resistencia al cobre que muestra *S. metallicus* es uno de los más altos reportados hasta ahora. Esto podría implicar que este microorganismo posea múltiples mecanismos de resistencia. De acuerdo a esto, recientemente nuestro laboratorio realizó un análisis de la expresión global del proteoma total de *S. metallicus* expuesto a CuSO_4 . Mediante esta aproximación, se identificaron proteínas que aumentaron sus niveles, cuyas funciones predichas estarían relacionadas con procesos celulares tan variados como la producción y el transporte de energía, la biosíntesis de aminoácidos, la respuesta al estrés, y la regulación de la transcripción (Remonsellez, 2007). Así, se extrae de estos resultados que el microorganismo presentaría un sistema complejo de respuesta al cobre que combinaría varios mecanismos actuando en distintos niveles celulares.

Para profundizar en estas posibilidades y basándose en que se ha propuesto que muchos de los determinantes de resistencia al cobre son de origen proteico y se ubican en la superficie celular (Das y col., 1998; Nies, 2003), en este trabajo se decidió realizar un análisis de la expresión diferencial del sub-proteoma de la membrana de *S. metallicus* expuesto a CuSO_4 . De esta forma se pretende describir los cambios a nivel de las proteínas de la membrana por el efecto de la presencia de cobre

3.3.1. Análisis de la expresión diferencial de las proteínas de membrana de *S. metallicus* expuesto a CuSO_4

Se realizaron ensayos de electroforesis bidimensional IEF/SDS-PAGE (2D-PAGE). Para ello se creció *S. metallicus* en la ausencia ó la presencia de distintas concentraciones de CuSO_4 (5, 20 y 50 mM) (Fig. 18). Dichos cultivos se cosecharon cuando

alcanzaron la fase exponencial tardía de su crecimiento y se procesaron para la preparación de las muestras de proteínas de membrana (ver sección 2.6.5). Las muestras de proteínas se separaron primero por su punto isoeléctrico (IEF) y luego por su peso molecular mediante SDS-PAGE. Para la identificación y la cuantificación de las proteínas que cambiaron sus niveles debido al efecto del cobre, se utilizó el programa computacional de procesamiento de imágenes PDQuest-2D (Biorad®). Se seleccionaron las proteínas que cambiaron su expresión en al menos $\pm 1,5$ veces respecto al control sin cobre.

El análisis de las imágenes permitió la visualización de 141, 168, 126 y 107 manchas en los geles control (sin cobre), o con 5 mM, 20 mM o 50 mM de CuSO_4 , respectivamente (Fig. 20). Junto con esto, se identificaron 6 manchas que aumentaron más de 1,5 veces en la presencia de las distintas concentraciones de cobre ensayadas. El análisis también arrojó una mancha que disminuyó sus niveles en la presencia de cobre respecto al control.

Para mayor claridad en la visualización, las secciones de los geles que contienen las proteínas que cambiaron sus niveles en respuesta a la exposición al cobre se muestran en detalle en la figura 21. Así, las proteínas de las manchas 1, 5 y 7 se identificaron en todas las condiciones ensayadas y sus niveles aumentaron concomitantemente con la cantidad de cobre presente en el medio de cultivo. La proteína correspondiente a la mancha 6 mostró un aumento de 18 y 27 veces en sus niveles en las condiciones de 5 mM y 20 mM de CuSO_4 , respectivamente, mientras que en 50 mM de CuSO_4 , su aumento fue de sólo 5,4 veces. El análisis también mostró que la proteína correspondiente a la mancha 2 aumentó sólo en las condiciones de 20 mM y 50 mM de CuSO_4 . Se obtuvo además, que la proteína de la mancha 4 disminuyó sus niveles en la presencia de 20 mM y 50 mM de CuSO_4 (Fig. 21, Tabla 4).

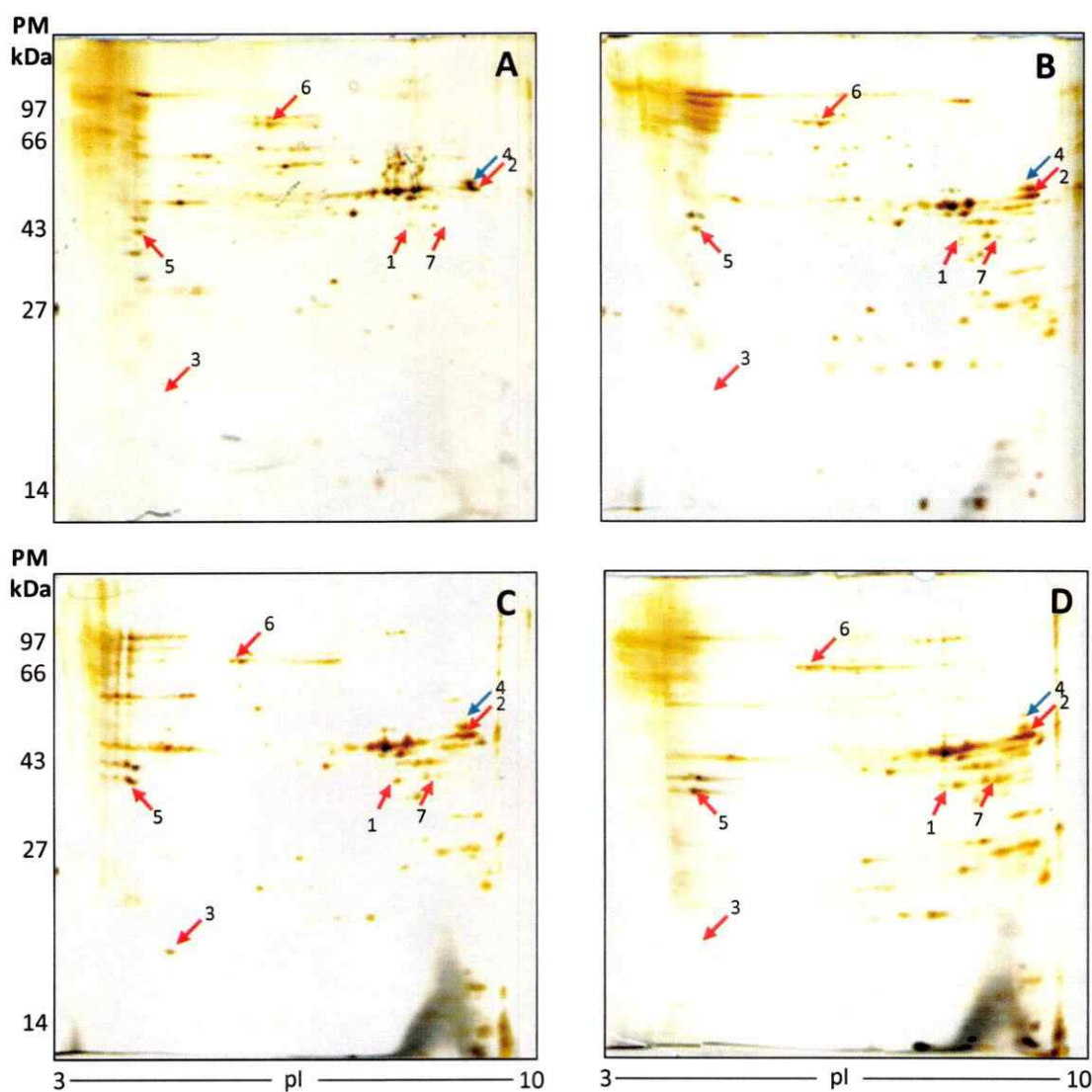


Figura 20. Separación de las proteínas de membrana de *S. metallicus* expuesto a CuSO_4 mediante 2D-PAGE. Las muestras de proteínas de membrana de *S. metallicus* se separaron mediante IEF en un gradiente de pH 3-10 no lineal y luego por su peso molecular en un gel SDS-PAGE. Los gels se tiñeron con AgNO_3 y se indica en (A) la condición control en ausencia de cobre, mientras que en (B), (C) y (D) se muestran los gels de las condiciones 5 mM, 20 mM y 50 mM de CuSO_4 , respectivamente. Las flechas rojas indican las proteínas que aumentaron sus niveles y la flecha azul indica una proteína que disminuyó sus niveles, comparados con el control. Al costado izquierdo de la figura se indican los estándares de pesos moleculares en kDa.

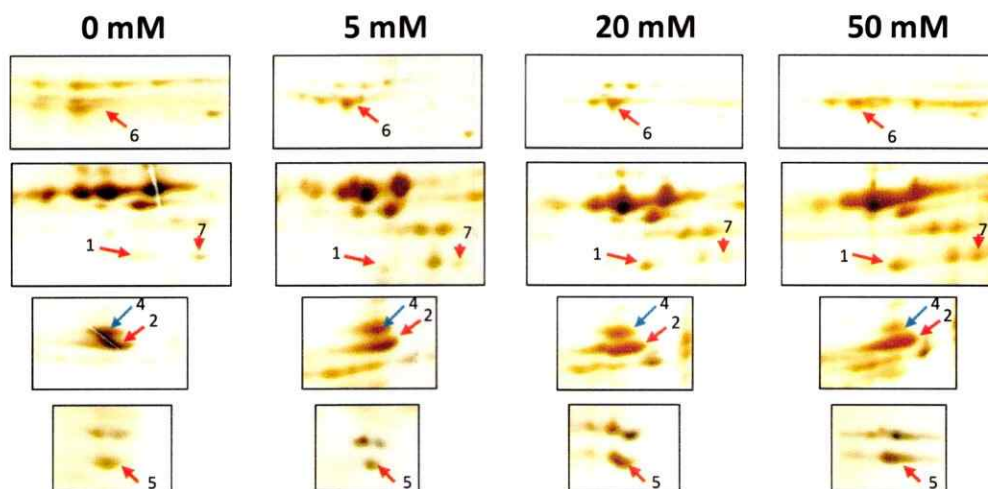


Figura 21. Detalle amplificado de las secciones de los geles bidimensionales mostrados en la figura 19. Se indica la ubicación de las manchas de proteínas cuyos niveles cambiaron en la presencia de cobre. Las flechas rojas indican las manchas aumentadas y la flecha azul mancha disminuida en la presencia de cobre. La cuantificación de estos cambios se indica en la Tabla 4.

Adicionalmente, todas estas proteínas que cambiaron sus niveles en respuesta a la presencia del cobre se sometieron a análisis mediante espectrometría de masas para conocer su identidad. Por su parte, la proteína de la mancha 3 se observó sólo en la condición de 20 mM de CuSO_4 .

3.3.2. Identificación de las proteínas de *S. metallicus* que cambiaron su expresión en respuesta a la exposición al cobre.

Las proteínas que cambiaron sus niveles en respuesta al cobre (7 manchas) (Fig. 20 y 21), se aislaron desde los geles de poliacrilamida para su identificación. Los péptidos trípticos de las proteínas se analizaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Debido a que el genoma de *S. metallicus* no se conoce, el análisis de los péptidos se realizó

comparándolos con las secuencias de todos los genomas de organismos disponibles (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas identificadas mediante espectrometría de masa que cambiaron sus niveles cuando *S. metallicus* se creció en distintas concentraciones de CuSO₄

N° mancha	ORF	Anotación	PM (kDa)	pI	Veces de cambio respecto al control		
					5 mM	20 mM	50 mM
1	SSO1646	Zinc-alcohol dehidrogenasa	37,8	7,05	1,98	3,86	7,65
2	SSO0216	Factor de elongation 1 α	48,6	8,93	-	3,16	6,66
4	SSO0216	Factor de elongation 1 α	48,6	8,93	-	(-)1,6	(-)2,61
5	SSO2632	Proteína hipotética	42,2	4,92	1,91	7,31	11,1
6	SSO0421	ATPasa AAA	86,6	6,42	18,17	27,04	5,4
7	SSO2850	Transportador ABC	39	7,82	1,71	1,89	4,06
	SSO0764	Alcohol dehidrogenasa	36,3	8,59	1,71	1,89	4,06
	SSO1399	Proteína hipotética	35,9	7,66	1,71	1,89	4,06

Se indican los ORF con mejor similitud. La mancha 7 generó 3 péptidos distintos. El símbolo (-) indica la disminución de los niveles de la proteína en dicha condición.

Todas las manchas, con excepción de la n° 3, se identificaron mediante los análisis de espectrometría de masas. Las proteínas identificadas mostraron mayor similitud con ORFs presentes en el genoma de *S. solfataricus* (Tabla 4). La mancha n° 7 generó 3 péptidos distintos, un transportador de tipo ABC, una alcohol dehidrogenasa y una proteína hipotética (Tabla 4). Las manchas 2 y 4 correspondieron a la misma proteína, el factor de elongación 1 α . De todas las proteínas identificadas en este análisis, sólo el transportador de tipo ABC (mancha n°7), correspondió a una proteína integral de membrana. Las otras

proteínas están anotadas como proteínas citoplasmáticas, y a juzgar por los análisis bioinformáticos efectuados no presentaron señales de exportación a membrana ni segmentos de transmembrana. Estos resultados sugieren que estas proteínas podrían estar en asociación con la membrana o con otras proteínas de membrana, las que producto de la preparación fueron aisladas como parte de las muestras.

Entre las proteínas que aumentaron sus niveles en presencia de cobre, la identificación de dos deshidrogenasas alcohólicas y una ATPasa de la superfamilia AAA (manchas 1, 6 y 7), sugiere que la presencia de cobre estaría generando un estrés oxidativo y la degradación de las proteínas en *S. metallicus*. Esto podría explicarse debido a que el hallazgo de las deshidrogenasas alcohólicas en *S. metallicus* es congruente con estudios recientes efectuados en *E. coli*, donde se ha demostrado el papel antioxidante de este tipo de deshidrogenasas (Echave y col., 2003). En dicho estudio, células de *E. coli* mutantes para el gen (*AdhE*), que codifica para una deshidrogenasa alcohólica, mostraron ser extremadamente sensibles frente al estrés oxidativo producido por H_2O_2 . Como se ha descrito, el cobre genera estrés oxidativo en las células, produciendo altos niveles de radicales libres. Así, el aumento en los niveles de estas deshidrogenasas alcohólicas en *S. metallicus* podría estar dando cuenta de un mecanismo antioxidante en respuesta al $CuSO_4$ presente en el medio de cultivo.

Por su parte, las ATPasas de la superfamilia AAA, representan un nuevo tipo de chaperonas moleculares y están involucradas en diversos procesos celulares (Snider y col., 2008). Se ha demostrado que las ATPasas AAA actúan en el desensamblaje ó ensamblaje de las proteínas, concertando su función con el proteosoma (Reuter y col., 2004). La degradación de las proteínas por efecto del excesivo cobre intracelular es un fenómeno

descrito por otros autores (Gaetke y Chow, 2003). Por lo tanto, el aumento de chaperonas moleculares, como de esta ATPasa AAA en *S. metallicus*, podría resultar consistente con un mecanismo compensatorio frente a la degradación de proteínas producto de la exposición al cobre.

Como se mencionó, las manchas 2 y 4 correspondieron al factor de elongación 1α , involucrado en el proceso de la traducción de las proteínas. Si bien una de las manchas aumentó ($n^{\circ}2$) y la otra disminuyó ($n^{\circ}4$) sus niveles relativos, se puede extraer del balance final que esta proteína aumentó sus niveles en la presencia de cobre (Tabla 4). El incremento de factores que participan en la traducción de las proteínas podría reflejar un aumento en este proceso celular debido a la degradación de proteínas generado por el cobre intracelular en exceso.

Por otra parte, los análisis de secuencias efectuados sobre el transportador ABC identificado (mancha $n^{\circ}7$), arrojaron poca claridad respecto a su posible función. Mediante el uso de Blastp se obtuvieron varios "hits" con puntajes significativamente altos tanto para transportadores tipo ABC involucrados en la translocación de azúcares como para el transporte de ión férrico. Así, se obtuvo un "e-value" de $2e-88$ con un transportador ABC de arabinosa de *S. solfataricus*, ó bien un "e-value" de $2e-61$ con un transportador ABC de Fe^{3+} de *Fusobacterium sp.* Debido a que no existen estudios experimentales que describan la función de esta proteína, no es posible concluir cual sería el papel de este transportador ABC frente a la exposición al cobre en *S. metallicus*.

Finalmente, mediante esta aproximación proteómica se puede concluir que la identificación de proteínas relacionadas con procesos antioxidantes y la degradación de proteínas, sugiere fuertemente que el cobre presenta un efecto oxidativo en *S. metallicus*. De

esta forma mecanismos compensatorios frente a estos fenómenos podrían ser muy relevantes frente a una eventual exposición a concentraciones excesivas de cobre.

3.4. Generación de una cepa recombinante de *S. solfataricus* incapaz de acumular poliP inorgánicos

Como se mencionó, existe evidencia que propone la participación de los poliP en la resistencia de microorganismos procariontes a metales pesados. Nuestro grupo, por su parte, ha demostrado la existencia de una relación directa entre microorganismos acumuladores de poliP como *A. ferrooxidans* y *S. metallicus*, y su elevada resistencia al cobre (Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006). Junto con esto, también hemos demostrado que cuando *S. metallicus* es expuesto a cobre, los poliP acumulados en su citoplasma comienzan a ser progresivamente degradados, lo que se acompaña por el eflujo de iones fosfato y supuestamente de cationes de cobre, desintoxicando de esta forma el ambiente intracelular. Así, hemos propuesto que esta acumulación de poliP le otorgaría a *S. metallicus* una ventaja frente al estrés ocasionado por concentraciones altas de cobre. Con el fin de explorar esta hipótesis, se podría proponer la modificación del metabolismo de los poliP en *S. metallicus*. Sin embargo, a la fecha no se dispone de herramientas para la manipulación genética en este microorganismo. Frente a estas limitaciones decidimos realizar estos estudios en *S. solfataricus*, ya que recientemente se han desarrollado metodologías para su transformación. Se propuso por lo tanto, la obtención de células recombinantes de *S. solfataricus* incapaces de acumular poliP para ensayar posteriormente su capacidad para crecer en la presencia de cobre.

3.4.1. Estrategia para la eliminación del contenido de poliP de *S. solfataricus*

Para eliminar el contenido de poliP en *S. solfataricus* se intentó sobreexpresar el gen *ppx* endógeno, el cual codifica para la exopolifosfatasa (PPX). Debido a que esta enzima es la responsable de la actividad degradadora de los poliP, se espera que su sobreexpresión elimine el contenido intracelular de poliP.

Albers y cols. (2006) han desarrollado recientemente una metodología que permite la introducción de ADN foráneo, además de vectores para la expresión de proteínas recombinantes en *S. solfataricus*. Esta metodología se basa en la utilización del vector de integración cromosomal pJ0503, cuya expresión es inducible por la adición de D-arabinosa en el medio de cultivo. Adicionalmente, este vector binario (*E. coli/S. solfataricus*), tiene un marcador de selección *pyrEF*, que permite su selección en mutantes auxótrofos para uracilo.

3.4.1.1. Subclonamiento del gen *ppx* de *S. solfataricus* (*ppxS.so*) en pMZ1

El trabajo consistió básicamente en subclonar el gen *ppxS.so* en el vector pMZ1 propagable en *E. coli*. Para ello, utilizó un fragmento *NcoI/BamHI* digerido desde el plasmidio pCR2.1-TOPO-*ppxS.so* (ver sección 2.3.1.) y se ligó a través de los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI* al vector pMZ1. De esta forma, esta construcción molecular permitió por una parte fusionar el gen *ppxS.so* en su extremo 5' con el promotor *araS* de *S. solfataricus*, inducible por D-arabinosa, y a su vez la inserción de 10 codones codificantes para histidina en marco de lectura hacia su terminación 3' (Fig. 22). Los productos de ligación se usaron para transformar la cepa de *E. coli* JM109. Luego de la selección por resistencia a Amp y de verificar la presencia del gen *ppxS.so* mediante PCR en colonias, se eligió un clon positivo y se purificó la construcción plasmidial. La integridad del gen *ppxS.so*

en este plasmidio se verificó mediante secuenciación de ambas hebras del DNA. Esta construcción molecular, promotor *aras/ppxS.so*/His10X/terminador (pMZ1-*ppxS.so_r*), se ligó posteriormente en el vector de expresión pMJ0503.

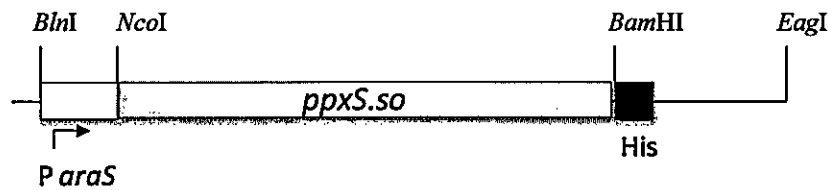


Figura 22. Subclonamiento del gen *ppxS.so* en el vector pMZ1. El gen *ppxS.so* (caja gris claro) se ligó al vector pMZ1 mediante los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*. Esta construcción molecular permitió la fusión del gen *ppxS.so* al promotor *araS* en el extremo 3' (*P araS*, caja blanca) y a 10 codones que codifican para histidina en 5' (*His*, caja gris oscura). La región río abajo de *His* y hasta el sitio de restricción *EagI* corresponde a una secuencia terminadora. El esquema no muestra toda la secuencia del vector pMZ1.

3.4.1.2. Clonamiento del gen *ppxS.so_r* en el vector de expresión pMJ0503

Una vez obtenido el plasmidio pMZ1-*ppxS.so_r*, se clonó un fragmento *BlnI/EagI* proveniente de esta construcción (Fig. 22) con el vector de expresión pJ0503 previamente digerido con estas mismas enzimas para obtener el plasmidio pJ0503-*ppxS.so_r*. Células de *E. coli* Stable4 se transformaron con esta ligación y se seleccionaron por resistencia a Amp. Se seleccionaron clones positivos mediante PCR en colonia con partidores específicos para el gen *ppxS.so* y se purificaron los plasmidios desde los clones seleccionados.

3.4.1.3. Ensayos de expresión en *S. solfataricus* M16

Se transformó la cepa de *S. solfataricus* M16, auxótrofa para uracilo, con el plásmido pJ0503-*ppxS.so_r* mediante electroporación. La selección de esta transformación se realizó en medio líquido, de modo que los cultivos que fueron capaces de crecer en ausencia de uracilo se ensayaron para comprobar la expresión de la PPX recombinante (PPXr). Para ello, se creció uno de estos cultivos hasta alcanzar una DO_{600} de 0,5 y luego se indujo la expresión de la proteína mediante la adición en el medio de 0,2% de D-arabinosa. Al cabo de 4 h de incubación el cultivo se cosechó y el pellet celular se procesó para realizar una purificación de la proteína recombinante mediante una columna de afinidad a níquel.

La figura 23A muestra el resultado de la purificación de la PPXr. Aunque el peso teórico esperado para la PPXr de *S. solfataricus* es de aproximadamente 47,5 kDa (~ 46 kDa PPX + $\sim 1,5$ kDa His x 10), se observó en las fracciones de elución (Fig. 23A, líneas 6, 7 y 8) una banda abundante cercana a los 40 kDa según el marcador de peso molecular. Para comprobar que esta banda correspondía a la proteína recombinante se realizó un western blotting anti-His (Fig. 23B), utilizando las mismas fracciones obtenidas a partir de la purificación de proteínas. El ensayo muestra reacción positiva del anticuerpo en la fracción de proteína total (línea 1), y en las fracciones de elución (líneas 6, 7 y 8), a una altura aproximada de 40 kDa, demostrándose de esta forma la expresión de la proteína PPXr en la cepa de *S. solfataricus* M16-PPX.

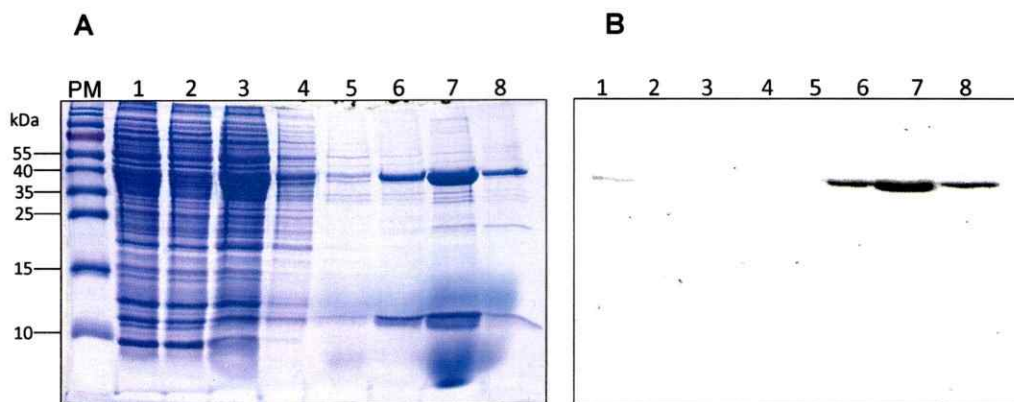


Figura 23. Purificación de la PPXr de *S. solfataricus* (A) y Western blotting con anti-his (B). Alícuotas de la purificación de proteínas se sometieron a SDS-PAGE en gels al 15 % de acrilamida (A). En ambos paneles la línea 1 corresponde al extracto total de proteínas cargado en la columna de afinidad de níquel, las líneas 2 a 5 corresponden a las fracciones de lavados y en las líneas 6 a 8 se aplicaron alícuotas de las fracciones de elución. Las proteínas (panel A), se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y sobre ella se realizó un ensayo de western blotting utilizando un anticuerpo anti-His (B). PM son los marcadores de los pesos moleculares en kDa.

3.4.1.4. Contenido de poliP en los recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX

Una vez demostrada la expresión de la proteína PPXr en la cepa recombinante de *S. solfataricus* M16-PPX, se analizó si el aumento en las cantidades de esta enzima trae consigo la eliminación del contenido celular de poliP. Para esto se creció la cepa M16-PPX suplementada con 0,2 % de D-arabinosa ó 0,1 % glucosa hasta la fase exponencial media y se purificó y cuantificó el contenido de poliP proveniente de estas células. Como control se usó la cepa de *S. solfataricus* M16 (no transformada), crecida en las mismas condiciones señaladas para M16-PPX. Como se observa en la Figura 24A las células control M16 presentaron niveles de poliP similares tanto en la presencia de glucosa como de D-arabinosa. Por el contrario, en las células recombinantes M16-PPX la presencia del inductor (D-arabinosa) fue suficiente para remover más del 98% del contenido intracelular de poliP.

Sólo en la condición de represión (0,1 % de glucosa) se alcanzan los niveles de poliP del control M16 (Fig. 24A).

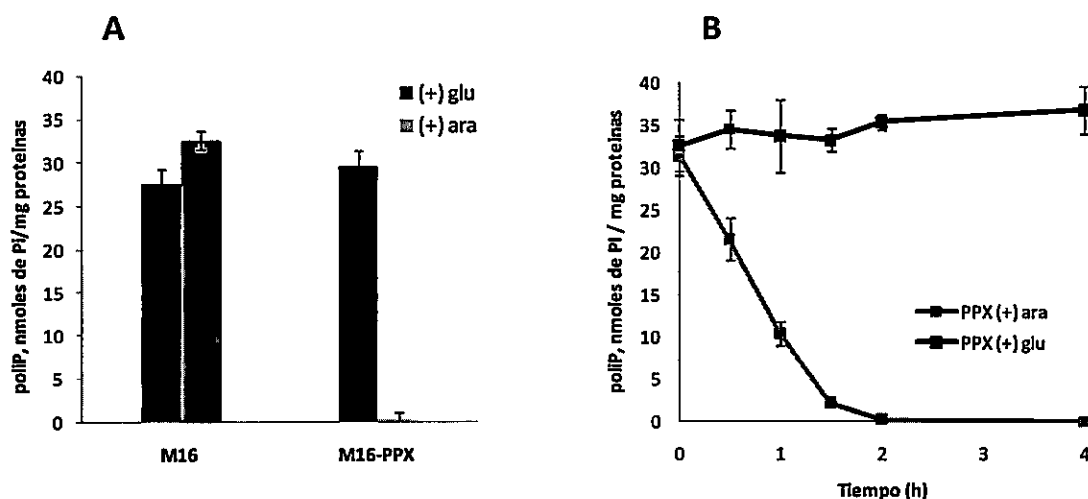


Figura 24. Niveles de poliP en las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX y cinética de degradación de los poliP. (A) Los poliP de la cepa recombinante de *S. solfataricus* M16-PPX suplementada con 0,1 % glucosa ((+) glu) y 0,2 % D-arabinosa ((+) ara) se extrajeron, purificaron y cuantificaron según se detalló en Materiales y Métodos. Como control se utilizó la cepa de *S. solfataricus* M16 (no transformada). En (B) se muestra la cinética de degradación de los poliP en M16-PPX luego de la inducción con 0,2 % D-arabinosa ((+) ara). Se desarrollaron tres réplicas independientes para cada determinación y las barras de error indican la desviación estándar.

Adicionalmente, se realizaron experimentos para determinar la cinética de la degradación de los poliP en M16-PPX, de manera de establecer una condición donde las células carecieran de este polímero. Para ello, se crecieron células de M16-PPX en ausencia del inductor y una vez que alcanzaron la fase exponencial media de su crecimiento se transfirieron a un medio suplementado con D-arabinosa al 0,2%. Progresivamente se tomaron alícuotas para la determinación de los poliP. Se observó que los niveles de poliP

disminuyeron concomitantemente en el tiempo y al cabo de 2 h de inducción se consiguió reducir casi la totalidad del contenido de poliP (Fig. 24B). De esta forma se definió un tiempo de inducción de 3 h para contar con células sin poliP (poliP-).

Estos resultados muestran claramente que la estrategia de sobreexpresar la enzima PPXr elimina prácticamente todo el contenido de poliP en las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX. Junto con esto, se definió una condición de carencia de poliP (poliP-), para estudiar el efecto que tendrá la ausencia de este polímero frente a la exposición al cobre.

3.4.2. Evaluación de la resistencia al cobre de la cepa de *S. solfataricus* M16-PPX carente de poliP (poliP-)

3.4.2.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de CuSO_4 de la cepa de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-)

Para evaluar el efecto de la carencia de poliP en *S. solfataricus* frente al crecimiento en presencia de cobre se desarrollaron ensayos para determinar la CMI. Para ello, se creció la cepa recombinante M16-PPX en la presencia de distintas concentraciones de CuSO_4 y suplementada con 0,2 % de D-arabinosa ó 0,1 % glucosa. Los cultivos se incubaron durante 94 h, hasta alcanzar la fase exponencial tardía, y se registró la DO_{600} para cada uno de ellos. Los resultados se expresaron como porcentaje de crecimiento con respecto al cultivo control en ausencia de CuSO_4 , y se definió la CMI como la concentración de CuSO_4 capaz de inhibir el 50 % del crecimiento.

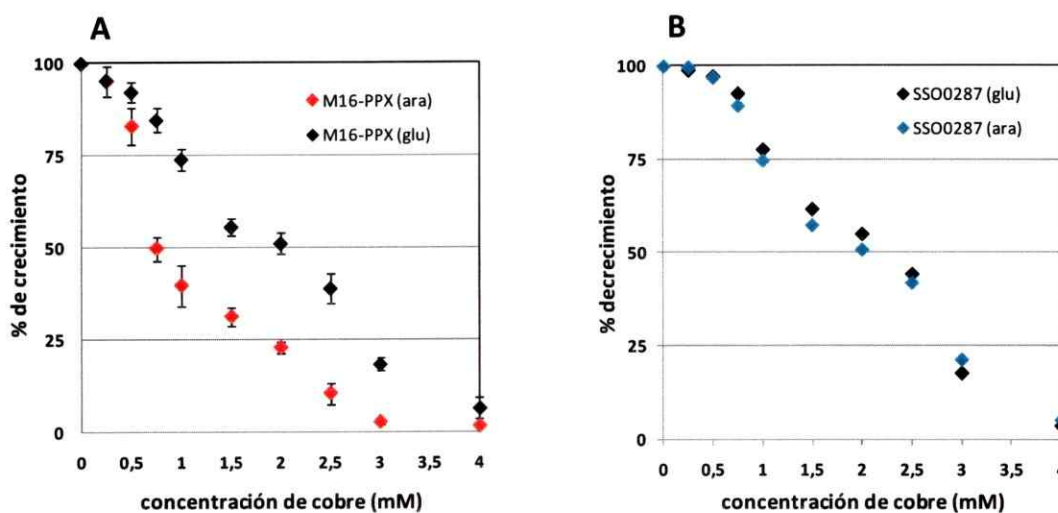


Figura 25. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de CuSO_4 en las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-). (A) Las células M16-PPX crecieron en distintas concentraciones de CuSO_4 y en la presencia D-arabinosa al 0,2 % (ara) ó glucosa al 0,1 %. El gráfico muestra el porcentaje de crecimiento respecto al control en ausencia de CuSO_4 . Los cultivos se crecieron en triplicado y las barras de error indican la desviación estándar. (B) se utilizó la cepa recombinante de *S. solfataricus* SSO0287, como control de expresión.

Como se observa en la figura 25A las células recombinantes M16-PPX suplementadas con glucosa, sustrato que no induce la expresión de la PPXr, mostraron un CMI definido de aproximadamente 2 mM de CuSO_4 . Por el contrario cuando estas células se ensayaron en la presencia del inductor, D-arabinosa (condición poliP-), se determinó un CMI definido de aproximadamente 0,75 mM CuSO_4 , es decir se observó una disminución de la CMI de aproximadamente 3 veces, probablemente producto de la deficiencia de poliP. Para validar este resultado y descartar que esta diferencia de CMI no sea debida a una eventual carga metabólica ocasionada por la sobreexpresión de la proteína PPXr, se realizaron estos mismos ensayos de CMI utilizando la cepa recombinante de *S. solfataricus* SSO0287. Esta cepa recombinante codifica para el Inhibidor RLI1 de la RNasa L (Barthelme y col., 2007), y no se le ha relacionado un papel en la resistencia a cobre. Así, la

cepa SSO0287 mostró un CMI cercano a 2 mM tanto en la presencia de glucosa como cuando fue suplementada con D-arabinosa, el inductor de la expresión (Fig. 25B). De esta manera, podemos concluir que la disminución en la CMI en la cepa M16-PPX (poliP-) no se debería al ajuste celular en la expresión de una proteína recombinante. Más aun, estos resultados nos permiten sugerir fuertemente que la deficiencia de poliP produciría un aumento en la sensibilidad al cobre en M16-PPX, apoyando la hipótesis de que los poliP tienen un papel en la resistencia al cobre.

3.4.2.2. Efecto de la adición de CuSO_4 en el crecimiento de la cepa *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-)

Luego de determinar la CMI de la cepa M16-PPX poliP-, fue de interés evaluar la capacidad de ésta para resistir una eventual exposición a cobre. Es decir, ensayar el efecto de la adición de cobre sobre el crecimiento de células M16-PPX con niveles de poliP suficientes (poliP+) versus células M16-PPX poliP-. Para ello se crecieron cultivos de M16-PPX hasta alcanzar una DO_{600} de 0,25, en ausencia de D-arabinosa, para permitir la acumulación de poliP. Las células se cosecharon y se incubaron durante 3 h en medio fresco suplementado con 0,2 % de D- arabinosa con el objeto de eliminar todo el contenido de poliP (poliP-), ó con 0,1% de glucosa, condición control donde los poliP no son degradados (poliP+). Luego de esta incubación se adicionó sobre los cultivos 1 mM de CuSO_4 y se siguió el crecimiento midiendo la DO_{600} . Se observó que luego de 48 h de incubación las células poliP+ y poliP- en ausencia de CuSO_4 crecieron y alcanzaron una biomasa similar (Fig. 26). Por el contrario, en la presencia de 1 mM de CuSO_4 las células

poliP⁻ mostraron una disminución de aproximadamente el 40 % del crecimiento comparadas con las células poliP⁺ (Fig. 26).

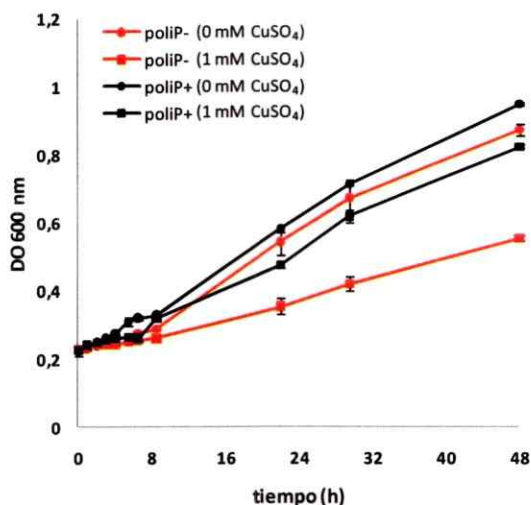


Figure 26. Efecto de la adición de CuSO_4 en el crecimiento de la cepa recombinante *S. solfataricus* M16-PPX (poliP⁻). Células de *S. solfataricus* M16-PPX se crecieron en ausencia de CuSO_4 hasta la fase exponencial media. Las células se incubaron por 3 h en medios frescos conteniendo 0,2 % de D-arabinosa (poliP⁻, líneas rojas) ó 0,1% de glucosa (poliP⁺, líneas negras). Posteriormente los cultivos se suplementaron 1 mM de CuSO_4 y se siguió el crecimiento midiendo la DO_{600} . Los valores mostrados son el promedio de 3 replicas biológicas y las barras de error muestran la desviación estándar.

Al igual que para los ensayos de la determinación de la CMI (sección 3.4.2.1), se utilizó como control de expresión la cepa recombinante SSO0287. En la presencia de 1 mM de CuSO_4 , esta cepa presentó una leve disminución de su crecimiento que no supero el 3% respecto al control sin inductor (resultados no mostrados). Los resultados obtenidos muestran que las células de *S. solfataricus* poliP⁻, carentes poliP, son más sensibles frente a

un estrés ocasionado por la exposición al cobre, lo que se ve reflejado en la disminución de su crecimiento.

Debido a la mayor resistencia que mostraron las células poliP+ para enfrentar un estrés por cobre comparado con las células poliP-, se quiso conocer la dinámica del contenido de poliP en estas células en respuesta a la adición del metal. Para eso se tomaron alícuotas en paralelo a la medición de las DO_{600} (Fig. 26) para determinar el contenido de poliP en función del tiempo. Se observó una rápida disminución en el nivel de poliP cuando las células se expusieron al $CuSO_4$. A los 30 min después de la adicción de 1 mM $CuSO_4$, el nivel de poliP disminuyó alrededor de un 80 % con respecto al valor obtenido a tiempo cero (Fig. 27), y este nivel se mantuvo a partir de las 2 h y por las siguientes 24 h (datos no mostrados). Estos resultados muestran que la presencia de cobre, genera una importante disminución en el nivel celular de poliP en *S. soltaricus* M16-PPX poliP+, probablemente debido a una mayor degradación de este polímero como se ha propuesto en otros sistemas como *S. metallicus* y *A. ferrooxidans* (Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006). Adicionalmente, la acelerada disminución del contenido de poliP observado sugiere que cualquiera sea la función del polímero en este evento su requerimiento sería temprano.

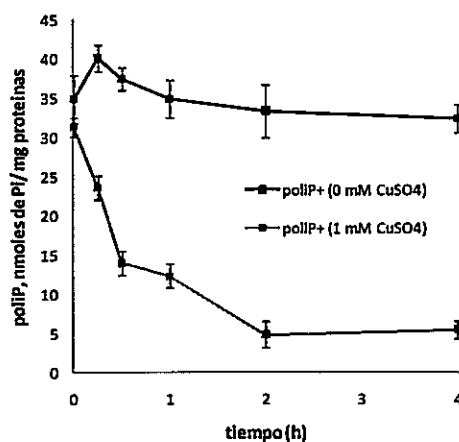


Figura 27. Contenido de poliP de células de *S. solfataricus* M16-PPX poliP+ expuestas a CuSO_4 . Células de *S. solfataricus* M16-PPX se crecieron en ausencia de CuSO_4 hasta fase exponencial media. Las células se traspasaron a medios frescos conteniendo 1% de glucosa y en la ausencia (línea negra) ó la presencia de 1 mM CuSO_4 de (línea gris). Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados y se determinó los niveles de poliP como se describe en Materiales y Métodos. Los valores son el promedio de 3 replicas biológicas y las barras de error muestran la desviación estándar.

3.4.5. Cambios en el proteoma total de las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-)

Teniendo en cuenta la mayor sensibilidad que mostraron las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX carentes de poliP frente a la exposición al cobre, se decidió iniciar el estudio de los cambios que tienen lugar en el proteoma de estas células y que pudieran dar cuenta del estado metabólico producto de la carencia de este polímero. Para estudiar estos cambios se compararon los proteomas de células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX en la condición poliP- versus células de *S. solfataricus* M16 (no transformada), condición poliP+. Estas células se crecieron exponencialmente y en la presencia de D-arabinosa. Así, se analizaron comparativamente los cambios observados mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE). Como se aprecia en las

figura 28, se observó proteínas que aumentan ó disminuyen sus niveles en las células poliP- (M16-PPX) comparadas con las células control poliP+ (M16 no transformada). Los niveles relativos de las proteínas individuales en cada gel 2D-PAGE se cuantificaron mediante un programa computacional para el procesamiento de imágenes PDQuest-2D (Biorad®) y aquellas manchas que cambiaron con un factor de 1,5 veces o más se aislaron del gel de poliacrilamida para su posterior identificación. Los péptidos tripticos obtenidos de las proteínas de las muestras se analizaron por espectrometría de masa (MALDI-TOF), y se compararon contra el genoma anotado de *S. solfataricus* P2. Se identificaron los iones de los espectros MS/MS para todas las manchas seleccionadas y por consiguiente se pudo obtener la identidad de las proteínas. Algunas manchas rindieron más de un polipéptido, y en algunos casos dos manchas correspondieron al mismo polipéptido (Tablas 5 y 6)

En resumen se identificaron 22 proteínas que aumentaron sus niveles y 11 proteínas que disminuyeron sus niveles en la cepa recombinante de *S. solfataricus* M16-PPX poliP-, con respecto a la cepa control M16 poliP+ (Fig. 28, Tablas 5 y 6). Para la mejor comprensión y análisis de los cambios observados, las proteínas que cambiaron sus niveles se agruparon según sus categorías funcionales. Para ello cada uno de los ORFs identificados se categorizó según la anotación disponible del genoma de *S. solfataricus* P2 (Tablas 5 y 6).

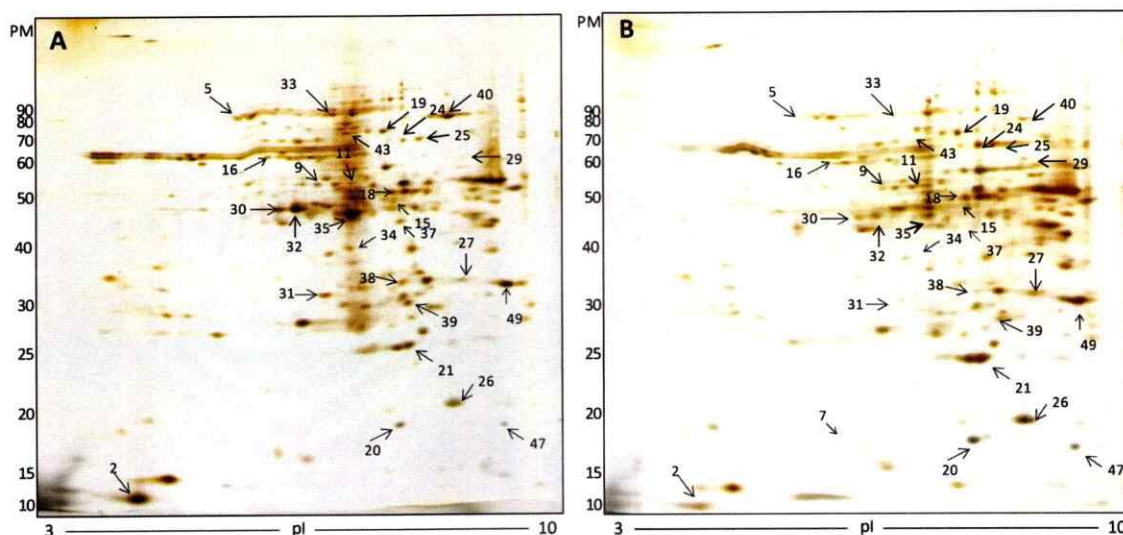


Figura 28. Cambios en el proteoma total de las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-). Las proteínas totales de *S. solfataricus* M16-PPX poliP- (B) y *S. solfataricus* M16 poliP+ (control) (A), se separaron mediante electroforesis 2D-PAGE. Las flechas y números indican las proteínas que cambiaron diferencialmente sus niveles comparados con el control. Las tiras utilizadas en el IEF tienen un rango de pH de 3 a 10 no lineal. Al costado izquierdo de la figura se indican los estándares de pesos moleculares (PM) en kDa.

Entre las proteínas que aumentaron su expresión en las células poliP- resulta interesante el hallazgo de varias enzimas relacionadas al metabolismo energético. Así, se identificó la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GDPN), enzima de la glicolisis y que en *S. solfataricus* particularmente cataliza la conversión de gliceraldehido-3-fosfato a 3-fosfoglicerato con la consecuente producción de poder reductor NADPH. Adicionalmente se encontraron varias enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Entre ellas, se identificó la subunidad α de la succinil-CoA sintasa que cataliza la hidrólisis del compuesto succinil-CoA y la síntesis acoplada de una molécula de ATP. Junto con esto, también se identificaron las subunidades B y C de la enzima succinato deshidrogenasa responsable de la conversión del succinato a fumarato, produciendo además una molécula de FADH₂. Otro

componente del ciclo de los ácidos tricarbóxicos identificado correspondió a la Enzima málica que genera piruvato y NADPH producto de la descarboxilación del malato, probablemente redireccionando el flujo metabólico hacia la entrada del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Adicionalmente, la disminución de la L-lactato deshidrogenasa (Tabla 6), que cataliza la producción de lactato a partir de piruvato, podría consistir en otro ajuste metabólico para contribuir al aumento de los niveles del piruvato y de esta forma favorecer la dinámica del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Estos resultados, sugieren que la carencia de poliP en M16-PPX produciría un déficit energético y que la sobreexpresión de enzimas de la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos sería una respuesta para mantener el suministro energético de forma alternativa al que pudiera ser aportado por el poliP.

Por otra parte, también aumentaron su expresión en las células poliP- proteínas relacionadas con procesos de detoxificación y estrés celular. Entre ellas, la superóxido dismutasa (SOD) y una peroxiredoxina, enzimas involucradas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno. Particularmente la SOD cataliza la dismutación del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que las peroxiredoxinas transforman el H_2O_2 en H_2O y O_2 . Adicionalmente, se identificaron chaperonas moleculares como la subunidad γ del Termosoma y una ATPasa de la familia AAA. La primera forma parte de la familia de las proteínas de shock térmico y es homóloga a la proteína HSP60 de organismos eucariotas, mientras que la segunda integra un nuevo tipo de chaperonas moleculares que actúan en el desensamblaje ó ensamblaje de las proteínas (Reuter y col., 2004). El hallazgo de estas proteínas podría reflejar alteraciones en la conformación de las proteínas en las células poliP-. Estos resultados en conjunto sugieren que las células carentes de poliP muestran un estado de mayor estrés y por lo tanto estas células serían más

sensibles frente a una condición nociva como la exposición al cobre u otros estímulos dañinos.

Finalmente, las proteínas que disminuyen su expresión en las células carentes de poliP se señalan en la Tabla 6. Entre ellas, se identificaron proteínas relacionadas al metabolismo fermentativo (Zn-deshidrogenasa alcohólica y L-lactato deshidrogenasa) y el metabolismo de los lípidos. Las posibles relaciones de la disminución de estas proteínas y la condición de carencia de poliP- en las células recombinantes se discuten en la sección 4. Completan la lista de las proteínas que disminuyen en las células poliP-, un transportador ABC, cuyo sustrato no se ha descrito, una ferredoxina, una carboxipeptidasa categorizada como de función general y 2 proteínas hipotéticas de función desconocida.

Tabla 5. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX carentes de poliP

Categoría funcional	Nº de mancha	ORF	Anotación	PM (kDa)	pI	Veces de cambio (poliP-/poliP+)
Producción y conversión de energía	29	SSO3194	Gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa	51,6	8,35	4,05
	49	SSO2482	Succinil-CoA sintetasa, subunidad α	27,8	8,76	2,42
	48	SSO2357	Succinato deshidrogenasa, subunidad B	37,5	8,84	2,5
	27	SSO2358	Succinato deshidrogenasa, subunidad C	32,6	8,42	18,02
	8	SSO2869	Enzima mállica	47,9	6,01	5,9
	18	SSO2629	Oxidoreductasa (flavoproteína)	43,1	6,64	2,12
Biosíntesis de aminoácidos	19	SSO2815	2-oxoacid-ferredoxina oxidoreductasa, cadena α	70,2	6,37	2,41
	49	SSO2434	Monóxido de carbono deshidrogenasa	30,7	9,21	2,42
	18	SSO0417	Fosfoglicerato mutasa	45,2	6,85	2,12
	9, 11	SSO0530	Serina hidroximetiltransferasa	48,5	6,22	1,96
Metabolismo de lípidos	24, 25	SSO3107	Dihidroxi-acido deshidratasa	59,5	6,86	7,6
	15	SSO0199	S-adenosilmetionina sintetasa	45,3	5,86	7,15
	16	SSO2463	Propionil-CoA carboxilasa, subunidad β	57,4	6,01	1,87
Traducción	15	SSO2625	Acetil-CoA acetiltransferasa	41,9	6,73	7,15
	50	SSO0970	Factor de iniciación IF-5A	14,5	6,15	

Modificaciones						
Postraduccionales, chaperonas moleculares	16	SSO3000	Termosoma, subunidad γ	59,2	5,52	1,87
	5	SSO0421	ATPasa familia AAA	86,6	6,42	2,97
Replicación del DNA, recombinación y reparación	20, 47	SSO2364	Proteína de unión a DNA de simple hebra	16,1	9	2,74
Destoxificación	21	SSO0316	Superóxido dismutasa	24,2	6,71	1,9
	26	SSO2613	Peroxiredoxina	17,6	7,66	2,29
Función desconocida	27	SSO2555	Proteína hipotética	29,5	8,38	18,02

Las manchas nº 15, 16, 18 y 49 generaron más de una proteína en el análisis de MS

Tabla 6. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX carentes de poliP

Categoría funcional	Nº de mancha	ORF	Anotación	PM (kDa)	PI	Veces de cambio (poliP+/poliP-)
Producción y conversión de energía	2	SSO2574	Ferredoxina	11,4	5,06	2,57
	37	SSO1646	Zn-deshidrogenasa alcohólica	37,5	6,76	153,25
	38	SSO2585	L-lactato deshidrogenasa	36,4	7,82	2,12
Biosíntesis de aminoácidos	35	SSO1907	Glutamato deshidrogenasa	46	6,51	2730,62
Metabolismo de lípidos	30	SSO2996	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	43,3	5,82	2,49
	40	SSO2514	Enoil CoA hidratasa	73,2	8,05	3,9
	33		Factor de elongación 2	81,7	6,11	289,48
Transporte	39	SSO0925	Transportador ABC	17,7	7,96	296,56
Funciones generales	30, 32	SSO1355	Carboxipeptidasa termoestable	43,3	5,93	2,3
	34	SSO1442	Proteína hipotética	35,2	6,19	144,48
Función desconocida	31	SSO1960	Proteína hipotética	31,7	6,32	322,2

Las manchas nº 30 generó más de una proteína en el análisis de MS

4. DISCUSIÓN

4.1. Ocurrencia de los genes *cop* de resistencia al cobre en el genoma de *S. metallicus*

Este trabajo de Tesis doctoral tuvo como objetivo conocer los mecanismos moleculares involucrados en la resistencia al cobre en la arquea termoacidófila *S. metallicus*. El estudio se inició con la búsqueda en el genoma del microorganismo de un grupo de genes de resistencia al cobre (*cop*), que se encuentran altamente conservados en varios genomas de arqueas (Ettema y col., 2006). Este grupo de genes *cop* codifican para una metalochaperona (CopM), un transportador ATPasa del tipo CPx propuesto para el transporte de Cu (CopA) y un regulador transcripcional específico de *Archaea* (CopT). Debido a que a la fecha no se dispone de la secuencia genómica de *S. metallicus*, mediante la utilización conjunta de las metodologías de CODEHOP-PCR y “genome walking”, fuimos capaces de establecer la presencia de 2 loci *cop* homólogos no idénticos en el genoma de *S. metallicus* (*cop1* y *cop2*). Sin embargo, debido a que la cepa de *S. metallicus* utilizada no tiene un origen clonal, fue preciso evaluar que esta duplicación de los loci *cop* no proviniera de un co-cultivo de dos o más cepas de la misma especie. Para ello, utilizamos RFLP para determinar la homogeneidad del gen del rRNA *16s* y PCR en tiempo real con el fin de establecer la proporción de los genes *cop* en la muestra de DNA genómico utilizada. De estos análisis se concluyó que la posibilidad de un co-cultivo es poco probable (ver Anexo n°5).

Así, describimos que cada uno de estos loci codificaría para los ORFs descritos en otras arqueas (CopT, CopM y CopA), y que las respectivas secuencias aminoacídicas presentaron los dominios característicos, referidos como fundamentales para sus respectivas actividades biológicas propuestas. A nuestro entender y a juzgar por lo descrito en la

literatura (Ettema y col., 2003; Ettema y col., 2006; Auernik y col., 2008), el hallazgo de esta duplicación del grupo de genes *cop* en el genoma de *S. metallicus* constituiría una característica inédita para un representante del dominio *Archaea* y podría contribuir en la elevada resistencia al cobre que muestra esta arquea.

En este contexto, se ha reportado extensamente que el aumento del número de copias de un segmento de DNA genómico puede aumentar la expresión génica y por ende la cantidad de la proteína codificada (Anderson y Roth, 1977; Gevers y col., 2004; Reams y Neidle, 2004). Así, se ha descrito que múltiples copias de un gen permiten a los procariontes proliferar bajo condiciones de crecimiento limitantes, otorgándoles ventajas tanto para resistir concentraciones elevadas de drogas y metales como para crecer en fuentes de carbono atípicas (Romero y Palacios, 1997; Hastings y col., 2000; Gevers y col., 2004).

Por todo esto, nos permitimos sugerir que la duplicación del grupo de genes *cop* en *S. metallicus* podría conferirle una ventaja adicional frente a una eventual exposición a cobre, y podría explicar en parte la elevada y mayor resistencia al metal que muestra este microorganismo (CMI = 200 mM) versus otras arqueas como *S. solfataricus* (CMI = 5 mM) o *S. acidocaldarius* (CMI = 1 mM). Ahora bien, esta proposición debe considerar los estudios realizados en la arquea *F. acidarmanus* altamente resistente al cobre (CMI = 312 mM), donde a la fecha se ha descrito la presencia de sólo una copia del grupo de genes *cop*. No obstante, es preciso mencionar que estos estudios se realizaron disponiendo de una versión incompleta de su secuencia genómica. A pesar de esto, los autores señalan que en esta secuencia genómica parcial existen otros sistemas para el transporte de cationes, y que en el futuro la caracterización de estos sistemas de transporte, junto con la finalización de la

secuenciación del genoma permitirán completar el cuadro sobre los posibles mecanismos moleculares de resistencia al cobre en esta arquea (Baker-Austin y col., 2005).

Otro estudio, realizado en nuestro grupo, sobre los mecanismos de resistencia al cobre en la bacteria *A. ferrooxidans* ATCC 23270, también podría apoyar el papel de la multiplicidad génica en la resistencia al cobre. En ese trabajo se describe la presencia de al menos 10 ORFs que muestran considerable identidad de secuencia con genes vinculados a mecanismos de resistencia al cobre de las bacterias Gram negativas *E. coli* y *P. syringae* pv *tomato*. A diferencia de estas bacterias neutrófilas, *A. ferrooxidans* presenta más de una copia para varios de estos ORFs. Entre ellos, es posible distinguir 3 transportadores ATPasas posiblemente involucradas en la salida del cobre (*copA1_{AF}*, *copA2_{AF}* y *copB_{AD}*) y 2 metalochaperonas periplasmáticas para el secuestro del metal (*cusF_{AF}* y *copC_{AD}*). Además de demostrar la funcionalidad de la mayoría de estos ORFs, en este trabajo se sugiere fuertemente que la alta resistencia al cobre que muestra *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se debería a su amplio repertorio de determinantes de resistencia al cobre y a la duplicación de algunas de ellos (Navarro y col., 2009). Más aún, análisis realizados sobre la secuencia genómica de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, muestran que esta cepa además de contener todos los ORFs relacionados con la resistencia al cobre descritos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270, presenta varios ORFs adicionales también posiblemente involucradas con sistemas de resistencia a este metal. Entre ellos, se describen un transportador ATPasa de cobre y todos los componentes para un sistema tipo Cus adicional, que facilitaría la expulsión del metal. Adicionalmente, se reportó que la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 es capaz de crecer en la presencia de mayores concentraciones de CuSO₄ cuando se comparó con la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Orellana y Jerez, resultados no

publicados). Esta mayor resistencia al cobre mostrada por la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 podría explicarse por la presencia de genes adicionales de resistencia a metales en su genoma. Así, la capacidad para resistir cobre tanto de dos cepas del mismo microorganismo como de diferentes microorganismos podría estar basada en parte a diferencias en el mayor número de genes involucrados en los mecanismos de resistencia al metal.

Respecto a la ocurrencia de esta versión duplicada del grupo de genes *cop* en *S. metallicus*, resulta complejo sugerir el mecanismo evolutivo que la ocasionó. Como se ha reportado, la existencia de genes homólogos dentro de un genoma puede explicarse principalmente por eventos de duplicación génica, los que dependen directamente de mecanismos de recombinación homóloga, o por la adquisición foránea de las secuencias de DNA mediante el fenómeno de transferencia horizontal (Gogarten y Townsend, 2005; Tsuru y Kobayashi, 2008).

Debido a que la detección de estos eventos evolutivos involucra complejos análisis de secuencia y filogenéticos, que deben considerar la secuencia completa del genoma (Gevers y col., 2004; Tsirigos y Rigoutsos, 2005), con el fin de observar el gen en estudio desde una perspectiva genómica, nos resulta imposible realizar estos análisis sobre los loci *cop*, ya que la secuencia genómica de *S. metallicus* aun no se conoce. A pesar de esto, pueden realizarse algunas aproximaciones. Entre ellas, la posibilidad de un evento de duplicación parece menos probable, debido a que algunos autores proponen que un evento de duplicación génica albergará una alta identidad de secuencia entre los genes homólogos, muchas veces sugerida como por sobre el 90 % a nivel aminoacídico (Tsuru y Kobayashi, 2008). Si bien las secuencias codificadas por cada loci *cop* muestran entre ellas una alta identidad de secuencias, sólo las proteínas CopM1 y CopM2 alcanzan un 66 % de identidad,

mientras de las otras secuencias muestran identidades cercanas al 50 %. Por otra parte, se ha descrito que un evento de transferencia horizontal de genes muestra las siguientes características fundamentales, aunque no categóricas: un contenido G+C diferente al del genoma receptor, diferente uso de codones y la presencia de elementos móviles contiguos a la región exógena (Hacker y Carniel, 2001; Dobrindt y col., 2004). Si bien no es posible observar la presencia de elementos móviles a lo largo de las 2 regiones *cop* secuenciadas, no podemos descartar que en zonas flanqueantes más distantes pudieran encontrarse. Por su parte, el análisis del contenido de G+C en ambas regiones resultó en 40,6 % y 36,3 % para los loci *cop1* y *cop2* respectivamente. Esta diferencia en el porcentaje de G+C podría ser significativo tomando en cuenta que la longitud secuenciada en ambas regiones es similar. Cuando comparamos estos resultados con otra región genómica de *S. metallicus* secuenciada (el locus *fox*), que codifica para genes involucrados en la oxidación del ión ferroso (Bathe y Norris, 2007), determinamos que su contenido de G+C era de 40,5 %, prácticamente el mismo mostrado por locus *cop1*. Aunque como se mencionó, la identificación del mecanismo evolutivo responsable de la generación de genes homólogos involucra un mayor estudio, estos análisis preliminares sugieren que el locus *cop1*, que muestra homogeneidad genómica, podría formar parte del “core” del genoma, mientras que el locus *cop2* con un menor contenido de G+C podría haber sido adquirido.

4.2. Los genes *cop* de *S. metallicus* se expresan en respuesta al cobre

Mediante experimentos de Northern blot y RT-PCR se determinó que los pares génicos *copMA1* y *copMA2* se transcriben como unidades policistrónicas y responden específicamente a la presencia de CuSO_4 y CdSO_4 . Este resultado se correspondió con lo

reportado para *S. solfataricus* P2 y *F. acidarmanus*, donde también se reportó la cotranscripción de estos genes en respuesta al cobre. La expresión de *copMA* en *S. solfataricus* también se ha demostrado en la presencia de cadmio (Baker-Austin y col., 2005; Ettema y col., 2006).

Para profundizar estos análisis se utilizó RT-PCR cuantitativo para determinar los perfiles de expresión de los transportadores putativos (*copA1* y *copA2*) en la presencia de distintas concentraciones de cobre. Así, se reportó que ambos genes incrementaron su expresión concomitantemente con el aumento en la concentración de cobre, y particularmente el gen *copA1* mostró mayores niveles de transcritos comparado con *copA2*. Este aumento de la expresión de los genes codificantes para al menos 2 transportadores ATPasas, probablemente involucradas en el transporte del metal (*copA1* y *copA2*), es consistente con lo que se ha descrito en la literatura, donde se indica que uno de los sistemas de resistencia a metales pesados más ampliamente utilizados por los microorganismos corresponde al exporte del metal mediante este tipo de transportadores (Solioz y col., 2003, Baker-Austin y col., 2005; Dopson y col., 2005; Ettema y col., 2006). Sin embargo, a diferencia del resto de los modelos de estudio descritos u otros sistemas, *S. metallicus* presenta más de una ATPasa de cobre.

Con respecto a la abundancia relativa de los transcritos *copA1* y *copA2*, determinamos la cantidad relativa de $4,3 \times 10^3$ copias/ng RNA total y $1,5 \times 10^3$ copias/ng RNA total para los transcritos *copA1* y *copA2* respectivamente en la ausencia de cobre. En la presencia de 50 mM de CuSO_4 el transcrito *copA1* mostró un aumento en aproximadamente 2 órdenes de magnitud, alcanzando $1,4 \times 10^5$ copias/ng RNA total, mientras que *copA2* presentó $2,7 \times 10^4$ copias/ng RNA total en estas mismas condiciones. Para situar estos

valores en un contexto celular nos permitimos realizar el siguiente análisis. Considerando que los mRNAs representa sólo el 2 - 5 % del RNA total, se obtiene que en la condición de ausencia de cobre, la abundancia de los transcritos *copA1* y *copA2* representan un 0,024 % y 0,01 % de la población de mRNAs, respectivamente. Por su parte, cuando las células se expusieron a 50 mM de CuSO₄ esta abundancia alcanzó un 0,95 % para *copA1* y un 0,18 % para *copA2*. Es decir, alrededor del 1 % de los mRNAs presentes podrían codificar para los transportadores putativos y supuestamente involucrados en el exporte de cobre. A nuestro entender este porcentaje de abundancia relativa podría ser significativamente alto, si lo comparamos con la abundancia relativa del factor de elongación EF-Tu, que representa alrededor de un 10 % de la proteína total en bacteria (Ishihama y col., 2008; Karlin y col., 2001). Sin embargo, esta aproximación comparativa considera una relación directa entre la cantidad de mRNA y proteína.

Por otra parte, aunque algunos autores describen que la expresión de los transportadores ATPasas de cobre en respuesta a la presencia del metal sugiere que su papel biológico sería la expulsión del metal (Solioz y col., 2003; Baker-Austin y col., 2005; Ettema y col., 2006), no podemos afirmar categóricamente que los transportadores putativos presentes en *S. metallicus* estén cumpliendo dicha función. Para ello se hace necesario describir experimentalmente si estas proteínas funcionan como exportadoras o importadores de cobre. En este contexto, los análisis para determinar la funcionalidad de estas ATPasas se ven considerablemente limitados en *S. metallicus*, debido a que no se dispone de herramientas para la generación de “knockouts” en este microorganismo. Sin embargo, alternativamente intentamos la expresión de estos ORFs en *E. coli* como huésped heterólogo. Desafortunadamente estos experimentos no han tenido éxito hasta ahora, y

parece ser que la expresión de estos ORFs en el sistema multicopia pBAD-TOPO tiene un efecto tóxico sobre *E. coli*. Adicionalmente, también se intentó la expresión heteróloga del gen *copA1* en *S. solfataricus*. Si bien fuimos capaces de generar el vector de expresión recombinante, que contenía el gen *copA1*, no tuvimos éxito en la transformación de las células de *S. solfataricus*. Por su parte, no se intentó la clonación del gen *copA2*, pues en ese entonces no se disponía de su secuencia completa.

Por otra parte, cuando analizamos la topología de estos potenciales transportadores de cobre de tipo ATPasa de *S. metallicus* obtuvimos algunos datos que podrían ser comentados. Utilizando la herramienta bioinformática THMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) encontramos que CopA1 presenta 5 hélices de transmembrana y la probabilidad de que su región N-terminal esté ubicada en el espacio citoplasmático es mayor que 0,98; en un máximo de 1,0. Por su parte, CopA2 con 6 hélices de transmembrana, también tendría la región N-terminal hacia el lado citoplasmático de la membrana celular, aunque con una probabilidad calculada de 0,69. Con base en el hecho que el dominio de unión a metal (HMA) de estas proteínas se encuentra en la región N-terminal, podría especularse que ambas ATPasas (CopA1 y CopA2) permitirían la translocación del metal desde dentro de la célula hacia el espacio extracelular, funcionando como exportadoras de cobre. Como se ha demostrado experimentalmente en *E. hirae*, el transportador ATPasa de cobre CopB, cuyo papel es permitir la salida del metal, presenta su dominio HMA hacia la cara citoplasmática, mientras que el dominio HMA de el transportador ATPasa CopA, involucrada en el importe de cobre, se ubica hacia el espacio extracelular (Solioz y Stoyanov, 2003). CopB de la arquea *A. fulgidus* es otro ejemplo donde

la ubicación intracelular del dominio de unión a Cu^{2+} se condice con su papel en el exporte del metal (Mana-Capelli y col., 2003).

La expresión conjunta de los pares génicos, *copM* y *copA*, formando parte de una misma unidad transcripcional, permite sugerir una función coordinada y dependiente para las respectivas proteínas codificadas. En *E. hirae*, la metalochaperona CopZ (CopM en *S. metallicus*) cumple un papel pivote en el mecanismo de la homeostasis del cobre. Así, se demostró que esta proteína interacciona directamente con el transportador CopB, entregándole el Cu^+ para su consecuente expulsión. Adicionalmente, también se ha reportado la interacción de CopZ y el represor transcripcional CopY (Solioz y Stoyanov, 2003). En este mismo contexto, podría esperarse que las proteínas CopM1 y CopM2 de *S. metallicus* tuvieran un papel similar al que se ha descrito en *E. hirae*.

La expresión de los genes *copT1* y *copT2*, que codifican para potenciales reguladores de respuesta a cobre, también se estudió mediante RT-PCR cuantitativo. Mientras los niveles del transcrito *copT1* aumentaron claramente en la presencia de cobre, *copT2* mostró una expresión más bien constitutiva. Aunque no se conoce con detalle el mecanismo de acción del regulador CopT, en *S. solfataricus* se le ha propuesto una función como represor transcripcional. Así, se ha demostrado que su expresión es constitutiva y su capacidad para unirse a la región promotora *copMA* se pierde en la presencia de Cu^{2+} , lo que permitiría la transcripción de este policistrón (Ettema y col., 2006). Tomando en conjunto nuestros resultados que muestran un aumento de la expresión del policistrón *copMA2* de *S. metallicus* en presencia de cobre, y suponiendo que esta expresión está controlada por CopT2, el que muestra una expresión constitutiva, es sugerente pensar en un papel de represor de la transcripción para este regulador putativo. Adicionalmente, la elevada identidad de

secuencia que muestra CopT2 con su ortólogo en *S. solfataricus* (90 %), podría estar dando cuenta de un alto parecido estructural y por ende del mismo comportamiento funcional. Si bien, determinamos la presencia de un posible promotor en la región intergénica *copTM2*, la búsqueda de otros elementos regulatorios no rindió resultados positivos. Aunque se han descrito las secuencias de unión para CopT en la región promotora *copMA* de *S. solfataricus*, no ha sido posible establecer un motivo consenso para la unión de este regulador transcripcional. Además, análisis sobre todas las secuencias de los grupos de genes *cop* presentes en otras arqueas, tampoco dio lugar a la identificación de motivos conservados para la unión del regulador transcripcional CopT (Ettema y col., 2006).

Por otra parte, el aumento de los niveles de los transcritos *copT1* y *copMA1* concomitante con el incremento de la concentración de cobre, permiten sugerir que el regulador transcripcional putativo CopT1 podría presentar un efecto activador tanto sobre la expresión de *copMA1* (Fig. 10, tabla 3). No obstante, se necesitarían al menos experimentos de EMSA y “footprinting” para determinar si CopT1 presenta un papel activador o represor de la transcripción. Adicionalmente, sería de interés conocer si existe una posible interacción cruzada entre estos reguladores putativos y las respectivas regiones promotoras en cada uno de los loci *cop* de *S. metallicus*.

4.3. Búsqueda de otros determinantes de resistencia al cobre en *S. metallicus*

Dado el alto nivel de resistencia al cobre que muestra *S. metallicus*, es posible que presente múltiples mecanismos para desarrollarse en la presencia del metal. Para evaluar esta posibilidad se realizó un análisis de la expresión diferencial de las proteínas de membrana de

S. metallicus en respuesta a cobre. La selección de este sub-proteoma de membrana se basó en que algunos autores han propuesto que muchos de los determinantes de resistencia al cobre se ubican en la superficie celular (Das y col., 1998; Nies, 2003). Además estos estudios complementaron los análisis realizados recientemente en nuestro laboratorio, los que describieron la expresión global del proteoma total de *S. metallicus* expuesto a CuSO_4 .

Si bien el análisis permitió la identificación de 7 proteínas que aumentaron sus niveles en la presencia de cobre, sólo una de ellas correspondió a una proteína integral de membrana, un transportador de tipo ABC. Más aun, esta aproximación experimental no permitió la detección de las proteínas transportadoras CopA1 y CopA2, las potenciales bombas de eflujo de cobre de *S. metallicus*, y que cuyos niveles de transcritos aumentaron fuertemente en la presencia del metal. Esto pudo deberse a que los niveles de estas proteínas transportadoras no fueron suficientes para su detección mediante esta aproximación. También podría considerarse que las condiciones experimentales utilizadas en la preparación de las muestras no fueron suficientes para permitir la solubilización de esta proteínas integrales de membrana. En este contexto, se ha reportado extensamente la dificultad de la resolución de las proteínas de membrana mediante electroforesis bidimensional. Esto se debe principalmente a la baja solubilidad de las proteínas de membrana producto de su naturaleza hidrofóbica (Santoni y col., 2000; Braun y col., 2007). Por todo esto, para estudios futuros se sugiere aumentar la concentración del detergente utilizado o probar otros detergentes. A pesar de esto, los resultados obtenidos sugieren que las proteínas identificadas que no formarían parte de la membrana podrían estar en asociación con la membrana o con otras proteínas de membrana, que producto de la preparación formaron parte de las muestras.

Dentro de las proteínas identificadas pudimos relacionar claramente aquellas que presentan una vinculación con mecanismos de respuesta frente al estrés oxidativo y a la degradación de las proteínas en *S. metallicus*, particularmente una ATPasa de la superfamilia AAA y 2 deshidrogenasas alcohólicas. Recientemente se ha demostrado el papel antioxidante de las deshidrogenasas alcohólicas en *E. coli*. Así, la eliminación del gen *AdbE* en *E. coli*, que codifica para una deshidrogenasa alcohólica, produce un fenotipo extremadamente sensible al estrés oxidativo producido por H_2O_2 , lo que sugiere por lo tanto de esta forma su papel en este tipo de estrés. Sin embargo, aun no se ha dilucidado el mecanismo de acción de esta deshidrogenasa alcohólica frente al estrés oxidativo (Echave y col., 2003). Por su parte, las ATPasas de la superfamilia AAA, corresponden a un nuevo tipo de chaperonas moleculares (Snider y col., 2008) involucradas en el desensamblaje o ensamblaje de las proteínas, actuando concertadamente con el proteosoma (Reuter y col., 2004).

La degradación de las proteínas por efecto del excesivo cobre intracelular se ha documentado ampliamente (Gaetke y Chow, 2003). Recientemente, mediante análisis proteómicos realizados en células de *F. acidarmanus* expuesto a arsénico o a cobre, se reportó la expresión de proteínas asociadas con el plegamiento de proteínas, incluyendo a la chaperonina de la familia HSP60 y la proteína de estrés térmico DnaK (HSP70) (Baker-Austin y col., 2005; Baker-Austin y col., 2007), sugiriendo fuertemente que la presencia de cobre estaría generando estrés oxidativo y afectando consecuentemente la estructura de las proteínas. Adicionalmente, en los estudios realizados previamente por nuestro grupo, donde se analizó la expresión diferencial del proteoma total de *S. metallicus* expuesto a cobre, también se identificaron proteínas involucradas en la respuesta al estrés. Entre ellas, se

detectó al igual que en *F. acidarmanus* una subunidad de la chaperonina HSP60 y una subunidad del proteosoma (Remonsellez, 2007). Como se ha descrito, el proteosoma es un complejo proteico presente en todos los organismos vivos y tiene la capacidad de degradar proteínas hasta aminoácidos, los cuales pueden ser utilizados en la síntesis de nuevas proteínas (Maupin-Furrow y col., 2006; Sun y col., 2007).

Así, el aumento tanto de estas deshidrogenasas alcohólicas como de la ATPasa AAA en *S. metallicus* podría estar dando cuenta de una respuesta defensiva frente al estrés oxidativo y a la degradación de proteínas producto de la exposición al cobre. Adicionalmente, el incremento de los niveles del factor de elongación 1α podría reflejar un aumento en la traducción de proteínas, como una compensación frente a la degradación de las proteínas causada por el cobre intracelular. En este contexto, se ha reportado el incremento de factores que participan en la traducción de las proteínas en otros sistemas como es el caso de *P. fluorescens*, donde se observó la sobreexpresión del factor de elongación EF-Tu en respuesta a la exposición a cobalto y cobre (Sharma y col., 2006).

Tomando en conjunto los análisis proteómicos previos y los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que la identificación de proteínas relacionadas con procesos antioxidantes y la degradación de proteínas, sugiere fuertemente que el cobre presenta un efecto oxidativo en *S. metallicus*. Así, los mecanismos compensatorios frente a estos fenómenos podrían ser muy relevantes frente a una eventual exposición a concentraciones excesivas de cobre.

4.4. Los polifosfatos (poliP) y su papel en la resistencia al cobre en especies del genero *Sulfolobus*

La presencia de copias adicionales de los genes *cop*, junto con un sistema antioxidante puede darle a *S. metallicus* capacidades adicionales para resistir mejor el cobre. Sin embargo, es posible que puedan existir varios sistemas que funcionen simultáneamente para proporcionar resistencia al metal. Uno de los posibles mecanismos adicionales propuestos para la resistencia al cobre son los poliP. El poliP es un polímero lineal de cientos de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido. Se le han atribuidos variadas funciones fisiológicas a los poliP, entre ellas ser una reserva de fosfato, como sustituto de ATP, fuente de ATP, y también en la resistencia a metales pesados (Kornberg y col., 1999).

Nuestro grupo determinó los niveles de poliP en 3 especies del género *Sulfolobus*: *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* y *S. metallicus*. Si bien, los 3 microorganismos sintetizan poliP durante su crecimiento, se encontró que *S. metallicus* acumula grandes cantidades de este polímero en su citoplasma. Adicionalmente, se demostró que cuando *S. metallicus* es expuesto a altas concentraciones de cobre, estos poliP comienzan a ser progresivamente degradados, lo que es acompañado por el eflujo de iones fosfato, y supuestamente de cationes de cobre (Remonsellez y col., 2006). Se reportó, además, que *S. solfataricus*, que acumula 10 veces menos poliP que *S. metallicus*, es tan sólo capaz de crecer en concentraciones de cobre 40 veces inferiores a las reportadas para *S. metallicus* (Remonsellez y col., 2006). Estas observaciones han resultado muy interesantes, por cuanto se determinó que cuando *E. coli* (una bacteria que acumula muy pocos PoliP en su citoplasma), se modifica genéticamente para que metabolice una mayor cantidad de PoliP (que sintetice y

degrade mayor cantidad de este polímero), es capaz de tolerar concentraciones mayores de metales pesados, lo que era acompañado por el eflujo de iones fosfato desde la célula (Keasling y Hupf, 1996). Estos resultados obtenidos en *E. coli* indican que existe una relación entre el metabolismo de PoliP y la resistencia a metales pesados, lo que sugiere que especies capaces de acumular grandes cantidades de este polímero, como *S. metallicus*, presentan una ventaja sobre las otras especies para enfrentar un estrés por cobre, debido a su capacidad de acumular poliP.

Para evaluar esta hipótesis, nos propusimos obtener células recombinantes de *S. solfataricus* incapaces de acumular poliP. Como se mencionó, estos estudios no pudieron realizarse en *S. metallicus* ya que no se dispone de herramientas para la manipulación genética en este microorganismo. Así, demostramos que la sobreexpresión de la PPX endógena en *S. solfataricus* es capaz de remover más del 98 % de los poliP celulares. Este resultado estuvo en congruencia con lo obtenido por Chavez y col. (2009), donde la sobreexpresión de una PPX de levadura permitió reducir prácticamente todo el contenido celular de poliP en *Pseudomonas sp.* B4.

Mediante la utilización de esta cepa recombinante de *S. solfataricus* pudimos demostrar que la deficiencia de poliP genera una mayor sensibilidad al CuSO_4 , lo que se manifestó por la disminución de la CMI de 2 mM a 0,75 mM. A nuestro entender este resultado demuestra directamente la participación de los poliP en la resistencia al cobre en *S. solfataricus*, lo que podría ser extendido a otras especies del género, entre ellas *S. metallicus*. La disminución de la habilidad para resistir cobre podría estar en relación con la capacidad para acumular poliP. En este contexto, es preciso mencionar que los niveles normales de poliP en *S. solfataricus* son de aproximadamente 30 nmoles/mg de proteínas, unas 6 veces

menos de lo que es capaz de acumular *S. metallicus*. Así, la eliminación del contenido poliP en *S. solfataricus* se tradujo en la disminución de la CMI en aproximadamente 3 veces el valor del control, lo que nos hace sugerir que una eventual eliminación del contenido de poliP en *S. metallicus* (180 nmoles/ mg de proteínas) podría ser mucho más dramática que para el caso de *S. solfataricus*. Consecuentemente, podría esperarse en *S. metallicus* tanto una disminución en su capacidad para prosperar en la presencia de cobre como en otras funciones celulares en las que podría estar implicado este polímero.

Alternativamente, se intentó generar una cepa recombinante de *S. solfataricus* que fuera capaz de sobre producir poliP. Para ello, utilizamos como estrategia la sobreexpresión del gen de la polifosfato quinasa (*ppk_T.th*) (actividad sintetizadora de poliP en bacterias) de la bacteria termófila *Thermus thermophilus*. Así, se esperaba que esta recombinante acumulara mayores niveles de poliP, para consecuentemente evaluar su capacidad de prosperar en mayores concentraciones. Aunque fuimos capaces de generar el vector de expresión recombinante, que contenía el gen *ppk_T.th*, no tuvimos éxito en la transformación de las células de *S. solfataricus* y finalmente no pudimos obtener células recombinantes para el gen *ppk_T.th*.

Adicionalmente se estudió la respuesta global del proteoma de las células recombinantes de *S. solfataricus* poliP⁻, comparada con las células control. El objetivo de esta aproximación fue indagar en los posibles cambios celulares que produciría la deficiencia de poliP en *S. solfataricus*, y que podrían explicar la disminución de la capacidad de las células de *S. solfataricus* poliP⁻ para resistir cobre. Si bien el análisis de las proteínas identificadas puede revisarse con más detalle en la sección 3 de resultados, aquí se discutirán algunas consideraciones interesantes.

Nuestros datos proteómicos apoyan la hipótesis de que el poliP podría ser un componente importante en la regulación de la energía, en particular en la regeneración de ATP y del poder reductor. Así, observamos que la carencia de poliP aumentó la expresión de algunas enzimas de la glicólisis, del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y de vías relacionadas (Fig. 29). En *S. solfataricus* la degradación de la glucosa transcurre a través de una versión semi fosforilativa de la vía de Entner-Doudoroff (ED) (Schafer, 1996). Interesantemente, en los análisis proteómicos encontramos aumentada la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPN), que cataliza la conversión del gliceraldehido-3-fosfato (GAP) a 3-fosfoglicerato (3PG) con la consecuente producción de NADPH. En términos regulatorios el GAP es el intermediario clave entre la vía ED y la gluconeogénesis, por lo que se ha propuesto que un incremento de la GAPN interferiría con la gluconeogénesis y direccionaría el flujo hacia el TCA (Snijders y col., 2006) (Fig. 29). En cuanto a la vía del TCA, se identificó la subunidad α de la succinil-CoA sintasa y las subunidades B y C de la enzima succinato deshidrogenasa. La primera cataliza directamente la síntesis de una molécula de ATP, mientras que las segundas producen una molécula de FADH_2 . Interesantemente, observaciones similares se han reportado en células de *Pseudomonas* B4 deficientes en poliP, donde también mediante una aproximación proteómica se encontraron aumentadas varias enzimas del TCA y de otras vías relacionadas con la producción de nucleótidos trifosfatos (Varela y col., 2010). Como se mencionó, un componente central en los mecanismos de resistencia al cobre es el transporte activo del metal a través de ATPasas específicas, lo que podría implicar la depleción de los niveles de ATP celulares producto de una eventual exposición a cobre. Es así como surge la interesante posibilidad de que los poliP podrían constituir un reservorio de ATP. Contrariamente, la

deficiencia de poliP en la cepa recombinante de *S. solfataricus* comprendería una menor reserva energética, por lo demás muy necesaria en los mecanismos de detoxificación de cobre, explicando en parte su menor resistencia al metal.

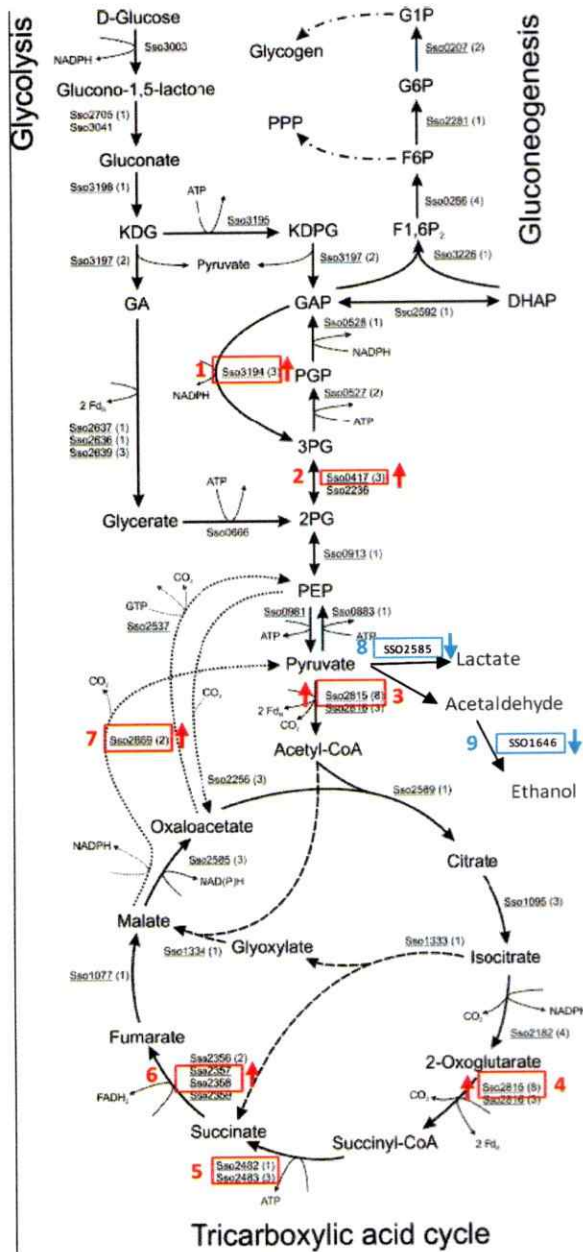


Figura 29. Rutas metabólicas centrales en *S. solfataricus*. El esquema adaptado de Snijders (2006) muestra las rutas metabólicas de la glicólisis, la gluconeogénesis y el ciclo del TCA en *S. solfataricus*. En rectángulos rojos y azules se indican los ORFs que se encontraron aumentados o disminuidos, respectivamente, en las células recombinantes de *S. solfataricus* poliP⁻ mediante los análisis proteómicos. 1: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GDPN), 2: fosfoglicerato mutasa, 3 y 4: 2-oxoacid-ferredoxina oxidoreductasa, 5: succinil-CoA sintetasa (subunidad α), 6: succinato deshidrogenasa (subunidad B y C), 7: enzima málica, 8: L-lactato deshidrogenasa y 9: deshidrogenasa alcohólica.

Por otra parte, mediante los análisis proteómicos se observó el aumento de varias chaperonas y enzimas relacionadas con la respuesta al estrés. Entre ellas, la subunidad γ del Termosoma, una ATPasa de la familia AAA, la superóxido dismutasa (SOD) y una peroxiredoxina. Estos hallazgos sugieren que durante la deficiencia de poliP se produce una situación de estrés general, que implicaría la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y probablemente la degradación de proteínas. Estos resultados se corresponden con lo reportado en la literatura, donde se ha descrito que una mutante *ppk* de *E. coli*, que presenta niveles deficientes de poliP, es incapaz de responder a varios estreses (Rao y Kornberg, 1999). Más aún, los resultados obtenidos en células de *Pseudomonas* B4 deficientes en poliP, también mostraron mayores niveles de chaperonas y enzimas que participan en la remoción de ROS (Varela y col., 2010). Adicionalmente, se ha reportado en *Pseudomonas* B4 que bajo ciertos estímulos estresantes, como la exposición a policlorobifenilos, se generan ROS y consecuentemente se produce un aumento masivo de los niveles intracelulares de poliP (Chavez y col., 2004), sugiriendo la importancia de este polímero frente a una situación de estrés. Por todo esto, nuestros análisis proteómicos sugieren que las células recombinantes de *S. solfataricus* poliP⁻, muestran un estado basal de mayor estrés y por lo tanto aumentaría su susceptibilidad frente a una condición nociva como la exposición al cobre u a otros estímulos estresantes.

Dentro de las proteínas que disminuyeron sus niveles en la condición de deficiencia de poliP resulta interesante la identificación de la enoil-CoA hidratasa y la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Estas enzimas, involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos, también están relacionadas con la biosíntesis de los polihidroxialcanoatos (PHA). Se ha descrito en bacteria que los PHA se acumulan bajo ciertas condiciones metabólicas y actúan como una

fuente de reserva energética. La disminución de los niveles de estas enzimas en *S. solfataricus* produciría la acumulación del 3-hidroxiacil-CoA, que es sustrato y la unidad monomérica en la síntesis de los PHA (Aldor y Keasling, 2003).

Finalmente, nos permitimos presentar un modelo de trabajo que resume toda la información de los posibles mecanismos de resistencia al cobre que actuarían concertadamente en *S. metallicus* (Fig. 30). Este modelo reúne tanto los resultados generados durante este trabajo de Tesis como de otros autores. Así, cuando aumenta la concentración externa de cobre, los policistrones *copMA1* y *copMA2* aumentan sus niveles de expresión, cuyos productos génicos (metalochaperonas de cobre y ATPasas de cobre) permitirían la salida del metal desde el citoplasma. Esto requiere altos niveles de ATP para activar el flujo de salida del cobre mediante las ATPasas específicas. La disminución concomitante de poliP en la presencia de Cu^{2+} puede ser el resultado de su hidrólisis por la PPX para eliminar los cationes asociados al ortofosfato o debido a su uso para regenerar el ATP. Como se ha mencionado, el poliP es sintetizado por la PPK en bacterias y por una enzima equivalente aun desconocida en arqueas. En este contexto, la reacción reversa de la PPK puede generar ATP a partir del poliP en una situación de exceso de ADP, constituyendo otra manera de abastecer de energía a los sistemas de desintoxicación. Cabe mencionar que el modelo debe considerar la respuesta celular antioxidante, que también tiene asociado un gasto energético.

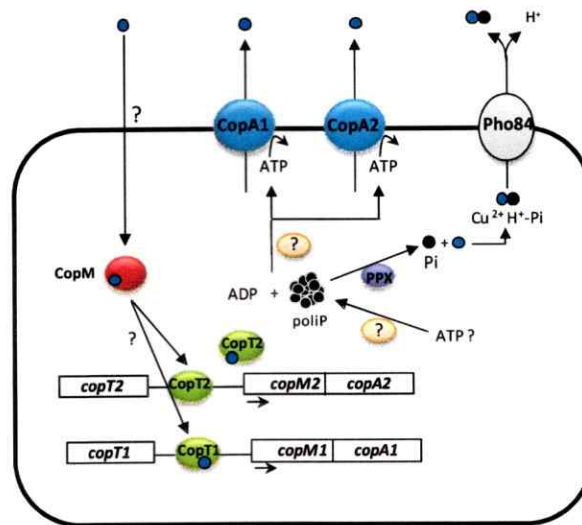


Figura 30. Modelo cualitativo de los posibles mecanismos de resistencia al cobre en *S. metallicus*. CopA1, CopA2, CopM1, CopM2, CopT1 y CopT2 son los determinantes de resistencia al cobre descritos en *S. metallicus*. La enzima responsable de la biosíntesis de los poliP no se conoce y está representado por un óvalo (?). La PPX es la exopolifosfatasa que hidroliza el polímero. Pho84 es el transportador de fosfato que se ha sugerido en arqueas *Sulfolobales* para el transporte del metal-fosfato. Los símbolos ● y ● representan un ión Cu⁺ o Cu²⁺ y un residuo de ortofosfato (Pi) respectivamente. Este modelo de trabajo se basa en parte en la labor de los siguientes autores: Van Veen y col., 1994; Keasling, 1997; Cardona y col., 2002; Remonsellez y col., 2006; Auernik y col., 2008; Ettema et al., 2006 y los resultados obtenidos en esta Tesis.

5. CONCLUSIONES

Se identificaron y aislaron 2 grupos de genes *cop* homólogos, de resistencia a cobre en el genoma de *Sulfolobus metallicus*. Cada grupo codificaría para un regulador transcripcional (*copT*), una metalochaperona (*copM*) y un transportador de tipo ATPasa posiblemente involucrado en la expulsión de cobre (*copA*). La presencia de estos 2 loci *cop* (*cop1* y *cop2*) en el genoma de *S. metallicus*, constituiría una característica inédita para un representante del dominio *Archaea*. Esta duplicación génica podría explicar en parte la elevada resistencia al cobre que muestra *S. metallicus*.

Mediante experimentos de RT-PCR se demostró que los pares génicos *copMA1* y *copMA2* se cotranscriben en respuesta a cobre y cadmio. Los genes que codifican para las ATPasa (*copA1* y *copA2*) se expresan concomitantemente con la concentración de cobre. *copA1* presentó mayores niveles de transcritos comparado con *copA2*. La expresión de estas 2 ATPasas en la presencia de cobre sugiere que actuarían como exportadoras del metal. *copT1* mostró un aumento en sus niveles de expresión respecto a concentraciones crecientes de cobre, mientras que *copT2* mostró una expresión de tipo constitutiva.

Sulfolobus metallicus mostró un patrón de expresión diferencial de las proteínas de membrana cuando creció en la presencia de distintas concentraciones de CuSO_4 . Se identificaron 7 proteínas que aumentaron sus niveles en respuesta al cobre. La identificación de proteínas relacionadas con procesos antioxidantes y la degradación de proteínas sugiere fuertemente que el cobre tiene un efecto oxidativo en esta arquea.

Se generó una cepa recombinante de *S. solfataricus* capaz de sobreexpresar la enzima exopolifosfatasa (PPX) endógena (*S. solfataricus* M16-PPX). Esta estrategia permitió

disminuir más del 98% del contenido celular de poliP. Este es el primer reporte de la modificación del metabolismo de los poliP en *Archaea*.

S. solfataricus M16-PPX deficiente de poliP (poliP-) mostró una mayor sensibilidad al cobre. La condición de deficiencia de poliP ocasiona una disminución en el CMI de CuSO_4 de 2,0 mM a 0,75 mM. Este resultado apoya fuertemente el papel de los poliP en la resistencia al cobre en *Sulfolobus*.

La carencia de poliP produce la expresión diferencial de proteínas que indicarían un déficit energético a nivel celular. Ante esta condición, el microorganismo sobreexpresa enzimas de la glicólisis y el ciclo del TCA, posiblemente para mantener el suministro energético, de forma alternativa al que pudiera ser aportado por el poliP. Adicionalmente, la sobreexpresión de proteínas involucradas en procesos de detoxificación celular y plegamiento de proteínas, reflejan un estado de mayor estrés en *S. solfataricus* poliP-.

6. REFERENCIAS

- Acevedo F., Gentina, J. y Bustos, S. 1993. Bioleaching of minerals -a valid alternative for developing countries. *J Biotechnol* 31, 115-123
- Acevedo J.P., Reyes, F., Parra, L.P., Salazar, O., Andrews, B.A. y Asenjo, J.A. 2008. Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique. *J Biotechnol* 133, 277-286
- Aguilar A. 1996. Extremophile research in the European Union: from fundamental aspects to industrial expectations. *FEMS Microbiol Rev* 18, 89-92
- Akiyama M., Crooke, E. y Kornberg, A. 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *J Biol Chem* 268, 633-639
- Albers S.V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampe, R., Driessen, A.J. y Schleper, C. 2006. Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Appl Environ Microbiol* 72, 102-111
- Aldor I.S. y Keasling, J.D. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol* 14, 475-483
- Alvarez S. y Jerez, C.A. 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* 70, 5177-5182
- Anderson R.P. y Roth, J.R. 1977. Tandem genetic duplications in phage and bacteria. *Annu Rev Microbiol* 31, 473-505
- Auernik K.S., Maezato, Y., Blum, P.H. y 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
- Baker-Austin C., Dopson, M., Wexler, M., Sawers, R.G. y Bond, P.L. 2005. Molecular insight into extreme copper resistance in the extremophilic archaeon '*Ferroplasma acidarmanus*' Fer1. *Microbiology* 151, 2637-2646
- Baker-Austin C., Dopson, M., Wexler, M., Sawers, R.G., Stemmler, A., Rosen, B.P. y Bond, P.L. 2007. Extreme arsenic resistance by the acidophilic archaeon '*Ferroplasma acidarmanus*' Fer1. *Extremophiles* 11, 425-434
- Barns S.M., Delwiche, C.F., Palmer, J.D. y Pace, N.R. 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9188-9193
- Barthelme D., Scheele, U., Dinkelaker, S., Janoschka, A., Macmillan, F., Albers, S.V., Driessen, A.J., Stagni, M.S., Bill, E., Meyer-Klaucke, W., Schunemann, V. y Tampe, R. 2007. Structural organization of essential iron-sulfur clusters in the evolutionarily highly conserved ATP-binding cassette protein ABCE1. *J Biol Chem* 282, 14598-14607
- Bathe S. y Norris, P.R. 2007. Ferrous iron- and sulfur-induced genes in *Sulfolobus metallicus*. *Appl Environ Microbiol* 73, 2491-2497
- Baumann C., Judex, M., Huber, H. y Wirth, R. 1998. Estimation of genome sizes of hyperthermophiles. *Extremophiles* 2, 101-108
- Baumann P., Qureshi, S.A. y Jackson, S.P. 1995. Transcription: new insights from studies on Archaea. *Trends Genet* 11, 279-283
- Braun R. J., Kinkl N., Beer M. y Ueffing M. 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Anal Bioanal Chem* 389, 1033-1045
- Brock T.D., Brock, K.M., Belly, R.T. y Weiss, R.L. 1972. *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol* 84, 54-68
- Brown J.R. y Doolittle, W.F. 1997. Archaea and the prokaryote-to-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 456-502

- Bruins M.R., Kapil, S. y Oehme, F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 45, 198-207
- Bult C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S. y Venter, J.C. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073
- Cardona, S. T., Chavez, F. P., y Jerez, C. A. (2002). The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in archaea. *Appl Environ Microbiol* 68, 4812-44819
- Ciaramella M., Pisani, F.M. y Rossi, M. 2002. Molecular biology of extremophiles: recent progress on the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 85-97
- Chávez F.P., Mauriaca, C., Jerez, C.A. 2009. Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria. *BMC Res Notes* 2, 50-56
- Chavez F.P., Lünsdorf, H. y Jerez, C.A. 2004. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl Environ Microbiol* 70, 3064-3072
- Chen L., Brugger, K., Skovgaard, M., Redder, P., She, Q., Torarinsson, E., Greve, B., Awayez, M., Zibat, A., Klenk, H.P. y Garrett, R.A. 2005. The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota. *J Bacteriol* 187, 4992-4999
- Dameron C.T. y Harrison, M.D. 1998. Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am J Clin Nutr* 67, 1091S-1097S
- Das A., Modak, J.M. y Natarajan, K.A. 1998. Surface chemical studies of *Thiobacillus ferrooxidans* with reference to copper tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 215-222
- Deigweither K., Drell, T.L.t., Prutsch, A., Scheidig, A.J. y Lubben, M. 2004. Expression, isolation, and crystallization of the catalytic domain of CopB, a putative copper transporting ATPase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bioenerg Biomembr* 36, 151-159
- Dennis P.P. 1997. Ancient ciphers: translation in Archaea. *Cell* 89, 1007-1010
- Diruggiero J., Dunn, D., Maeder, D.L., Holley-Shanks, R., Chatard, J., Horlacher, R., Robb, F.T., Boos, W. y Weiss, R.B. 2000. Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic archaea. *Mol Microbiol* 38, 684-693
- Dobrindt U., Hochhut, B., Hentschel, U. y Hacker, J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2, 414-424
- Dopson M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R. y Bond, P.L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic micro-organisms. *Microbiology* 149, 1959-1970
- Echave P., Tamarit, J., Cabisco, E. y Ros, J. 2003. Novel antioxidant role of alcohol dehydrogenase E from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 278, 30193-30198
- Ettema T.J., Brinkman, A.B., Lamers, P.P., Kornet, N.G., de Vos, W.M. y 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
- Ettema T.J., Huynen, M.A., de Vos, W.M. y van der Oost, J. 2003. TRASH: a novel metal-binding domain predicted to be involved in heavy-metal sensing, trafficking and resistance. *Trends Biochem Sci* 28, 170-173
- Franke S., Grass, G., Rensing, C. y Nies, D.H. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185, 3804-3812
- Gaasterland T. 1999. Archaeal genomics. *Curr Opin Microbiol* 2, 542-547
- Gaetke L.M. y Chow, C.K. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147-163

- Gentina J. y Acevedo, F. 1985. Microbial ore leaching in developing countries. *Trends Biotechnol* 3, 86-89
- Gevers D., Vandepoele, K., Simillon, C. y Van de Peer, Y. 2004. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol* 12, 148-154
- Gogarten J.P. y Townsend, J.P. 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* 3, 679-687
- Grass G. y Rensing, C. 2001. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 2145-2147
- Hacker J. y Carniel, E. 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2, 376-381
- Hastings P.J., Bull, H.J., Klump, J.R. y Rosenberg, S.M. 2000. Adaptive amplification: an inducible chromosomal instability mechanism. *Cell* 103, 723-731
- Huber G., Spinnier, C., Gambacorta, A. y Stetter, K.O. 1989. *Metallosphaera sedula* gen. and sp. nov. represents a new genus of aerobic, metal-mobilizing, thermoacidophilic archaeobacteria. *Syst. Appl. Microbiol* 12, 38-47
- Huber G. y Stetter, K. 1991. *Sulfolobus metallicus*, sp. nov., a novel strictly chemolithoautotrophic thermophilic archaeal species of metal-mobilizers. *System Appl Microbiol* 14, 372-378
- Ishihama Y., Schmidt T., Rappsilber J., Mann M., Hartl U., Kerner M. J., y Frishman D. 2008. Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol. *BMC Genomics* 9, 102-119
- Jonuscheit M., Martusewitsch, E., Stedman, K.M. y Schleper, C. 2003. A reporter gene system for the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* based on a selectable and integrative shuttle vector. *Mol Microbiol* 48, 1241-1252
- Jordan H., Sanhueza, A., Gautier, V., Escobar, B. y Vargas, T. 2006. Electrochemical study of the catalytic influence of *Sulfolobus metallicus* in the bioleaching of chalcopyrite at 70 °C. *Hydrometallurgy* 83, 55-62
- Karlin S., Mrazek J., Campbell A. y Kaiser D. 2001. Characterizations of highly expressed genes of four fast-growing bacteria. *J Bacteriol* 183, 5025-5040
- Keasling J.D. 1997. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann N Y Acad Sci* 829, 242-249
- Keasling J.D. y Hupf, G.A. 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62, 743-746
- Kornberg A., Rao, N.N. y Ault-Riché, D. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem* 68, 89-125
- Kulaev I.S., Kulakovskaya, T.V., Andreeva, N.A. y Lichko, L.P. 1999. Metabolism and function of polyphosphates in bacteria and yeast. *Prog Mol Subcell Biol* 23, 27-43
- Kuroda A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. y Kornberg, A. 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* 293, 705-708
- Letunic I., Copley, R.R., Schmidt, S., Ciccarelli, F.D., Doerks, T., Schultz, J., Ponting, C.P. y Bork, P. 2004. SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* 32, 142-144
- Lindström E.B., Gunneriusson, E. y Tuovinen, O.H. 1992. Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. *Crit Rev Biotechnol* 12, 133-155
- Lutsenko S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y. y Dmitriev, O.Y. 2007. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 87, 1011-1046
- Lloyd D.R. y Phillips, D.H. 1999. Oxidative DNA damage mediated by copper(II), iron(II) and nickel(II) fenton reactions: evidence for site-specific mechanisms in the formation of double-strand breaks, 8-hydroxydeoxyguanosine and putative intrastrand cross-links. *Mutat Res* 424, 23-36

- Mana-Capelli S., Mandal, A.K. y Arguello, J.M. 2003. *Archaeoglobus fulgidus* CopB is a thermophilic Cu²⁺-ATPase: functional role of its histidine-rich-N-terminal metal binding domain. *J Biol Chem* 278, 40534-40541
- Mandal A.K., Cheung, W.D. y Arguello, J.M. 2002. Characterization of a thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem* 277, 7201-7208
- Mikkelsen D., Kappler, U., McEwan, A.G. y Sly, L.I. 2006. Archaeal diversity in two thermophilic chalcopyrite bioleaching reactors. *Environ Microbiol* 8, 2050-2056
- Miller K.W., Risanico, S.S. y Risatti, J.B. 1992. Differential tolerance of *Sulfolobus* strains to transition-metals. *FEMS Microbiol Lett* 93, 69-73
- Navarro C.A., Orellana, L.H., Mauriaca, C. y Jerez, C.A. 2009. Transcriptional and functional studies of *Acidithiobacillus ferrooxidans* genes related to survival in the presence of copper. *Appl Environ Microbiol* 75, 6102-6109
- Nelson K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C. y Fraser, C.M. 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323-329
- Nies D.H. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 27, 313-339
- Norris P.R., Burton, N.P. y Foulis, N.A. 2000. Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles* 4, 71-76
- Olendzenski L., Liu, L., Zhaxybayeva, O., Murphey, R., Shin, D.G. y Gogarten, J.P. 2000. Horizontal transfer of archaeal genes into the deinococcaceae: detection by molecular and computer-based approaches. *J Mol Evol* 51, 587-599
- Olsen G.J. y Woese, C.R. 1997. Archaeal genomics: an overview. *Cell* 89, 991-994
- Outten F.W., Outten, C.E., Hale, J. y O'Halloran, T.V. 2000. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. *J Biol Chem* 275, 31024-31029
- Outten W., Huffman, D., Hale, J. y O'Halloran, T. 2001. The independent cue and cus system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 276, 30670 - 30677
- Peña M.O., Lee, J. y Thiele, D. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 129, 1251-1260
- Rajagopal N., Aravalli, Q.S. y Garrett, A. 1998. *Archaea* and the new age of microorganisms. *Tree* 13, 190-194
- Rangarajan E.S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hung, M.N., Schrag, J.D., Cygler, M. y Matte, A. 2006. The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *J Mol Biol* 359, 1249-1260
- Rao N.N. y Kornberg, A. 1999. Inorganic polyphosphate regulates responses of *Escherichia coli* to nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. *Prog Mol Subcell Biol* 23, 183-195
- Rawlings D.E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* 56, 65-91
- Reams A.B. y Neidle, E.L. 2004. Selection for gene clustering by tandem duplication. *Annu Rev Microbiol* 58, 119-142
- Remonsellez F. 2007. Efecto de los metales pesados en el metabolismo de los polifosfatos y en la expresión global de proteínas en el arqueón *Sulfolobus metallicus* Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias mención en Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile

- Remonsellez F., Orell, A. y Jerez, C.A. 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. *Microbiology* 152, 59-66
- Rensing C. y Grass, G. 2003. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 27, 197-213
- Reuter C.J., Kaczowka, S.J. y Maupin-Furlow, J.A. 2004. Differential regulation of the PanA and PanB proteasome-activating nucleotidase and 20S proteasomal proteins of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol* 186, 7763-7772
- Rodriguez Y., Ballester, A., Blázquez, M.L., Gonzalez, F. y Muñoz, J.A. 2003. New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature. *Hydrometallurgy* 71, 47-56
- Romero D. y Palacios, R. 1997. Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu Rev Genet* 31, 91-111
- Rose T.M., Henikoff, J.G. y Henikoff, S. 2003. CODEHOP (Consensus-Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* 31, 3763-3766
- Rose T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M. y Henikoff, S. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* 26, 1628-1635
- Rowlands T., Baumann, P. y Jackson, S.P. 1994. The TATA-binding protein: a general transcription factor in eukaryotes and archaeobacteria. *Science* 264, 1326-1329
- Rudnick H., Hendrich, S., Pilatus, U. y Blotevogel, K.H. 1990. Phosphate accumulation and the occurrence of polyphosphate and cyclic 2,3-diphosphoglycerate in *Methanosarcina frisia*. *Arch Microbiol* 154, 584-588
- Ryan R.P., Ryan, D.J., Sun, Y.C., Li, F.M., Wang, Y. y Dowling, D.N. 2007. An acquired efflux system is responsible for copper resistance in *Xanthomonas* strain IG-8 isolated from China. *FEMS Microbiol Lett* 268, 40-46
- Santoni V., Molloy M., Rabilloud T. 2000. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054-1070.
- Schafer G. 1996. Bioenergetics of the archaeobacterium *Sulfolobus*. *Biochim Biophys Acta* 1277, 163-200
- Scherer P.A. y Bochem, H.P. 1983. Ultrastructural investigation of *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelike inclusion. *Can J Microbiol* 29, 1190-1199
- Sethuraman A., Rao, N.N. y Kornberg, A. 2001. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8542-8547
- Sharma S., Sundaram, C.S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R. y Gade, W.N. 2006. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. *J Biotechnol* 126, 374-382
- She Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J., Chan-Weiher, C.C., Clausen, I.G., Curtis, B.A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P.M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A., Sensen, C.W. y Van der Oost, J. 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7835-7840
- Shiba T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N. y Kornberg, A. 1997. Inorganic polyphosphate and the induction of *ppoS* expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11210-11215
- Silver S. y Phung, L.T. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu Rev Microbiol* 50, 753-789

- Singh S.K., Grass, G., Rensing, C. y Montfort, W.R. 2004. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. J Bacteriol 186, 7815-7817
- Smaldone G.T. y Helmann, J.D. 2007. CsoR regulates the copper efflux operon copZA in *Bacillus subtilis*. Microbiology 153, 4123-4128
- Smith D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J.N. y et al. 1997. Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. J Bacteriol 179, 7135-7155
- Smith P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. y Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 150, 76-85
- Snider J., Thibault, G. y Houry, W.A. 2008. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. Genome Biol 9, 216
- Snijders A.P., Walther, J., Peter, S., Kinnman, I., de Vos, M.G., van de Werken, H.J., Brouns, S.J., van der Oost, J. y Wright, P.C. 2006. Reconstruction of central carbon metabolism in *Sulfolobus solfataricus* using a two-dimensional gel electrophoresis map, stable isotope labelling and DNA microarray analysis. Proteomics 6, 1518-1529
- Solioz M. y Stoyanov, J. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus Hirae*. FEMS Microbiol. Rev 27, 183 -195
- Stetter K.O. 1995. Microbial life in hyperthermal environments. ASM News 61, 285-290
- Teitzel G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whiteley, M. y Parsek, M.R. 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 188, 7242-7456
- Telenius H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjold, M., Ponder, B.A. y Tunnacliffe, A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. Genomics 13, 718-725
- Tsirigos A. y Rigoutsos, I. 2005. A new computational method for the detection of horizontal gene transfer events. Nucleic Acids Res 33, 922-933
- Tsuru T. y Kobayashi, I. 2008. Multiple genome comparison within a bacterial species reveals a unit of evolution spanning two adjacent genes in a tandem paralog cluster. Mol Biol Evol 25, 2457-2473
- Tsutsumi K., Munekata, M. y Shiba, T. 2000. Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. Biochim Biophys Acta 1493, 73-81
- van Veen H.W., Abee, T., Kortstee, G.J., Konings, W.N. y Zehnder, A.J. 1994. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. Biochemistry 33, 1766 -1770
- Varela C., Mauriaca, C., Paradela, A., Albar, J.P., Jerez, C.A. y Chavez, F.P. 2010. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: a cellular and proteomic study. BMC Microbiol 10, 7-20
- Villafane A.A., Voskoboynik, Y., Cuebas, M., Ruhl, I. y Bini, E. 2009. Response to excess copper in the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* strain 98/2. Biochem Biophys Res Commun 385, 67-71
- Waldron K.J. y Robinson, N.J. 2009. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Nat Rev Microbiol 7, 25-35
- Wiame J.M. 1947. Yeast metaphosphate. Federation Proc 6, 302
- Woese C.R., Kandler, O. y Wheelis, M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 4576-4579

- Wood H.G. y Clark, J.E. 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. *Annu Rev Biochem* 57, 235-260
- Wurst H. y Kornberg, A. 1994. A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J Biol Chem* 269, 10996-11001
- Wurst H., Shiba, T. y Kornberg, A. 1995. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177, 898-906
- Yoshida Y., Furuta, S. y Niki, E. 1993. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochim Biophys Acta* 1210, 81-88

7. ANEXOS

Anexo 1

Tabla A1. Composición mineralógica del concentrado de calcopirita utilizado en este trabajo. El análisis fue realizado por el Centro de Investigación Minero Metalúrgico (CIMM)

ESPECIES	%					
	Peso	% S	%Cu	%Fe	%Zn	%AS
Calcopirita	84,57	29,6	29,26	25,71		
Covelina	0,3	0,1	0,2			
Pirita	11,32	6,05		5,28		
Esfalerita	0,05	0,02			0,04	
Magnetita	0,2			0,15		
Hematita	0,54			0,38		
Rutilo	0,05					
Ganga	2,96			(ND)		
TOTAL	100	35,76	29,46	31,51	0,04	
ANÁLISIS QUÍMICO			29,46	31,2	0,07	0,01

Anexo 2

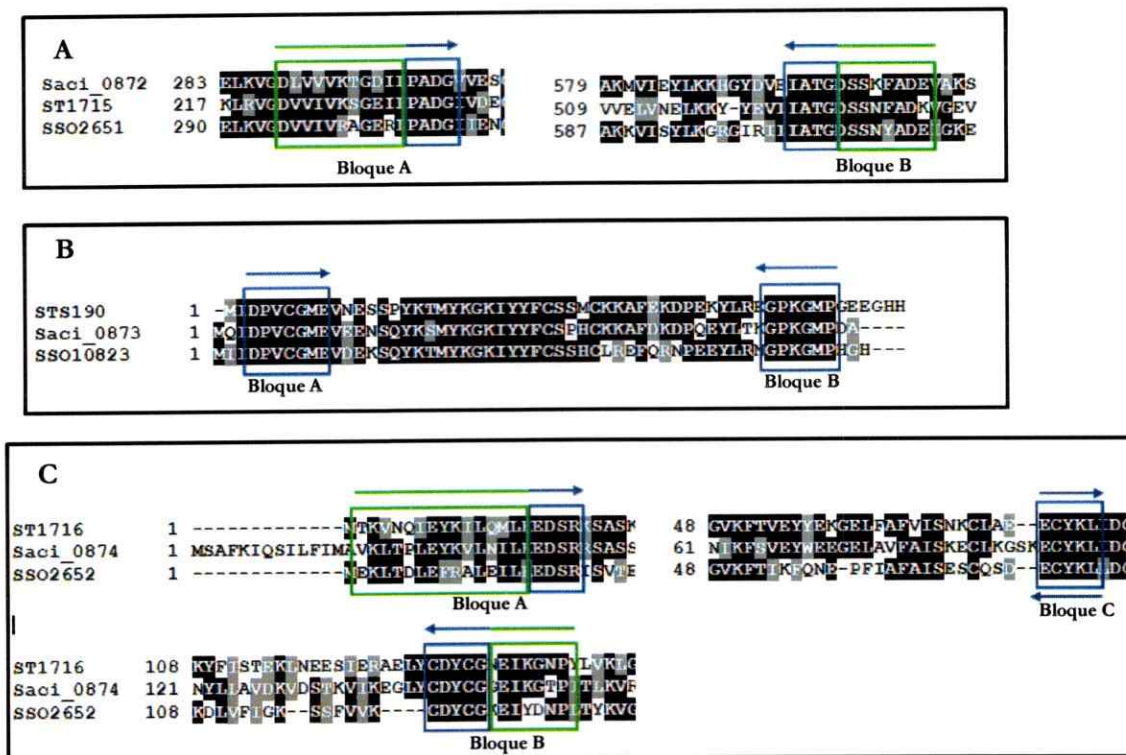


Figura A2. Bloques conservados de secuencia de las proteínas Cop de las arqueas *Sulfolobales* utilizados para el diseño de los partidores CODEHOP y DOP. En las secuencias el bloque A corresponde a la región amino terminal para el diseño del partidor 5' y el bloque B indica la región carboxilo terminal, para el diseño del partidor 3'. El bloque C muestra una región donde se diseñaron partidores en ambos sentidos. Los colores de las cajas representan las regiones de degenerancia (azul) y consenso (verde) y las flechas indican el sentido del partidor. En **A** se muestran los bloques conservados para CopA (*S. acidocaldarius*: Saci_0872, *S. tokodaii*: ST1715, *S. solfataricus*: SSO2651). En **B** los bloques conservados para CopM (*S. tokodaii*: STS190, *S. acidocaldarius*: Saci_0873, *S. solfataricus*: SSO10823). En **C** los bloques conservados para CopT (*S. tokodaii*: ST1716, *S. acidocaldarius*: Saci_0874, *S. solfataricus*: SSO2652).

Anexo 3

Tabla A3. Oligonucleótidos usados en este trabajo. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en la empresa Invitrogen.

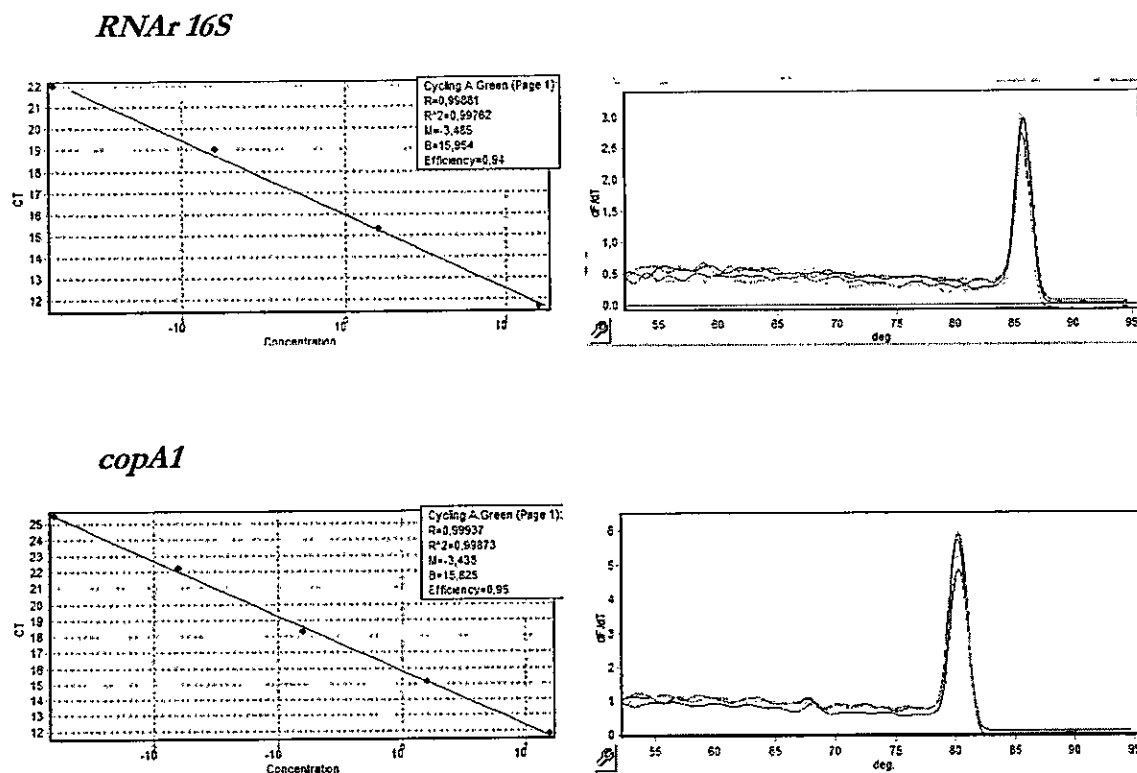
Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Uso
copA_cdegF	5'- gatgtagtaatagtaaaaaactggagaataataccngcngaygg	CODEHOP-PCR
copA_cdegR	5'- tcatcagcaaaattagaagaatctccngtngcdat	CODEHOP-PCR
copT_cdegF1	5'- ctcaaatagaaatataaagtattacaaatgttaaagargaywsnmg	CODEHOP-PCR
copT_cdegR1	5'- ggattaccatttatttcatttccacartarterca	CODEHOP-PCR
copT_cdegR2	5'- cttatcatattcataaatcttccatctattaatttrtarcaayc	CODEHOP-PCR
copT_degF1	5'- gartgytayaarctnat	DOP-PCR
copT_degR1	5'- atnagyttrtarcaayc	DOP-PCR
copM_degF	5'- gayccngntgyggnatgga	DOP-PCR
copM_degR	5'- ccnggnttyccntacgg	DOP-PCR
AdaptF2	5'- cacgctgcactagtagctactgctt	Genome Walking
SP1copA1_3'	5'- aaggatgagggggaccttatgg	Genome Walking
SP2copA1_3'	5'- ggagataagaaatggggttaaagag	Genome Walking
SP1copA1_5'	5'- tgataccatcatggaacctgtcag	Genome Walking
SP2copA1_5'	5'- tcttccacaatcccacccgctg	Genome Walking
SP1copA1_5'_2	5'- gattgtagctaagttaacctcgggctcg	Genome Walking
SP2copA1_5'_2	5'- cttctcaccctcagctgtggtgg	Genome Walking
SP1copA2_3'	5'- gaaagaggaatatatgcaaggggtaaacgg	Genome Walking
SP2copA2_3'	5'- gtgttaatgggagagctggagg	Genome Walking
SP1copA2_5'	5'- cttctctgtggcaacataaacagcc	Genome Walking
SP2copA2_5'	5'- acgcatgtggcgcaatgcattcc	Genome Walking
SP1copT1_5'	5'- cattcctcgcaaccagcttcacactctc	Genome Walking
SP1copT2_5'	5'- cctatgaatactagatctttccctgaac	Genome Walking
SP2copT2_5'	5'- aacagcttataacactcgtcactttggc	Genome Walking
copM2_RT_F	5'- gatgaaaaagccaatataagac	RT-PCR
copA2_Rv	5'- gaactaactaacatcgcc	RT-PCR
copM1_RT_Fw	5'- ctatcgttttgttccgaagcttg	RT-PCR
copA1_Rv	5'- cagcagcaagaacagagacgcc	RT-PCR
*SM16Sf	5'- acgctctaaaaaggcgtgggaata	PCR en tiempo real
*SM16Sr	5'- ttgagctcggggtctttaagcagtg	PCR en tiempo real
copA1Sm_qRT_F1	5'- gctaaggtaatagagagcgg	PCR en tiempo real
copA1Sm_qRT_R1	5'- tgaacaggaatggacagg	PCR en tiempo real
copA2Sm_qRT_F	5'- tgtgctgtctccttagcgt	PCR en tiempo real
copA2Sm_qRT_R	5'- actcttcctcttttcggagt	PCR en tiempo real
copT1Sm_qRT_F	5'- tgtaggagagtggtgcaagct	PCR en tiempo real
copT1Sm_qRT_R	5'- tcgcaagtgagggttatggt	PCR en tiempo real
copT2Sm_qRT_F	5'- gtgttacggagcttgca	PCR en tiempo real
copT2Sm_qRT_R	5'- acactcgtcactttggc	PCR en tiempo real

Anexo 4

Cuantificación de los niveles de transcritos relativos al gen *RNAr 16S* mediante PCR en tiempo real.

Las curvas de calibración para los genes estudiados se generaron a partir de diluciones seriadas de DNA genómico (5×10^6 copias – 5×10^2 copias) amplificado en las mismas condiciones en que se hicieron los experimentos con cDNA.

En cada uno de los experimentos de PCR en tiempo real se incluyó el respectivo control negativo (sin la transcriptasa reversa) y una dilución de uno de los estándares utilizados para la generación de la curva de calibración. Este correspondió al estándar 3 ($1,2 \times 10^6$ copias). De esta manera los resultados se interpolan directamente en la curva de calibración, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Quiagen).



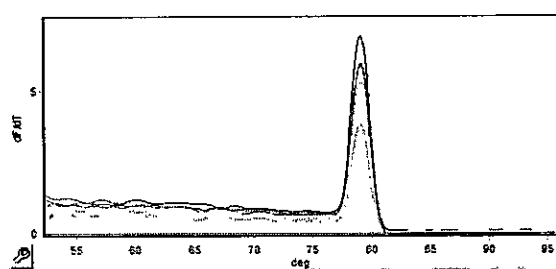
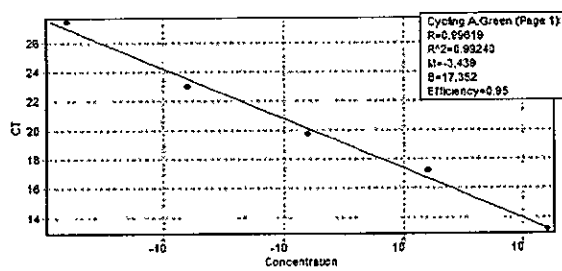
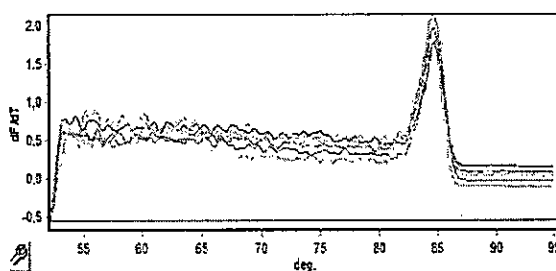
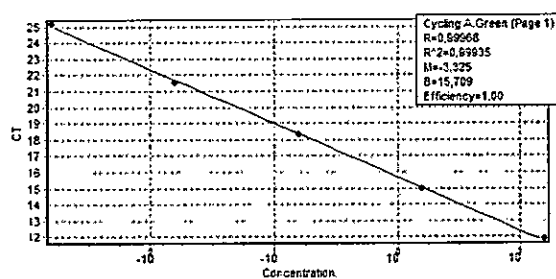
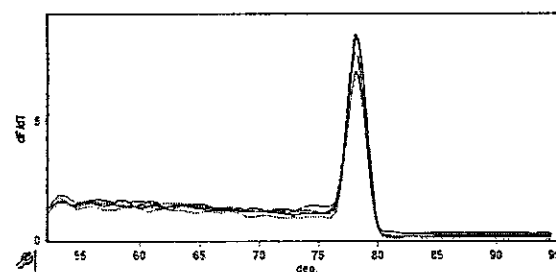
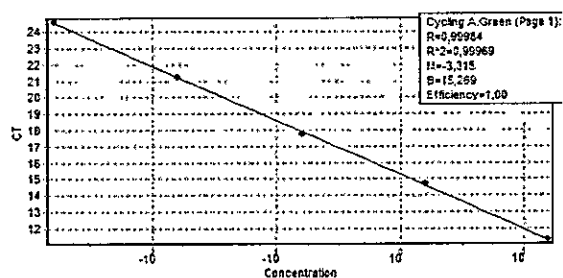
copA2*copT1**copT2*

Figura A4. Curvas de calibración para los genes estudiados por PCR en tiempo real. Se muestra las curvas de calibración obtenidas mediante las diluciones seriadas de DNA genómico. Se indica también la pendiente (M) para cada curva y la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real (Efficiency). Además se muestra la curva de fusión para cada caso.

Ejemplo de los cálculos realizados en la determinación del número de copias para los genes estudiados.

I. Cálculo de los niveles de mRNA relativos al gen 16S rRNA.

Primero es necesario determinar el número de copias presentes en cada dilución de DNA genómico. Teniendo en cuenta que para *S. metallicus* el peso molecular del genoma es:

$$P.M = \sim 1,9 \times 10^9 \text{ g/mol (Baumann y col., 1998)}$$

Usando el número de Avogadro, esto equivale a:

$$3,15 \times 10^{-15} \text{ g/genoma}$$

Esta equivalencia nos permite determinar el número de "genomas" presentes en una masa determinada de moléculas de DNA.

Por ejemplo:

En 1 μl de una dilución de DNA 16 ng/ μl , hay 16 ng que corresponden a $5,07 \times 10^6$ genomas.

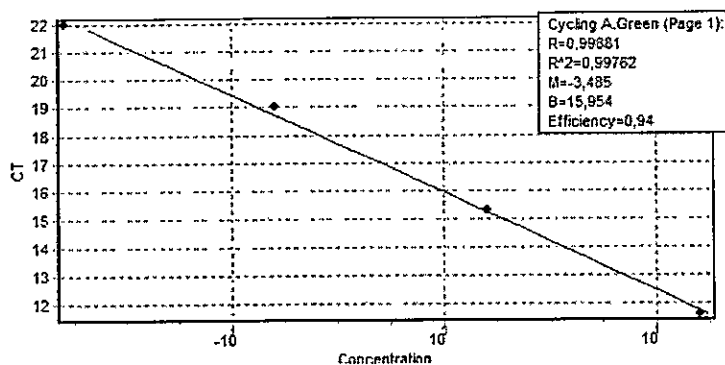
Este número de genomas corresponde al mismo número de copias para un gen que tenga solo una copia en el genoma. Esta aseveración es válida cuando se amplifica un producto específico de un gen presente en una dilución del DNA.

Este procedimiento se utilizó para la determinación del número de copias en 5 diluciones seriadas, desde 16 ng hasta 1,6 pg de DNA genómico de *S. metallicus* a partir de las cuales se realizaron las curvas de calibración para cada gen analizado.

Sabiendo la masa de DNA utilizada en cada dilución es posible, por lo tanto, determinar el número de copias presentes en cada reacción. Esta fue la lógica utilizada para la realizar las curvas de calibración de este trabajo.

En el caso del gen *rRNA 16S*:

Usando la curva de calibración para el gen *rRNA 16S* es posible determinar el número de copias para cada una de las condiciones estudiadas:



Utilizando la ecuación de la curva de calibración para este gen y los valores de Ct obtenidos se tienen:

$$\log(\text{copias}) = \frac{\text{Ct} - \text{B}}{\text{M}}$$

Donde, B= intercepto
M= pendiente

$$\begin{aligned} \text{Ct (0 mM Cu)} &= 11,45 \\ \text{Ct (5 mM Cu)} &= 11,53 \\ \text{Ct (20 mM Cu)} &= 11,65 \\ \text{Ct (50 mM Cu)} &= 11,98 \\ \text{Ct (CuFeS}_2) &= 11,42 \end{aligned}$$

Reemplazando en la ecuación: $\log(\text{copias}) = \frac{\text{Ct} - 15,954}{-3,485}$, se obtiene:

$$\begin{aligned} \log(\text{copias}) \text{ en 5 mM Cu} &= 8,44 = 2,77 \times 10^8 \text{ copias} \\ \log(\text{copias}) \text{ en 20 mM Cu} &= 8,42 = 2,64 \times 10^8 \text{ copias} \\ \log(\text{copias}) \text{ en 50 mM Cu} &= 8,14 = 1,38 \times 10^8 \text{ copias} \\ \log(\text{copias}) \text{ en CuFeS}_2 &= 8,47 = 2,98 \times 10^8 \text{ copias} \end{aligned}$$

Anexo n°5

Evaluación de un posible co-cultivo de *Sulfolobus metallicus* DSM6482

Debido a que la cepa de *S. metallicus* utilizada no tiene un origen clonal, fue preciso evaluar que la duplicación de los loci *cop* no proviniera de dos genomas distintos, producto de un posible co-cultivo de dos o más cepas de la misma especie. Para ello, utilizamos RFLP para determinar la homogeneidad del gen del RNAr *16s* y PCR en tiempo real con el fin de establecer la proporción de los genes *cop* en la muestra de DNA genómico utilizada.

1. Análisis de la homogeneidad del gen del RNAr *16s* mediante RFLP

Para los análisis de RFLP se amplificó el gen del RNAr *16S* de *S. metallicus* utilizando los partidores universales de *Archaea*: 23FPL (5'gCGGATCCGCGGCCGCTGCAGAYCTGGTYGATYCTGCC) y UA1204R (5'ttmggggcctrcikacct). El producto de PCR se purificó desde un gel de agarosa y se clonó en *E. coli* utilizando el vector pCR2.1-TOPO. La selección de los clones positivos se realizó mediante la amplificación desde las colonias utilizando los mismos partidores 23FPL y UA1204R. Las reacciones de PCR cuyos productos rindieron el tamaño esperado (1179 bp) se digirieron con la enzima de restricción *avaI* siguiendo las indicaciones del fabricante, y posteriormente se resolvieron en una electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % (Fig. A5.1).

La digestión *AvaI* sobre el fragmento del gen RNAr *16S* de *S. metallicus* amplificado genera 5 productos de digestión, cada uno de ellos con las siguientes longitudes en pares de bases: 591, 252, 164, 151 y 11. De un total de 41 clones analizados, todos mostraron el patrón de digestión esperado. En la figura A5.1 es posible observar todos los productos de digestión con excepción del producto de 11 pb, que no se resolvió debido al porcentaje de acrilamida utilizado. Adicionalmente, se secuenciaron 10 clones, todos ellos mostraron ser 100 % idénticos a nivel de secuencia nucleotídica (resultados no mostrados).

Finalmente, estos análisis permiten concluir que la muestra de DNA genómico de *S. metallicus* es homogenea en su secuencia del gen RNAr *16S*. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de un co-cultivo donde 2 o más cepas presenten la misma secuencia del gen RNAr *16S*.

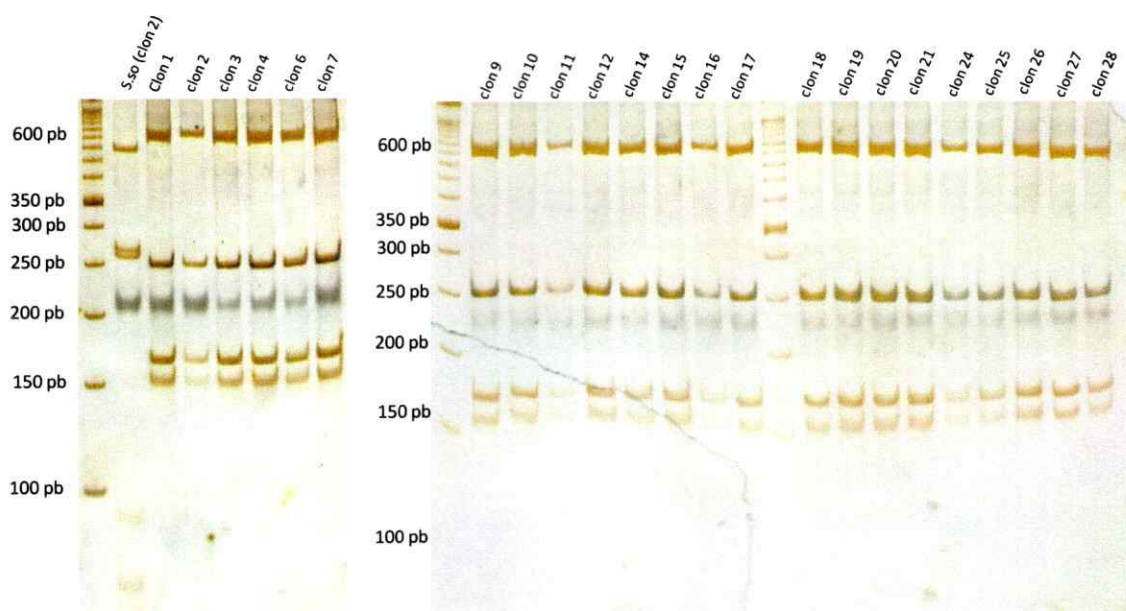


Figura A5.1. Análisis de RFLP del gen RNAr 16S de *S. metallicus*. Los productos de digestión *Ava*I de una secuencia parcial del gen RNAr 16S de *S. metallicus* se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 %. Se muestran 23 clones de un total 41, todos ellos mostraron el mismo patrón de digestión. En la parte superior se indica el n° del clon analizado. Adicionalmente, se analizó un clon de *S. solfataricus* (S.so clon 2), que presentó el patrón de digestión esperado.

2. PCR en tiempo Real para la determinación del n° de copias de los genes *copA1* y *copA2* de *S. metallicus*

Adicionalmente a los análisis de RFLP, utilizamos PCR en tiempo real para determinar el n° de copias de los genes *copA1* y *copA2* en la muestra de DNA genómico de *S. metallicus*.

Basandose en los fundamentos de la metodología de PCR en tiempo real en que el valor de Ct determina la cantidad de DNA templado inicial, se pueden plantear las siguientes situaciones:

- Cada uno de los genes (*copA1* y *copA2*) está codificado en un mismo genoma. Por lo tanto, el Ct debe ser el mismo para cada gen a partir de la misma cantidad de DNA genómico utilizado como templado en la reacción de PCR en tiempo real.
- El gen *copA1* está codificado en un genoma A y el gen *copA2* está codificado en otro genoma B. Si los genomas A y B se encuentran en distintas proporciones en la muestra de DNA genómico total, los Ct deben ser distintos para cada gen.

- c) El gen *copA1* está codificado en un genoma A y el gen *copA2* está codificado en otro genoma B. Si los genomas A y B se encuentran en una proporción 1:1 en la muestra de DNA genómico total, los Ct deben ser iguales para cada gen.

Para evaluar estos supuestos se determinaron los Cts para cada gen (*copA1* y *copA2*) utilizando distintas cantidades de DNA genómico. Los partidores utilizados se indican en el anexo nº3 y las curvas de fusión que corroboran la especificidad de estos partidores se muestran en el anexo nº4. Así, determinamos que los Cts para cada gen presentaron valores prácticamente iguales a juzgar por las desviaciones estándares para valor (Tabla A5). Estas diferencias sutiles pueden estar dentro del error experimental de los ensayos. amplificaciones

Tabla A5. Determinación de los Cts para los genes *copA1* y *copA2*

Templado DNA genómico (ng/reacción)	Ct <i>copA1</i>	Ct <i>copA2</i>
1,6	13,98 ±0,33	14,02 ±0,2
0,16	16,97 ±0,62	17,48 ±0,3
0,016	20,66 ±0,11	20,58 ±0,2
0,0016	24,23 ±0,13	24,66 ±0,1

De acuerdo a estos resultados podemos concluir que cada gen está presente en una copia en dentro de un mismo genoma, lo que apoyaría nuestra proposición de la duplicación de los loci *cop* en *S. metallicus*. Sin embargo, estos resultados no descartan la presencia de 2 cromosomas distintos en la proporción 1:1. Esto último implicaría que de existir un co-cultivo, las poblaciones microbianas se encontrarían en igual proporción, situación que creemos poco probable.