

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



EFFECTO DE LA CARENCIA DE POLIFOSFATOS INORGÁNICOS
EN LA EXPRESIÓN GLOBAL DE PROTEÍNAS Y EN LOS
DETERMINANTES DE RESISTENCIA A COBRE EN EL ARQUEÓN
SULFOLOBUS SOLFATARICUS

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

DANIELA FERNANDA SOTO VERGARA

Patrocinante

Dr. Sergio Álvarez
Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director

Dr. Carlos A. Jerez
Laboratorio de Microbiología
Molecular y Biotecnología
Departamento de Biología
Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

Santiago de Chile, 2012

ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Proceso de biolixiviación	1
1.2 Características de los microorganismos que participan en la biolixiviación	1
1.3 Mecanismos de resistencia a cobre en microorganismos acidófilos.....	2
1.4 Polifosfatos inorgánicos.....	4
1.4.1 Aspectos generales.....	4
1.4.2 Polifosfatos inorgánicos y su relación con la resistencia a metales pesados. .	5
1.5 Género <i>Sulfolobus</i>	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Cepas	11
2.2 Condiciones de cultivo.....	11
2.3 Técnicas generales de biología molecular	12
2.3.1 Extracción de ADN genómico	12
2.3.2 Cuantificación del ADN.....	12
2.3.3 Electroforesis del ADN en geles de agarosa	12
2.3.4 Diseño de oligonucleótidos para las reacciones de PCR y PCR en tiempo real.....	13
2.3.5 Reacciones de PCR.....	13
2.3.6 Reacciones de PCR en tiempo real.....	13

2.3.7 Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real	14
2.4 Técnicas con ARN	15
2.4.1 Extracción del ARN total	15
2.4.2 Transcripción reversa.....	16
2.5 Métodos para el análisis de proteínas	16
2.5.1 Preparación de extractos proteicos totales de <i>S. solfataricus</i>	16
2.5.2 Cuantificación de proteínas	17
2.5.3 Preparación de las muestras de proteínas para ser analizadas por ICPL (Isotope-coded protein label)	17
2.6 Análisis estadísticos	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Cuantificación del gen <i>copA</i> en carencia de poliP y presencia de cobre	18
3.2 Cambios en el proteoma total de las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX deficientes en poliP (poliP-)	19
3.3 Cambios en el proteoma total de las células de <i>S. solfataricus</i> M16 (poliP+) en presencia de cobre	27
3.4 Cambios en el proteoma total de las células de <i>S. solfataricus</i> M16 –PPX (poliP-) en presencia de cobre.....	32
4. DISCUSIÓN	39
4.1 Respuesta de <i>copA</i> frente al cobre en carencia de poliP	39
4.2 Proteínas que experimentaron cambios en más de una condición de estudio y proteínas hipotéticas.....	40
4.3 Efecto de la carencia de poliP en el arqueón <i>S. solfataricus</i>	42
4.3.1 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y conversión de energía	42
4.3.2 Metabolismo de coenzimas y aminoácidos.....	46
4.3.3 Modificaciones postraduccionales y chaperonas	48
4.4 Efecto del cobre en el proteoma del arqueón <i>S. solfataricus</i>	48
4.4.1 Procesamiento y almacenaje de la información	49
4.4.2 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y conversión de energía	51
4.4.3 Metabolismo de coenzimas, aminoácidos e iones inorgánicos	52
4.4.4 Modificaciones postraduccionales y chaperonas	54

4.5 Efecto de la carencia de poliP y la presencia de cobre en el proteoma del arqueón <i>S. solfataricus</i>	55
4.5.1 Procesamiento y almacenaje de la información	56
4.5.2 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y conversión de energía	57
4.5.3 Metabolismo de coenzimas, aminoácidos e iones inorgánicos	58
4.5.4 Modificaciones postraduccionales y chaperonas	61
5. CONCLUSIONES	62
6. REFERENCIAS	64
Anexo 1	73
Anexo 2	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones catalizadas por la polifosfato quinasa (PPK) y la exopolifosfatasa (PPX).....	4
Figura 2. Modelo de destoxificación de metales pesados mediado por poliP en bacterias.....	6
Figura 3. Modelo que resume el posible papel de los determinantes de resistencia a cobre en <i>Sulfolobus</i>	8
Figura 4. Niveles de <i>copA</i> medidos por PCR en tiempo real	19
Figura 5. Esquema de la técnica ICPL.....	20
Figura 6. Representación gráfica del \log_2 (poliP-/poliP+)- mediana versus número de proteínas.	21
Figura 7. Análisis global de las proteínas de <i>S. solfataricus</i> que cambiaron sus niveles en carencia de poliP.....	25
Figura 8. Análisis global de las proteínas de <i>S. solfataricus</i> que cambiaron sus niveles en la condición poliP+ en presencia de cobre.....	31
Figura 9. Análisis global de las proteínas de <i>S. solfataricus</i> que cambiaron sus niveles en la condición poliP- en presencia de cobre.....	34
Figura 10. Reducción del sulfato a sulfito en <i>E. coli</i>	35
Figura 11. Esquema de la vía glicolítica Entner–Doudoroff (ED) y de la degradación de ácidos grasos en <i>S. solfataricus</i>	44
Figura 12. Esquema del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) en <i>S. solfataricus</i>	45
Figura 13. Vía fosforilativa de síntesis de serina.	47
Figura 14. Esquema del sistema BER.	51
Figura 15. Esquema del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) de <i>S. solfataricus</i> en presencia de cobre.....	53
Figura 16. Sistema tiorredoxina.....	55
Figura 17. Esquema de la cadena respiratoria en <i>Sulfolobales</i>	58
Figura 18. Posible vía metabólica de síntesis de treonina, cisteína y metionina en <i>S. solfataricus</i>	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de resultados condición poliP-/poliP+.....	21
Tabla 2. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX carentes de poliP.....	23
Tabla 3. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células recombinantes de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX carentes de poliP.....	24
Tabla 4. Resumen de resultados condición poliP+ Cu/polipP+.....	28
Tabla 5. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en las células de <i>S. solfataricus</i> M16 (poliP+) en presencia de cobre.	29
Tabla 6. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células de <i>S. solfataricus</i> M16 (poliP+) en presencia de cobre	30
Tabla 7. Resumen de resultados condición poliP- Cu/polipP-	33
Tabla 8. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en las células de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-) en presencia de cobre.	36
Tabla 9. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX (poliP-) en presencia de cobre	37

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	: adenosín difosfato
ATP	: adenosín trifosfato
BLAST	: basic local alignment search tool
COG	: grupo de genes ortólogos
ADN	: ácido desoxirribonucleico
DO₆₀₀	: densidad óptica a 600 nm
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
HSP	: proteína de estrés térmico
ICPL	: isotope-coding protein label
NAD	: nicotinamin adenina dinucleótido
NADH	: nicotinamin adenina dinucleótido reducido
ORF	: marco de lectura abierto
pb	: pares de bases
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
ARN	: ácido ribonucleico
RND	: división de nodulación y resistencia (Resistance Nodulation Division)
ROS	: especies reactivas del oxígeno
SOD	: superóxido dismutasa
TAE	: Tris, acetato, EDTA
TCA	: ciclo del ácido tricarboxílico

RESUMEN

Mientras los mecanismos de resistencia al cobre han sido ampliamente estudiados en bacterias, se tiene escasa información sobre los mecanismos de resistencia al cobre en arqueas. Recientemente se ha identificado un grupo de genes (*cop*) de resistencia al cobre, altamente conservado en las arqueas del orden *Sulfolobales*. Este grupo de genes incluye un regulador transcripcional específico de arqueas (*copR*), una metalochaperona de cobre (*copT*) y un transportador de cationes ATPasa tipo P (*copA*).

Otro posible mecanismo de resistencia al cobre en *Sulfolobales* comprendería a los polifosfatos (poliP). Los poliP son moléculas lineales presentes en todos los seres vivos y que cumplen diversas funciones celulares. El modelo que vincula los poliP con la resistencia a cobre propone una disminución de poliP mediada por la exopolifosfatasa (PPX), enzima que degradaría el gran polímero hasta fosfato inorgánico (Pi), el cual podría unirse a cobre para ser finalmente expulsado hacia el periplasma o al medio extracelular por transportadores específicos.

Recientemente nuestro laboratorio ha logrado generar una cepa de *Sulfolobus solfataricus* recombinante con niveles deficientes de poliP, con el fin de evaluar el efecto de su carencia en distintos fenómenos, entre ellos la resistencia a cobre.

Basados en estudios transcripcionales realizados mediante la técnica PCR en tiempo real, determinamos que la inducción de la expresión de *copA* en respuesta a cobre ocurre más tempranamente en células carentes de poliP, comparadas con células que poseen este polímero. Una explicación a este fenómeno sería que en ausencia de poliP, el modelo que vincula los poliP con el flujo de cobre no sería operativo. En consecuencia, el sistema *cop* debería ser activado más tempranamente para compensar la carencia de poliP.

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento que se tiene sobre los poliP y su relación con la resistencia a cobre en *S. solfataricus*, analizamos la expresión diferencial de proteínas en células carentes de poliP y en células expuestas a cobre. De esta forma, mediante la técnica de proteómica cuantitativa ICPL determinamos que

en carencia de poliP las células de *S. solfataricus* sobreexpresaron proteínas involucradas en la degradación de glucógeno y ácidos grasos, junto a aquellas que remueven especies reactivas del oxígeno (ROS). Por otro lado, algunas de las proteínas que disminuyeron sus niveles en carencia de poliP están involucradas en la gluconeogénesis y el ciclo del glioxilato. Estos resultados en conjunto, sugieren que los poliP podrían desempeñar un papel energético en *S. solfataricus*, ya que al parecer, en su ausencia se favorecen las vías catabólicas. La sobreexpresión de proteínas que remueven ROS sugiere un mayor estado de estrés oxidativo en las células *S. solfataricus* poliP-.

Adicionalmente, los experimentos de proteómica cuantitativa nos permitieron determinar que en presencia de cobre, las células de *S. solfataricus* poliP+ sobreexpresan proteínas involucradas en el ciclo del TCA, en la degradación y plegamiento de proteínas, la reparación del ADN y en la degradación del ARN. Estos resultados sugieren que la presencia de cobre podría provocar daño a tanto a nivel de proteínas, como de ácidos nucleicos en las células de *S. solfataricus*. El aumento en los niveles de algunas proteínas involucradas en el ciclo del TCA puede relacionarse con el ATP y el poder reductor que las células necesitan para enfrentar una situación de estrés (ej: proteólisis, plegamiento de proteínas).

Finalmente, las células carentes de poliP y expuestas a cobre aumentaron los niveles de algunas proteasas, de proteínas que forman parte de la cadena transportadora de electrones y de proteínas que participan en la remoción de ROS, como la peroxiredoxina y la superóxido dismutasa (SOD). Si bien la peroxiredoxina se aumentó sus niveles en todas las condiciones de estudio, la SOD sólo lo hizo cuando las células de *S. solfataricus* carentes de poliP, fueron expuestas a cobre. En conjunto estos resultados sugieren un mayor nivel de estrés oxidativo en las células *S. solfataricus* poliP- expuestas a cobre y un papel energético de los poliP. Dentro de las proteínas que disminuyeron sus niveles, encontramos proteínas ribosomales. Esto podría incidir directamente en la síntesis proteica, disminuyendo la capacidad de las células de *S. solfataricus* poliP- de hacer frente a una situación de estrés.

ABSTRACT

Effect of inorganic polyphosphates deficiency in global protein expression and in the copper resistance determinants in the archeon *Sulfolobus solfataricus*

While copper resistance mechanisms have been widely studied in bacteria, there is little information about copper resistance mechanisms of *Archaea*. Recently, a highly conserved group of genes (*cop*) related to the resistance to copper was identified in some species of *Sulfolobales*. This group of genes consists of an archaeal-specific transcriptional regulator (*copR*), a putative metallochaperone (*copT*) and a P-type cation-transporting ATPase (*copA*).

Another potential mechanism involved in copper resistance of *Sulfolobales* would involve inorganic polyphosphates (polyP). PolyP is a linear polymer present in all organisms and performs a wide variety of functions. The model that links polyP with resistance to copper suggests that the exopolyphosphatase (PPX) mediates the degradation of polyP to inorganic phosphate (P_i) which could eventually join copper and be finally ejected to the periplasm or to the extracellular medium by specific transporters.

Recently, our laboratory has generated a recombinant *Sulfolobus solfataricus* strain deficient in polyP levels, in order to evaluate the role of its deficiency in various phenomena, including copper resistance.

Based on transcriptional studies carried out through real-time PCR, we determined that the induction of the expression of *copA* in response to copper occurs earlier in cells lacking polyP, than those possessing the polymer. One explanation for this phenomenon could be that, in the absence of polyP, the model linking polyP to copper efflux would not be operational. As a consequence, the *cop* system should be activated earlier to compensate for the lack of polyP.

To gain insight into polyP and its relationship to copper resistance in *S. solfataricus*, we studied the differential expression of proteins in cells lacking polyP and in cells exposed to copper. Thus, quantitative proteomics studies (ICPL) showed that in the absence of polyP *S. solfataricus* cells overexpresses proteins involved in: the

degradation of glycogen and fatty acids, and in the removal of reactive oxygen species (ROS). On the other hand, some of the proteins that decreased their levels are involved in gluconeogenesis and the glyoxylate cycle. These results suggest that polyP could play an energetic role in the cell considering that the lack of this polymer, upregulated proteins involved in catabolic pathways. The upregulation of proteins involved in removal of ROS suggests the presence of a higher level of oxidative stress in *S.solfataricus* polyP- cells.

Further, ICPL experimentas allowed us to determine that in the presence of copper, *S. solfataricus* polyP+ cells overexpress proteins involved in: the TCA cycle, the degradation and folding of proteins, DNA repairing, and in RNA degradation. These results suggest that the presence of copper could cause damage to both proteins and nucleic acids from *S. solfataricus* cells. The up-regulation of some TCA proteins could be related with the ATP levels and reducing power that cells need to face a stress situation (e.g. proteolysis, folding of proteins).

Finally, when cells lacking polyP were exposed to copper, there was an overexpression of proteases, electron transport chain proteins, and proteins involved in ROS removal (peroxiredoxin and SOD). Although peroxiredoxin was overexpress in all our study conditions, SOD was only up-regulated when *S. solfataricus* polyP- cells were exposing to copper. These findings may reflect a higher oxidative stress in cells lacking polyP and also suggest an energetic role of polyP. Some of the proteins that decreased their levels were ribosomal proteins. This could directly affect protein synthesis and therefor the ability of *S. solfataricus* polyP- cells to respond to a stressing situation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Proceso de biolixiviación

La biolixiviación es un proceso que permite la extracción de metales pesados a partir de los minerales insolubles que los contienen, gracias a la acción de microorganismos capaces de oxidar dichos compuestos (Van Veen y col., 1994; Outten y col., 2001; Cardona y col., 2002; Rohwerder y col., 2003; Ettema y col., 2006; Jerez, 2011). Esta técnica es ampliamente utilizada para la extracción de metales de interés comercial como oro y cobre, pues permite explotar 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; Jerez, 2009).

En el proceso de biolixiviación, para poder extraer los minerales de interés es necesaria la oxidación de sulfuros metálicos, lo cual genera tanto la disminución del pH en el medio, producto de la generación de ácido sulfúrico, como la liberación de altas concentraciones de metales pesados que resultan tóxicos para la vida (Dopson y col., 2003; Orell y col., 2010).

1.2 Características de los microorganismos que participan en la biolixiviación

Los microorganismos utilizados en los procesos de biolixiviación, además de prosperar en ambientes de gran acidez, pueden hacerlo en altas concentraciones de metales pesados. Dentro de este grupo de microorganismos, encontramos a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una bacteria capaz de desarrollarse en ambientes con hasta 800 mM de cobre (Das y col., 1998) y a microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea* como *Ferroplasma acidarmanus* y *Sulfolobus metallicus* que resisten concentraciones de cobre de 312 y 200 mM, respectivamente (Baker-Austin y col., 2005; Remonsellez y col., 2006).

Ya que la eficiencia de los diferentes mecanismos de resistencia a metales pesados juega un papel importante en las características fisiológicas y estructurales de las comunidades microbiológicas presentes en las operaciones de biominería, el

conocimiento de estos tipos de mecanismos es de importancia tanto para el desarrollo y optimización de procesos biolixivantes, como de biorremediación en sitios mineros (Dopson y col., 2003; Orell y col., 2010). En este contexto, son los microorganismos acidófilos y que se desarrollan en ambientes lixiviantes los que deben poseer los mecanismos de resistencia a metales pesados más avanzados, convirtiéndolos en un buen modelo para estudiar dicho fenómeno (Navarro y col., 2009).

Dentro de la amplia gama de metales pesados que existen, uno de interés comercial para la industria minera nacional es el cobre, mineral que 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 ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$). Por esta razón, el presente trabajo se centrará en los mecanismos de resistencia a cobre de los microorganismos acidófilos.

1.3 Mecanismos de resistencia a cobre en microorganismos acidófilos

El cobre es un metal que a bajas concentraciones es vital para los organismos vivos, sin embargo altas concentraciones de este metal resultan extremadamente tóxicas (Pena y col., 1999; Solioz y Stoyanov, 2003). Por lo tanto, las células requieren una fuerte regulación de la concentración intracelular de cobre la cual es mantenida, en gran medida, por transportadores específicos del tipo P-ATPasa que permiten la expulsión de los iones de cobre hacia el medio extracelular (Lutsenko y Kaplan, 1996; Rensing y col., 2000; Mandal y col., 2002).

En el genoma de *A. ferrooxidans* se logró identificar por lo menos 10 genes que estarían involucrados en la homeostasis de este metal. Entre ellos encontramos tres genes que codifican ATPasas putativas relacionadas con el transporte de cobre (*afcopA1*, *afcopA2* y *afcopB*), tres genes relacionados a un sistema de la familia de transportadores RND (por Resistencia, Nodulación, División celular), involucrados en la extracción de cobre de la célula (*cusA_{Af}*, *cusB_{Af}* y *cusC_{Af}*) y dos genes que codifican metalochaperonas periplasmáticas (*cusF_{Af}* y *copC_{Af}*) (Navarro y col., 2009). La expresión de estos marcos de lectura abiertos se estudió mediante PCR en tiempo real usando células de *A. ferrooxidans* adaptadas a crecer en presencia de cobre. Los

resultados mostraron que estos determinantes de resistencia a cobre aumentan su expresión cuando las células son expuestas a concentraciones de cobre en el rango de 5-25 mM o superiores. Además, también se observó que *Escherichia coli* adquiere mayor resistencia a cobre cuando los genes ya mencionados, se expresan en este microorganismo (Navarro y col., 2009; Orell y col., 2010).

En relación a los mecanismos de resistencia a cobre en arqueas acidófilas, estudios bioinformáticos revelaron la existencia de un putativo grupo de genes de resistencia a cobre (*cop*), que se encuentra conservado en varios genomas de arqueas del reino *Crenarchaeota* tales como *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus tokodaii* y *Sulfolobus acidocaldarius* (Ettema y col., 2003). Este grupo de genes del tipo *cop* codifican un regulador transcripcional (CopT), una metalochaperona para cobre (CopM) y finalmente un transportador de cobre del tipo P-ATPasa (CopA) (Ettema y col., 2003).

En *S. solfataricus* el regulador CopT posee en el extremo N-terminal un dominio HTH (por “helix-turn-helix”) de unión a ADN y en el extremo C-terminal un dominio TRASH (por “Trafficking, Resistance and Sensing of Heavy metals”) de unión a metales. Los genes *copM* y *copA* también poseen un dominio TRASH y se transcriben como una sola unidad en respuesta a cobre (Ettema y col., 2006). Ensayos de unión a ADN muestran que CopT se une al promotor de *copTA* y que el cobre modula la afinidad de este regulador por el ADN. De esta forma parece que este grupo de genes juegan un papel importante en la respuesta a cobre de *S. solfataricus* (Ettema y col., 2006).

Recientemente, nuestro laboratorio demostró la presencia de dos genes putativos que codifican ATPasas relacionadas con el transporte de cobre (*copA1* y *copA2*) y dos genes putativos para metalochaperonas (*copM1* y *copM2*) en el genoma de *S. metallicus*. Se observó que las ATPasas se expresaban cuando el arqueón crece en presencia de sulfato de cobre (CuSO_4) 5-50 mM o cuando la calcopirita (CuFeS_2) es usado como sustrato oxidable (Orell, 2010).

No obstante, la presencia de genes similares a los determinantes de resistencia a cobre de microorganismos neutrófilos, no explica del todo la alta resistencia a este metal en acidófilos, por lo que es posible que existan múltiples sistemas de resistencia a cobre, los cuales actúan simultáneamente para conferir dicha propiedad. Uno de estos posibles mecanismos involucrados en la resistencia a cobre estaría mediado por moléculas llamadas polifosfatos inorgánicos (poliP) (Orell y col., 2010).

1.4 Polifosfatos inorgánicos

1.4.1 Aspectos generales

Los poliP son moléculas lineales de cientos de ortofosfatos unidos covalentemente por enlaces fosfoanhidrido altamente energéticos y que cumplen variadas funciones celulares tales como sustituto del ATP en reacciones mediadas por quinasas, reserva de fosfato, quelante de metales y además participan en la regulación de la expresión de los genes SOS, sistema global de respuesta ante distintos tipos de estrés (Kornberg y col., 1999).

Dos enzimas relacionadas con el metabolismo de los poliP son la polifosfato quinasa (PPK) y la exopolifosfatasa (PPX); la primera cataliza la formación de poliP a partir de ATP en forma reversible y la PPX cataliza la hidrólisis de los poliP liberando Pi (Fig. 1) (Kornberg y col., 1999).

Polifosfato quinasa (PPK)



Exopolifosfatasa (PPX)

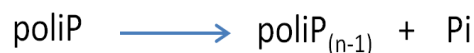


Figura 1. Reacciones catalizadas por la polifosfato quinasa (PPK) y la exopolifosfatasa (PPX).

Ambas enzimas se han purificado de *E. coli* y sus genes se han identificado en muchas bacterias, incluyendo *A. ferrooxidans* (Vera y col., 2003).

1.4.2 Polifosfatos inorgánicos y su relación con la resistencia a metales pesados

En bacterias, hongos, algas y levadura, los poliP generalmente se asocian con moléculas de carga positiva y de bajo peso molecular (Peverylj y col., 1978; Urech y col., 1978). Los cationes que se encuentran más frecuentemente asociados a los poliP son Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} , sin embargo, se observó que esta asociación también puede ocurrir con metales pesados (Keasling, 1997).

Rachlin y col. postularon que las células utilizan los poliP para la detoxificación de metales pesados una vez que estos han ingresado al medio intracelular (Rachlin y col., 1982). Algunos antecedentes que respaldan esta hipótesis son: en algas del género *Chlorophyceae*, *Cyanophyceae* y *Bacillariophyceae* se observó que a medida que se reducía la cantidad de poliP, los cambios citológicos producidos por el plomo aumentaban hasta el punto de causar la muerte celular (Sicko-Goad y Lazinsky, 1986); *Anabaena cylindrica* acumula significativamente más aluminio cuando crece en un medio rico en fosfato (condición en la que se forman poliP) que cuando crece en un medio bajo en fosfato (Pettersson y col., 1985) y finalmente *Klebsiella aerogenes* acumula fosfato inorgánico para la detoxificación de cadmio (Aiking y col., 1984).

Estas observaciones proponen que los poliP, dada su alta densidad de cargas negativas y la flexibilidad de su enlace, actúan como un quelante de iones metálicos (Kornberg y col., 1999). Además, existe evidencia que sugiere que los poliP son degradados durante el crecimiento en presencia de metales pesados. Por ejemplo en *Klebsiella aerogenes* se observó que el gran contenido de poliP intracelular desaparece luego de la exposición a cadmio (Aiking y col., 1984), fenómeno que se repite en *Stichococcus bacillaris* luego de la exposición a varios metales pesados (Zhang y Majidi, 1994).

Estudios desarrollados en *E. coli* muestran que al clonar y sobreexpresar los genes que codifican la PPK y la PPX aumenta significativamente la resistencia a cadmio de la cepa recombinante (Keasling y Hupf, 1996). En base a estos resultados se propuso que la degradación de los poliP, catalizada por la PPX, permitiría que el fosfato inorgánico liberado de esta reacción se asocie con metales pesados u otros

cationes tóxicos, pare ser finalmente expulsados de la célula por transportadores de fosfato inorgánico ubicados en la membrana plasmática (Fig. 2) (Van Veen y col., 1994; Keasling, 1997).

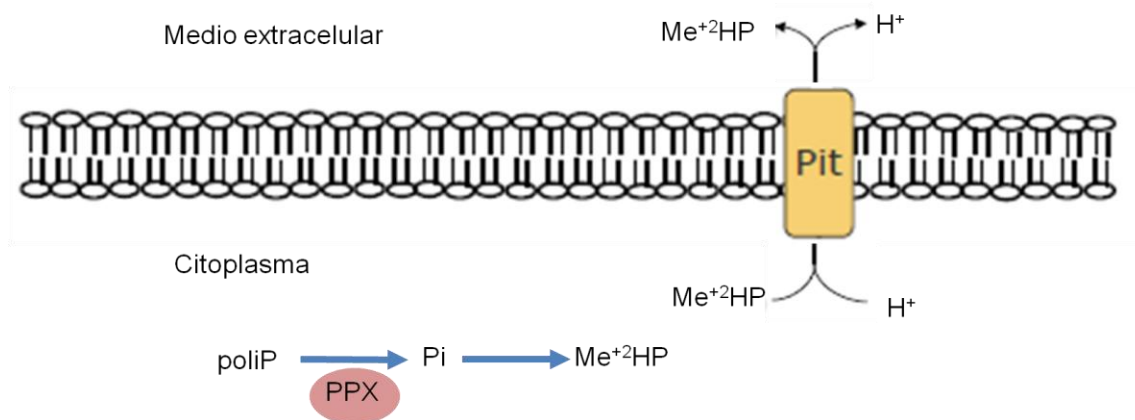


Figura 2. Modelo de destoxificación de metales pesados mediado por poliP en bacterias. La actividad de la PPX es estimulada por entrada de cationes dentro de la célula. Bajo estas condiciones, la enzima cataliza la hidrólisis de los poliP liberando fosfato inorgánico (Pi), el cual puede ser expulsado de la célula junto a los iones metálicos por un transportador tipo Pit.

En los microorganismos acidófilos también existe evidencia de que los poliP podrían estar involucrados en la resistencia a metales pesados y específicamente en la resistencia a cobre.

En *S. solfataricus* se logró identificar el gen putativo *ppx* que codificaría la PPX, la cual se sobreexpresó y purificó en *E. coli* (Cardona y col., 2002). Sin embargo, aún no se ha identificado la actividad que sintetiza los poliP en este microorganismo ni en ningún otro miembro del género *Sulfolobus* (Orell y col., 2012).

También se sabe que *A. ferrooxidans* y *S. metallicus* acumulan grandes cantidades de poliP, en forma de gránulos densos que se pueden observar por microscopía electrónica. En ambos microorganismos se demostró que en presencia de cobre se produce una disminución de los niveles intracelulares de poliP, junto con un aumento de la actividad de PPX y del eflujo de P_i al medio extracelular (Alvarez y

Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006). Estos resultados son consistentes con el modelo que propone que la disminución de poliP estaría mediada por la PPX, enzima que degradaría el gran polímero de poliP hasta fosfato inorgánico (P_i), el cual podría, unirse a cobre para ser finalmente expulsado hacia el periplasma o al medio extracelular por transportadores de fosfato inorgánico, como el sistema Pit presente en *E. coli*. Sin embargo en arqueas del género *Sulfolobus* y en *A. ferrooxidans* no se han encontrado genes putativos que codifiquen para un sistema Pit, pero sí se han encontrado marcos de lectura abiertos para un putativo Pho-84 de levadura que podría actuar como transportador de fosfato (Orell y col., 2009) y que como se ha demostrado en *Saccharomyces cerevisiae*, sólo puede transportar complejos Me- P_i en condiciones ácidas (Fristedt y col., 1999).

En base a estos resultados, se diseñó un modelo para el género *Sulfolobus* que explica como actuarían los poliP, junto con los determinantes de resistencia a cobre, en el proceso de detoxificación del cobre dentro de la célula (Fig.3). Sin embargo, hasta el momento aún no se ha podido comprobar la formación y transporte de un complejo Me- P_i , lo que impide validar por completo el modelo propuesto.

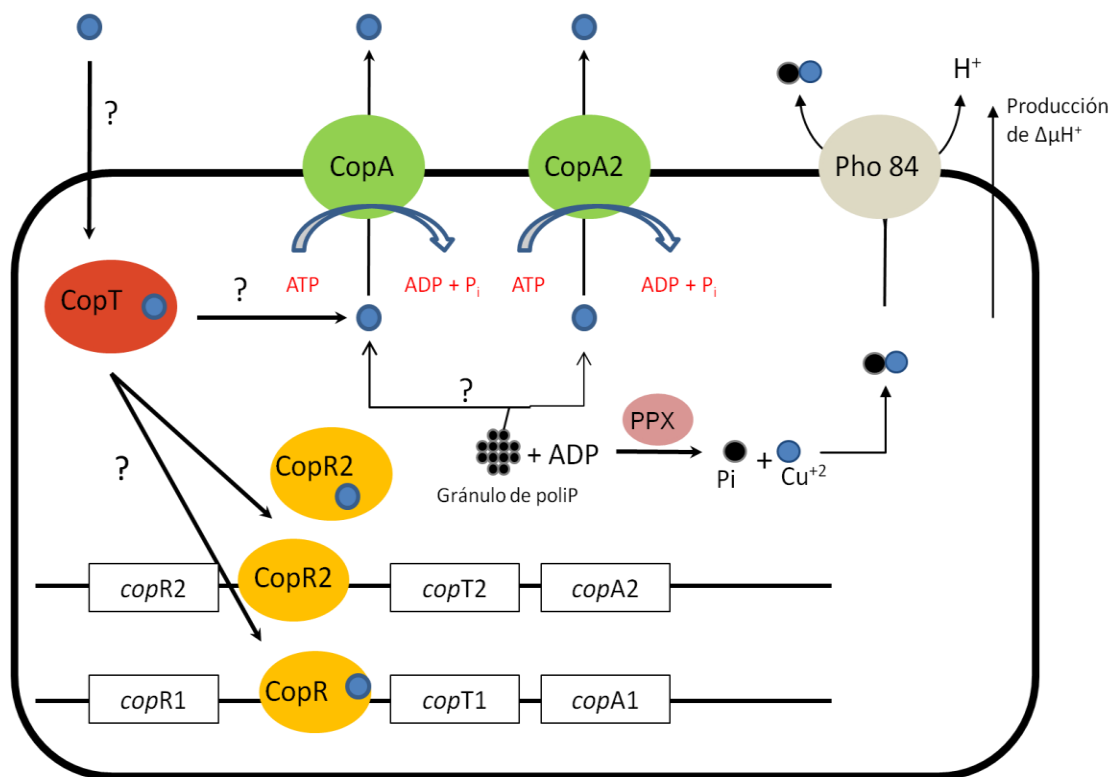


Figura 3. Modelo que resume el posible papel de los determinantes de resistencia a cobre en *Sulfolobus*. CopA1, CopA2, CopT, CopR, son determinantes de resistencia a cobre descritos en muchas arqueas. La polifosfato quinasa (PPK), es la enzima que sintetiza los poliP, la cual no se ha encontrado en arqueas. Pho84 es el transportador de fosfato putativo, presente en el genoma de algunos *Sulfolobus* y que podría ser usado en vez del sistema Pit. Este modelo se basa en parte en el trabajo de los siguientes autores: Van Veen y col., 1994; Keasling, 1997; Outten y col., 2001; Cardona y col., 2002; Ettema y col., 2006; Remonsellez y col., 2006; Auernik y col., 2008 y algunos resultados no publicados de nuestro laboratorio.

1.5 Género *Sulfolobus*

Las arqueas del género *Sulfolobus* son microorganismos termoacidófilos, descritos por primera vez por Brock en 1972 como “bacterias” oxidantes de azufre capaces de crecer a altas temperaturas y bajos pH (Brock y col., 1972). Debido a la existencia de especies heterotróficas 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. En la

actualidad *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* y *S. todakii* han sido los miembros más estudiados del género *Sulfolobus* debido a su habilidad de alcanzar altas densidades de crecimiento tanto aeróbica como heterotróficamente en el laboratorio.

Para profundizar el conocimiento que se tiene respecto a los poliP y su relación con la homeostasis de cobre en arqueas acidófilas, el arqueón *Sulfolobus solfataricus* es un buen modelo, ya que presenta varias características que facilitan su estudio, tales como ser cultivable en condiciones aeróbicas y heterotróficas tanto en medio líquido como en medio sólido; su genoma se encuentra anotado y secuenciado (She y col., 2001); se disponen de herramientas genéticas para la transformación y también vectores para la expresión génica (Jonuscheit y col., 2003; Albers y col., 2006). Además nuestro laboratorio ha logrado generar una cepa recombinante con niveles deficientes de poliP, con el fin de evaluar el papel de su carencia en distintos fenómenos, entre ellos la resistencia a cobre.

Estudios realizados por nuestro laboratorio muestran que al inducir la eliminación de poliP de la cepa M16-PPX, ésta presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0,75 mM CuSO₄ siendo casi 3 veces menor a la CMI de la cepa en presencia de poliP (2 mM CuSO₄) y además que en la presencia de 1 mM de CuSO₄ la cepa recombinante M16-PPX muestra una disminución de aproximadamente el 40% del crecimiento comparadas con la cepa M16-PPX sin cobre (Orell, 2010). Sin embargo, hasta el momento se desconoce cómo la carencia de poliP afecta los diversos mecanismos celulares de resistencia a cobre y la transcripción de los determinantes de resistencia a cobre en *S. solfataricus*. Este trabajo tiene la intención de investigar dicho fenómeno.

Considerando los estudios que vinculan a los poliP con la resistencia a metales, es de esperar que en presencia de cobre la deficiencia en este polímero altere, entre otras cosas, la transcripción de los determinantes de resistencia a cobre aumentándola, para compensar así la carencia de poliP y la expresión global de proteínas relacionados con la homeostasis de este metal.

Por lo tanto nuestra **Hipótesis** de trabajo es: La deficiencia de polifosfatos inorgánicos produce cambios en los niveles de las proteínas, algunas de las cuales podrían estar relacionadas con la resistencia a cobre y un aumento en la transcripción de los determinantes de resistencia a cobre en *S. solfataricus*.

Para validar esta hipótesis se propuso como **Objetivo general**: Determinar el efecto de la carencia de los polifosfatos inorgánicos en la expresión global de proteínas y en la transcripción de los determinantes de resistencia a cobre en *S. solfataricus*.

Para llevar a cabo nuestro objetivo general los estudios de proteómica resultan útiles pues permiten analizar la expresión global de proteínas en la célula, en un momento determinado y bajo distintos estímulos ambientales. Del mismo modo, estudios cuantitativos mediante PCR en tiempo real permitirán estudiar los perfiles de expresión de los genes involucrados con la resistencia a cobre en *S. solfataricus* y cómo estos responden ante la carencia de poliP en presencia de cobre.

De esta forma nuestros **Objetivos Específicos** son:

- 1) Cuantificar la expresión de los determinantes de resistencia a cobre (*copR*, *copT*, *copA*) mediante PCR en tiempo real, en la cepa recombinante *S. solfataricus* M16-PPX, tanto en ausencia como en presencia de cobre.
- 2) Determinar mediante proteómica cuantitativa ICPL, cambios en los niveles proteicos en el extracto de proteína total de la cepa *S. solfataricus* M16 (poliP+), tanto en ausencia como en presencia de cobre.
- 3) Determinar mediante proteómica cuantitativa ICPL, cambios en los niveles proteicos en el extracto de proteína total de la cepa *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-) tanto en ausencia como en presencia de cobre.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas

Para la realización de esta memoria de título, se utilizaron las cepas de *S. solfataricus* M16 y M16-PPX. M16 es una cepa mutante *pyrEF*, auxótrofa de uracilo. M16-PPX es una cepa recombinante que sobreexpresa el gen *ppx* endógeno que codifica para la exopolifosfatasa (PPX). Esta cepa se generó en colaboración con Albers S. (Albers y col., 2006) utilizando el vector de integración cromosomal pJ0503, cuya expresión fue inducible por la adición de D-arabinosa en el medio de cultivo. La construcción del vector de expresión fue posible luego de realizar un subclonamiento del gen *ppxS.so* (gen *ppx* de *S. solfataricus*) en el vector pMZ1 propagable en *E. coli* y su posterior clonamiento con el vector de expresión pJ0503. De esta forma, producto de la sobreexpresión de la PPX, enzima responsable de la hidrólisis de los poliP, se obtuvo una cepa de *S. solfataricus* con niveles deficientes en este polímero (Orell, 2010).

2.2 Condiciones de cultivo

Ambas cepas de *S. solfataricus* 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 (NH₄)₂SO₄, 0,28 g/l KH₂PO₄, 0,25 g/l MgCl₂ x 7 H₂O, 0,07 g/l CaCl₂ x 2 H₂O, 0,02 g/l FeCl₂ x 4 H₂O, 1,8 mg/l MnCl₂ x 4 H₂O, 4,5 mg/l Na₂B₄O₇ x 10 H₂O, 0,22 mg/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,06 mg/l CuCl₂ x 2 H₂O, 0,03 mg/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,03 mg/l VoSO₄ x 2 H₂O y 0,01 mg/l CoCl₂ x 6 H₂O. Este medio salino se suplementó con 0,1 % (p/v) de N-Z amina (Fukla®), con 0,2% (p/v) de glucosa y con 0,01 mg/ml de uracilo.

Para los experimentos de inducción de la enzima PPX recombinante se agregó 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 de crecimiento 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 0,6 a 600 nm (DO₆₀₀), se utilizó como inóculo al 1% (v/v). Para asegurarnos que en nuestros experimentos la construcción genética de la cepa M16-PPX fuera funcional, el inóculo criopreservado a partir del cual

hicimos nuestros experimentos, provenía de un clon del cual fue posible purificar la PPX recombinante (que poseía cola de histidina), mediante columnas de níquel. El crecimiento se determinó midiendo la DO_{600} .

2.3 Técnicas generales de biología molecular

2.3.1 Extracción de ADN genómico

Las células de *S. solfataricus* se inocularon en 100 ml de medio Brock, suplementado con N-Z amida y glucosa (ver sección 2.2), al 1% y se crecieron hasta fase exponencial tardía. Posteriormente, se colectaron las células provenientes de 1,5 mL por centrifugación (8.000 x g durante 3 min) y se lavaron tres veces con medio Brock. Para la extracción del ADN genómico, se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del kit Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega®).

2.3.2 Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN genómico se realizó por la medición de la absorbancia a 260 nm (A_{260}) en un equipo espectrofotómetro para multi-volúmenes Epoch (Biotek, USA). Para la cuantificación de ADN genómico se utilizaron 2 μ l de una dilución 1:5 del ADN genómico extraído. Una A_{260} igual a 1 corresponde a una solución de ADN de 50 μ g/ml. La pureza se determinó obteniendo la razón de A_{260}/A_{280} . Se utilizó una preparación de ADN con una razón $A_{260}/A_{280} > 1,8$ lo que se considera con una baja cantidad de proteínas.

2.3.3 Electroforesis del ADN en geles de agarosa

Para comprobar la calidad del ADN genómico, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 0,5 X (20 mM Trisacetato 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 ADN se utilizó una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0,2 μ g/mL preparado en amortiguador TAE 0,5 X. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta.

2.3.4 Diseño de oligonucleótidos para las reacciones de PCR y PCR en tiempo real

Para amplificar los fragmentos específicos de cada uno de los genes de estudio se diseñaron partidores usando la secuencia anotada del genoma de *S. solfataricus* de la cepa P2. El diseño se realizó utilizando el programa WEB Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y se sintetizaron por la empresa Invitrogen®. En general, se escogieron partidores de entre 18 a 20 nucleótidos, con un contenido guanina-citocina de al menos 50%, con estructuras secundarias débiles y que permitieran obtener un amplificado entre 100 y 250 pb para cada pareja. Posteriormente, se comprobó que cada una de las parejas de partidores amplificara un fragmento específico para cada ORF utilizando la herramienta BLAST. Las secuencias de los partidores utilizados, se encuentran en la tabla A1 (Anexo1).

2.3.5 Reacciones de PCR

Para comprobar la especificidad de los partidores diseñados se utilizó la enzima *Taq* ADN polimerasa (Promega®) siguiendo las especificaciones del fabricante. Cada reacción de PCR se montó en un volumen final de reacción de 25 µl y se utilizaron 1ng/µl de ADN genómico de *S. solfataricus*, 5 ng/µl de cada partidor, 0,1 mM dNTPs, 0,1 U/µl de *Taq* ADN polimerasa y un amortiguador adecuado para la actividad de dicha enzima. El programa de amplificación fue el siguiente: 3 min a 95 °C, seguido de 30 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 7 min a 72 °C.

También se realizaron reacciones de PCR para comprobar la inexistencia de contaminación con ADN en la síntesis de ADNc. Para esto se amplificó un fragmento del gen *rps2P* que codifica para una proteína ribosomal. Como molde se usó el ADNc diluido 1:20 veces obtenido con y sin transcriptasa reversa (ver sección 2.4.2).

2.3.6 Reacciones de PCR en tiempo real

La cuantificación de la transcripción del gen *copA* de *S. solfataricus*, se realizó mediante la técnica 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 µL para cada reacción. Para las mediciones de *copA* y del gen de referencia *rps2P* se usó 1 µL de una dilución 1:20 de cada ADNc previamente obtenido (ver sección 2.4.2), 1 µM final de cada partidor y 7,5 µL de “master mix” QuantiFast SYBR Green (Quiagen®). Las condiciones de amplificación fueron de 10 min de desnaturación y activación enzimática a 95°C, seguido de 30 ciclos de 10 s a 95°C (desnaturación) 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.

2.3.7 Cuantificación de transcritos por PCR en tiempo real

Para el análisis de la transcripción de *copA* en respuesta a una situación de estrés causada por el cobre en carencia de poliP, se cuantificó la expresión total del transcrito mediante PCR en tiempo real

En este trabajo se utilizó el método de cuantificación relativa para el estudio de los niveles de transcrito de *copA*. Este método determina los cambios en los niveles de mRNA de un gen respecto de los niveles de otro gen, cuyos niveles permanecen constantes en la condición experimental que se está estudiando.

Se construyeron curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de *S. solfataricus* cuyo rango fue desde 10 ng/µl a 0,001 ng/µl. Al graficar el valor de CT, ciclo en el cual la amplificación comienza a ser exponencial, versus el logaritmo de la concentración de ADN se obtiene una recta con pendiente negativa, con la cual podemos determinar la eficiencia (E) de la reacción para cada pareja de partidores. Conociendo este valor (E) y el CT de nuestras muestras, podemos utilizar la siguiente estrategia para determinar la expresión relativa de un gen en una determinada situación experimental (Pfaffl, 2001):

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E^{\Delta\text{CT gen de estudio (condición control- condición experimental)}}}{E^{\Delta\text{CT gen referencia (condición control- condición experimental)}}$$

Para estos experimentos se desarrollaron 3 réplicas biológicas, con preparaciones independientes de ARN y de ADNc y como gen de referencia de utilizó el gen *rps2P* que codifica la proteína S2P de la subunidad ribosomal 30s. Se escogió este gen de referencia debido a que su expresión no se ve afectada ni por la carencia de polifosfato, ni por la presencia de cobre.

2.4 Técnicas con ARN

2.4.1 Extracción del ARN total

El ARN total de *S. solfataricus* se extrajo durante la fase exponencial del crecimiento (0,3 DO₆₀₀). Para ello, se modificó el protocolo de extracción descrito para el reactivo TRIzol (Invitrogen®). Las células se colectaron por centrifugación a 8.000 x g por 3 min a T° ambiente y se lavaron dos veces con medio Brock. Para la obtención del ARN se tomaron fracciones de 7 mg (peso húmedo) de sedimento de células y se resuspendieron en 60 µL de tampón TEN (20 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA y 100 mM NaCl). Esta suspensión se mezcló con 60 µl 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 15 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 agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 30 s y se centrifugó a 12.700 x g durante 15 min, seguido de la recolección de la fase superior acuosa. El ARN se precipitó incubando la fase acuosa a T° ambiente con 250 µl de isopropanol y 250 µl citrato de sodio (0,8 M) durante 15 min. Luego de la precipitación, el ARN se recuperó por centrifugación a 12.700 x g por 15 min a 4°C y se lavó 2 veces con etanol al 70 %. Finalmente, se resuspendió en 12 µL de agua libre de nucleasas.

Para eliminar los restos de ADN presentes en la preparación, el ARN se incubó por 1 h a 37°C con 40 U (2 µl) de DNAsa libre de RNAsas “Turbo DNA-free” (Ambion®) en un volumen final de 100 µL siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La integridad del ARN se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Para determinar la concentración del ARN se utilizaron 2 µl de la suspensión y se midió la A₂₆₀ en un equipo espectrofotómetro de multi-volumenes

Epoch (Biotek, USA). Se utilizó la relación $1 \text{ DO}_{260} = 40 \mu\text{g ARN/mL}$ para cuantificar el ARN presente en la muestra. La pureza del ARN se estimó por la razón A_{260}/A_{280} . Se utilizó una preparación de ARN 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 $0,8 \mu\text{g}$ de ARN total. En los experimentos de RT-PCR se agregaron $0,5 \mu\text{g}$ de hexámeros de oligonucleótidos (Random hexamer primer, Invitrogen®) como partidores. En un primer paso se mezcló el ARN con los partidores en un volumen final de $6 \mu\text{L}$ y esta mezcla se incubó a 70°C por 5 min, para luego incubarla en hielo durante 5 min. Este paso tiene por objetivo permitir la desnaturación de las posibles estructuras secundarias del ARN y facilitar el acceso del partidor a su zona de hibridación. Luego, se agregó la mezcla de reacción que contenía: amortiguador ImProm-II 1x (Promega®), dNTPs $0,5 \text{ mM}$ cada uno, MgCl_2 3 mM y 1 U de transcriptasa reversa ImProm-II (Promega®). Todas las concentraciones mencionadas corresponden a las concentraciones finales en el medio de reacción. Esta mezcla se incubó por 10 min a 25°C para inducir la unión de los partidores y luego la síntesis de ADNc se realizó durante 1 h a 42°C y finalmente, la enzima se inactivó incubando la mezcla por 10 min a 70°C .

2.5 Métodos para el análisis de proteínas

2.5.1 Preparación de extractos proteicos totales de *S. solfataricus*

Se prepararon extractos de proteínas totales tanto de células de *S. solfataricus* M16, como de *S. solfataricus* M16-PPX crecidas hasta la fase exponencial ($0,3\text{-}0,6 \text{ DO}_{600}$) y en presencia de D-arabinosa ($0,2 \text{ \% p/v}$) y $0,01 \text{ mg/ml}$ de uracilo. Para ambas cepas, el tiempo de incubación con D-arabinosa fue de 24 h. 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 se resuspendieron en solución amortiguadora de sonicación (50 mM Tris-HCl pH 8,15, 1 mM EDTA y $100 \mu\text{g/ml PMSF}$), a una razón de $10 \mu\text{l}$ de amortiguador por 1 mg de peso húmedo de células. La lisis se realizó mediante un programa de sonicación en hielo, que consistió en 9 ciclos de 20 seg e intervalos alternados de 30 seg de detención. Se utilizó un equipo sonicador Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR®.

Consecutivamente, las suspensiones se centrifugaron a 9.800 x g durante 5 min para eliminar las células enteras y los restos celulares. Finalmente, el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 mL y se utilizó como extracto proteico para realizar los análisis de proteómica.

2.5.2 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®).

2.5.3 Preparación de las muestras de proteínas para ser analizadas por ICPL

Para la preparación de las muestras, se tomaron 50 µg de extracto de proteínas total, provenientes de 3 cultivos independientes y se mezclaron en un tubo de 1,5 mL para dar un total de 150 µg de proteína.

Estas mezclas proteicas se liofilizaron por 48 h a -40°C. Las muestras se sellaron con parafilm y se guardaron a -20°C hasta el momento de ser despachadas para realizarles los análisis de proteómica, mediante la técnica cuantitativa ICPL (Isotope-coded protein label).

2.6 Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos mediante PCR en tiempo real se analizaron mediante el modelo estadístico ANOVA de doble vía, junto con un post- ensayo de Bonferroni. El análisis ANOVA se utilizó para establecer si existen diferencias significativas entre las varianzas de nuestros datos respecto a nuestras dos variables: tiempo y carencia/ausencia de poliP. El post-ensayo de Bonferroni se utilizó para determinar en qué tiempo la diferencia en los niveles de transcrito de *copA*, fue estadísticamente significativa entre la condición poliP- y la condición poliP+.

3. RESULTADOS

3.1 Cuantificación del gen *copA* en carencia de poliP y presencia de cobre

Como ya se conoce, los genes *copTMA* (también conocidos como *copRTA* y llamados así de ahora en adelante) participan de la resistencia a cobre de *S. solfataricus* (Ettema y col., 2006). Adicionalmente, se cree que los poliP podrían ser un sistema alternativo de resistencia a cobre en este microorganismo. Para determinar si existe una relación entre los poliP y *copRTA*, decidimos medir los niveles de estos genes mediante PCR en tiempo real. Sin embargo, sólo fue posible diseñar primarios adecuados para el gen *copA*, por lo que fue el único gen que se analizó.

Para estudiar cómo se comporta la expresión de *copA* en carencia de poliP y presencia de cobre, se crecieron las cepas de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-) y *S. solfataricus* M16 (poliP+) hasta alcanzar el inicio de la fase exponencial de crecimiento (0,3 DO₆₀₀), en la cual se suplementó el medio con 0,2 % de D-arabinosa y luego de 3 h de inducción se agregó CuSO₄ 1 mM. Posteriormente, se extrajo el ARN a los 0, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 min luego de agregar CuSO₄ 1 mM, para hacer un estudio en el tiempo de los niveles de transcrito de *copA* en respuesta a cobre, en células carentes de poliP. Como condición control, se usaron las cepas *S. solfataricus* M16-PPX y *S. solfataricus* M16 crecidas en las mismas condiciones de cultivo que nuestra condición experimental, pero sin agregar CuSO₄. Como gen de referencia se utilizó *rps2P*.

Nuestros resultados mostraron que *copA*, aumenta sus niveles de transcrito cuando las células de *S. solfataricus* son expuestas a cobre y que luego de alcanzar un nivel máximo de transcrito, éstos disminuyen (Fig. 4). Este comportamiento se observó tanto en presencia, como en carencia de poliP. Sin embargo, a los 20 min los niveles de transcrito de *copA* fueron significativamente superiores ($p < 0.001$) en la condición poliP- en comparación con la condición poliP+. De esta forma, tenemos que los niveles máximos de *copA* se alcanzaron a los 20 min en la condición poliP-, mientras que en la condición poliP+ se alcanzaron 30 min luego de agregar el cobre.

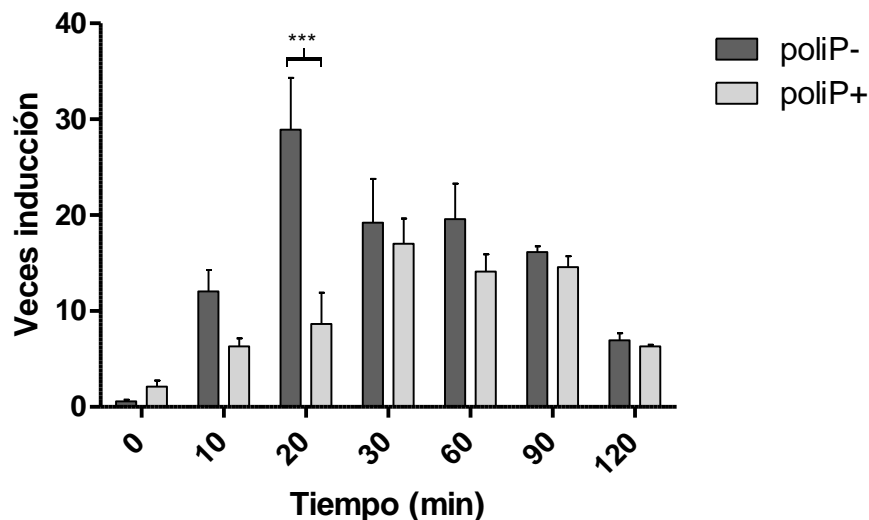


Figura 4. Niveles de de *copA* medidos mediante PCR en tiempo real. Las barras de error representan el error estándar de la media (SEM). Los asteriscos indican $p < 0,001$.

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

Teniendo en cuenta antecedentes que muestran la mayor sensibilidad de las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX carentes de poliP frente a la exposición al cobre (Orell, 2010), se decidió realizar 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 (poliP+). Estas células se crecieron hasta alcanzar el inicio de la fase exponencial de crecimiento ($0,3 DO_{600}$), en la cual se suplementó el medio con 0,2 % de D-arabinosa y se dio un tiempo de 24 h de inducción, luego del cual se prepararon los extractos proteicos (ver sección 2.5.1). De esta forma, se analizaron comparativamente los cambios observados mediante ICPL.

ICPL es una técnica cuantitativa que permite analizar diferencialmente mezclas complejas de proteínas (como los extractos totales de proteínas) combinando diversas técnicas como lo muestra la Figura 5. En términos generales, las etapas de esta técnica consisten en reducir y alquilar las proteínas provenientes de dos condiciones experimentales distintas; marcarlas diferencialmente con etiquetas que contienen un isótopo liviano (C^{12}) y un isótopo pesado (C^{13}) respectivamente; combinar las muestras proteicas marcadas y separarlas mediante electroforesis; digerir mediante proteasas y finalmente identificar y cuantificar los péptidos obtenidos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de ionización por electrospray y trampa de iones (LC ESI IT-MS).

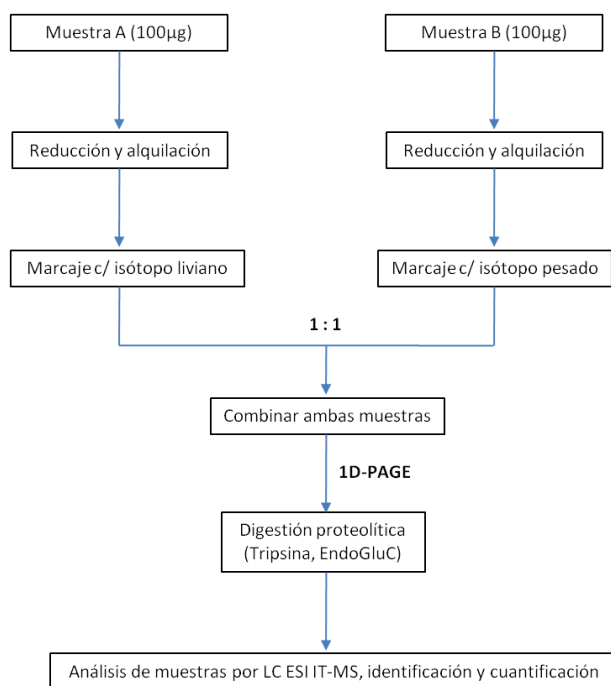


Figura 5. Esquema de la técnica ICPL

Como muestra la Tabla 1 se observaron proteínas que aumentan o disminuyen sus niveles en las células poliP– (M16-PPX) comparadas con las células control poliP+ (M16 no transformada). En resumen, se encontraron 52 proteínas que experimentaron cambios en sus niveles producto de la carencia de poliP (28 aumentos y 24 disminuciones). En este estudio se consideraron las proteínas cuyo \log_2 del factor de cambio (poliP-/poliP+)- mediana fue superior a 0,64 o inferior a -0,69 y de las cuales

se identificaron al menos 2 péptidos. El criterio utilizado para la selección de los rangos de corte se determinó por un análisis en el cual se graficó la razón $\log_2(\text{poliP-}/\text{poliP+})$ -mediana versus el número de proteínas identificadas. Los resultados de este análisis mostraron que a partir de los valores 0,64 y -0,69 se observaba una desviación (punto de inflexión) de los datos respecto al eje central en donde se agruparon la mayoría de las proteínas (Fig. 6).

Tabla 1. Resumen resultados condición poliP-/poliP+

Péptidos encontrados	4934
Péptidos cuantificados	2452
Proteínas identificadas	380
Proteínas que experimentaron cambios significativos	52
Proteínas que aumentaron sus niveles	28
Proteínas que disminuyeron sus niveles	24

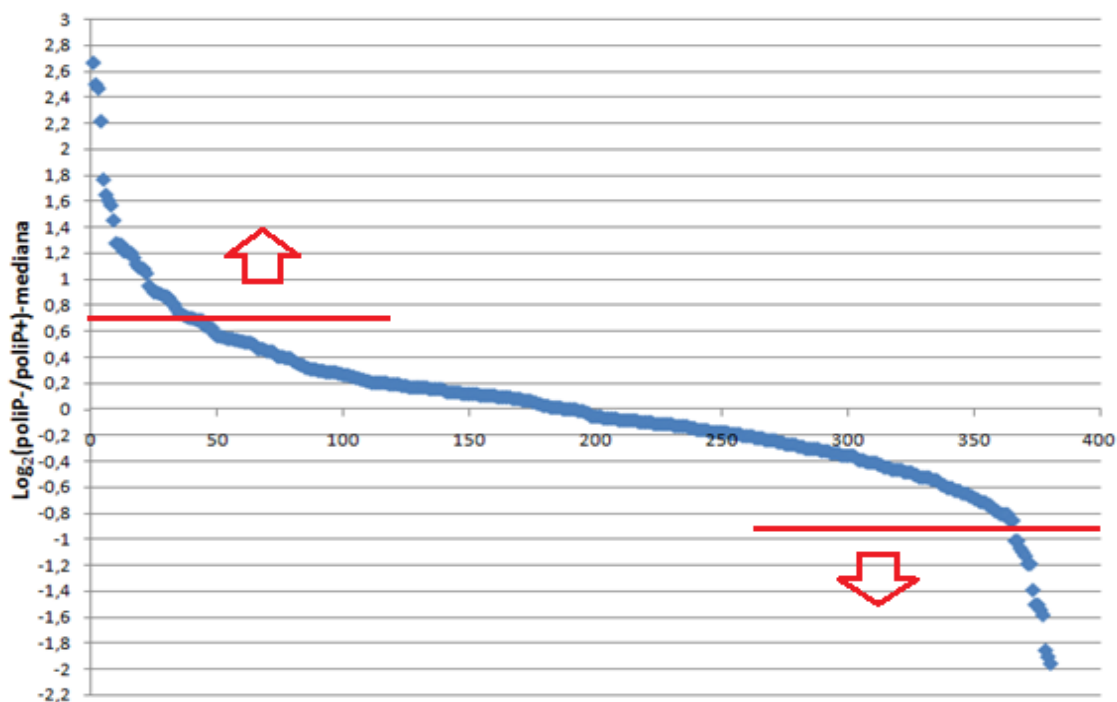


Figura 6. Representación gráfica del $\log_2(\text{poliP-}/\text{poliP+})$ - mediana versus número de proteínas. Los puntos de inflexión de la curva (indicados con la línea roja), se utilizaron como rango de corte para determinar aquellas proteínas que cambiaron sus niveles en carencia de poliP.

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, usando la clasificación entregada por la base de datos COG (Clusters of Orthologous Groups) (Tablas 2 y 3). Aquellas proteínas cuyos ORFs no tenían un COG asociado se clasificaron utilizando la herramienta informática COGnitor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/old/xognitora.html>), que permite asignar un COG, en base a la secuencia aminoacídica de una proteína.

En términos generales se observó que el proceso celular más afectado por la carencia de poliP es el metabolismo, pues considerando tanto aumentos como disminuciones en los niveles de proteínas, un 61% de los cambios se asociaron a esta categoría funcional. La siguiente categoría funcional más representada fue procesamiento y almacenaje de la información (13%) y finalmente procesos celulares y de señalización (5%). Además de esto, hubo un grupo de proteínas cuya función se desconoce. Dentro de esta categoría encontramos un 21% de las proteínas (Fig. 7A).

Un desglose de las categorías funcionales ya mencionadas nos permitió establecer que dentro del metabolismo, las funciones que experimentaron mayor cantidad de cambios fueron conversión y producción de energía, junto con metabolismo y transporte de aminoácidos. Las proteínas que experimentaron cambios (aumentos o disminuciones) en sus niveles dentro de las categorías ya mencionadas representan un 17,5% y un 12,3% respectivamente.

Las proteínas que experimentaron cambios en sus niveles y están relacionadas con el metabolismo de carbohidratos representan un 10,5%, las que están relacionadas con el metabolismo de coenzimas un 8,8% y con el metabolismo de lípidos un 7%. El resto de las categorías funcionales dentro del metabolismo, experimentaron cambios que representan sólo 1,8% de los cambios totales. Finalmente, dentro de la categoría funcional procesamiento y almacenaje de la información, vimos que proteínas involucradas con la transcripción experimentaron cambios que representan un 10,5% de los cambios totales. (Fig. 7B).

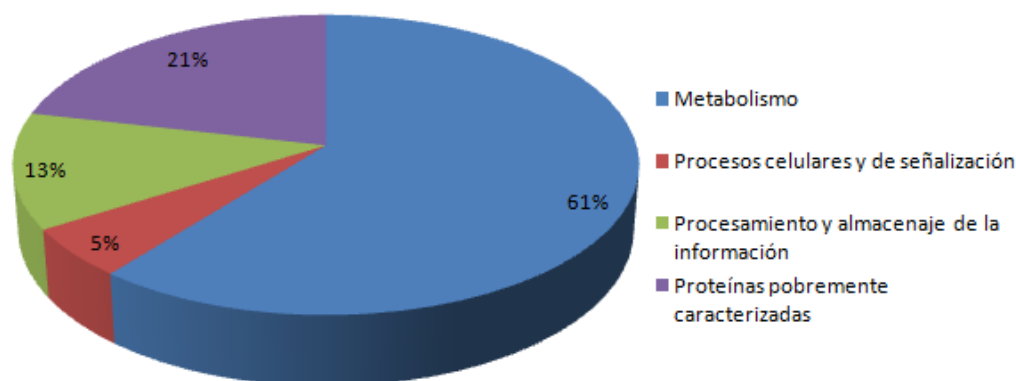
Categoría Funcional	Anotación	Locus	#q-Pept.	Log.(poliP-/poliP+) - mediana
Metabolismo				
Metabolismo y transporte de lípidos	Acil-CoA deshidrogenasa (Acid-like1) Acetil-CoA c-acetiltransferasa (AcaB6)	SSO1156 SSO2508	2 4	2,50 0,87
Metabolismo y transporte de coenzimas	Probable cobalto-pircorrina-6 Y C(15)-metiltransferasa Geranilgeranil pirofosfato sintasa D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA-1) Acetolactato sintasa homóloga, subunidad grande (IlvB6)	SSO2303 SSO0061 SSO0905 SSO3210	1 2 5 4	1,77 1,28 0,90 0,64
Metabolismo y transporte de aminoácidos	Serina-piruvato aminotransferasa (AgxT) N-metil hidantoimasa A (HyuA-3) N-metil hidantoimasa A (HyuA-2) Acetolactato sintasa homóloga, subunidad grande (IlvB6)	SSO2597 SSO2936 SSO2008 SSO3210	3 2 2 4	1,46 1,22 1,22 0,64
Metabolismo y transporte de carbohidratos	Alfa amilasa	SSO0988	1	1,08
Conversión y producción de energía	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena corta (CutC-1) Monóxido de carbono deshidrogenasa, Cadena larga (CutA-2) NADH deshidrogenasa, subunidad D (NuoD) D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA-1) Flavoproteína, subunidad alfa y beta (EtfABf1xAB)	SSO2433 SSO2091 SSO0324 SSO0905 SSO2817	5 2 3 5 8	1,27 1,09 1,05 0,90 0,74
Metabolismo y transporte de nucleótidos	Fosforibosilformilglicinamida sintasa 2	SSO0629	4	0,89
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Exopolifosfatasa	SSO1193	4	1,27
Procesos celulares y de señalización				
Modificaciones postraduccionales,	Peroxiredoxina (Ecp-4)	SSO2613	46	1,61
Intercambio proteico y chaperonas moleculares	Peroxiredoxina probable	SSO2121	12	0,74
Procesamiento y almacenamiento de la información				
Transcripción	Proteína de unión a DNA/RNA Alba 2 Factor de iniciación transcripcional IIB 1 Proteína de unión a DNA/RNA Alba 1 Factor de terminación transcripcional nusA, putativo (NusA) Riboproteína nuclear pequeña (SnRNP-1) Proteína de unión a cromatina Cren7	SSO6877 SSO0446 SSO0962 SSO0220 SSO5410 SSO6901	5 2 5 2 5 24	2,22 1,57 1,17 1,09 0,70 1,65
Dinámica y estructura de la cromatina				
Proteínas pobremente caracterizadas				
Función desconocida	Proteína hipotética Proteína hipotética Proteína hipotética Proteína hipotética 30S proteína ribosomal S28e	SSO10788 SSO5343 SSO0241 SSO3205 SSO5479	3 2 7 1 1	1,21 0,95 0,90 0,86 0,77

Tabla 2. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en las células recombinantes de *S. solfataricus* M16- PPX carentes de poliP. (Locus), indica el ORF de los genes que codifican las proteínas de la tabla; (#q-Pept.), indica el número de péptidos usados para la cuantificación.

Categoría funcional	Anotación	Locus	# q-Pept.	Log ₂ (poliP-/poliP+)- mediana
Metabolismo				
Metabolismo y transporte de lípidos	Acetil-CoA C-acetiltransferasa (AcaB-3)	SSO2062	2	-0,76
	Acetil-CoA C-acetiltransferasa (AcaB-4)	SSO2377	2	-0,81
Metabolismo y transporte de coenzimas	CoA-ligasa, putativa	SSO2627	1	-1,58
Metabolismo y transporte de aminoácidos	Agmatinasa (SpeB-2)	SSO2732	1	-1,07
	Transportador de maltosa ABC	SSO3053	5	-1,19
	N-acetil-gamma-aminoadipil-fosfato reductasa	SSO0155	2	-1,19
Metabolismo y transporte de carbohidratos	Alfa-glucosidasa	SSO3051	4	-0,69
	Transportador de arabinosa ABC	SSO3066	3	-0,86
	Proteína de biosíntesis de sulfolípidos (SqdB)	SSO2583	1	-1,10
	Fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA-1)	SSO0883	2	-1,13
	Ribose 5-fosfato isomerasa (RpiA)	SSO0978	1	-1,96
Conversión y producción de energía	Zn-deshidrogenasa alcohólica (Adh-2)	SSO0764	13	-0,71
	Isopentenil-difosfato delta-isomerasa	SSO0063	2	-0,78
	Zn-deshidrogenasa alcohólica (Adh-5)	SSO1646	1	-0,81
	Malato sintasa, putativa (AceB/mas)	SSO1334	4	-1,01
	Fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA-1)	SSO0883	2	-1,13
	Transportador de maltosa ABC	SSO3053	5	-1,19
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos				
Catabolismo, transporte y biosíntesis de metabolitos secundarios	Maleato cis-trans isomerasa, probable (MaiA)	SSO2939	2	-0,86
Procesos celulares y de señalización				
Pared celular y membrana	Proteína de biosíntesis de sulfolípidos (SqdB)	SSO2583	1	-1,10
Procesamiento y almacenamiento de la información				
Transcripción	ARN polimerasa, subunidad A'	SSO0225	9	-0,81
Proteínas pobremente caracterizadas				
Función desconocida	Proteína hipotética	SSO3118	4	-0,69
	Proteína hipotética	SSO1126	6	-0,81
	Proteína hipotética	SSO0235	2	-1,01
	Proteína hipotética	SSO3029	4	-1,39
	Proteína hipotética	SSO0172	2	-1,50
	Proteína hipotética	SSO1401	2	-1,50
	Proteína hipotética	SSO2373	3	-1,54

Tabla 3. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células recombinantes de *S. solfataricus* M16-PPX carentes de poliP. (Locus), indica el ORF de los genes que codifican las proteínas de la tabla; (#q-Pept.), indica el número de péptidos usados para la cuantificación.

A



B

	Categoría Funcional	N° de proteínas	%
Metabolismo	Metabolismo y transporte de lípidos	4	7,0
	Metabolismo y transporte de coenzimas	5	8,8
	Metabolismo y transporte de aminoácidos	7	12,3
	Metabolismo y transporte de carbohidratos	6	10,5
	Conversión y producción de energía	10	17,5
	Metabolismo y transporte de nucleótidos	1	1,8
	Catabolismo, transporte y biosíntesis de metabolitos secundarios	1	1,8
	Metabolismo y transporte de iones inorg.	1	1,8
Procesos celulares y de señalización	Modificaciones postraduccionales, recambio proteico y chaperonas moleculares	2	3,5
	Pared celular y membrana	1	1,8
Procesamiento y almacenaje de la información	Transcripción	6	10,5
	Dinámica y estructura de la cromatina	1	1,8
Proteínas pobremente caracterizadas	Función desconocida	12	21,1

Figura 7. Análisis global de las proteínas de *S. solfataricus* que experimentaron cambios en carencia de poliP. A, distribución de las proteínas según categorías funcionales. B, desglose del porcentaje de distribución.

Entre las proteínas que aumentaron sus niveles en las células poliP– encontramos la exopolifosfatasa (PPX), lo cual confirma que la inducción de esta proteína fue efectiva y por lo tanto, nuestro modelo de estudio es funcional.

Respecto a las proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos, podemos decir que la carencia de poliP produciría un aumento en la biosíntesis de algunos aminoácidos. Enzimas como la D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa y la serina-piruvato aminotransferasa dan cuenta de un aumento de la biosíntesis de serina, glicina y treonina, mientras la acetolactato sintasa está directamente relacionada con la biosíntesis de leucina, isoleucina y valina.

Por otro lado, dentro de las proteínas que están involucradas con el metabolismo energético vimos un aumento de la acil-CoA deshidrogenasa, enzima que interviene en la primera de las cuatro reacciones que constituyen la β -oxidación de los ácidos grasos. Este proceso tiene como consecuencia un aumento en los niveles de acetil-CoA, molécula que puede ingresar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA). Adicionalmente, observamos un aumento en los niveles de la α -amilasa, la cual participa en la degradación del glicógeno y el aumento de la subunidad D de la NADH deshidrogenasa (NuoD), complejo multienzimático que cataliza la transferencia de electrones del NADH a la coenzima Q en la cadena respiratoria.

Finalmente, observamos que también aumentaron sus niveles proteínas relacionadas con procesos de detoxificación y estrés celular. Es el caso de la peroxiredoxina (Bcp-4) y la peroxiredoxina probable (Bcp-2), enzimas involucradas en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y la protección del ADN cromosómico frente a posibles daños producto del estrés oxidativo.

Dentro del metabolismo energético, disminuyó sus niveles en las células poliP- la malato sintasa, enzima que participa en el ciclo del ácido glioxílico, catalizando de manera reversible la síntesis de malato a partir de acetil-CoA y glioxilato. Una disminución en los niveles de esta enzima, reduciría el consumo de acetil-CoA por parte del ciclo del ácido glioxílico, quedando disponible para que se integre al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Además, también encontramos una disminución en los niveles de la fosfoenolpiruvato sintasa y la ribosa-5-fosfato isomerasa. La primera es una enzima involucrada en la gluconeogénesis que cataliza la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato y la segunda, una enzima que participa en la vía de las pentosas fosfato.

Respecto a las funciones de transporte, observamos una disminución en los niveles de dos transportadores, uno para arabinosa y otro para maltosa. Ambos transportadores son del tipo ABC por lo que consumen ATP al ejecutar su función. La disminución del transporte de maltosa al medio intracelular podría ser la razón por la cual también observamos una disminución de la α -glucosidasa, enzima que hidroliza la maltosa. La relación que podría existir entre la disminución de este tipo de transportador y la carencia de poliP se discute en la sección 4.3.1.

3.3 Cambios en el proteoma total de las células de *S. solfataricus* M16 (poliP+) en presencia de cobre

Para establecer el efecto que tiene la carencia de poliP sobre la resistencia a cobre, decidimos primeramente estudiar los cambios que genera este metal, por sí solo, sobre el proteoma total de *S. solfataricus*. De esta forma, se creció la cepa *S. solfataricus* M16 (no transformada) hasta alcanzar el inicio de la fase exponencial de crecimiento (0,3 DO₆₀₀), en la cual se suplementó el medio con 0,2 % de D-arabinosa y luego de 3 horas se agregó CuSO₄ 1 mM. Luego de 24 h se prepararon los extractos proteicos (ver sección 2.5) y se realizaron los estudios de proteómica mediante ICPL.

Como muestra la Tabla 4, encontramos 50 proteínas que experimentaron cambios en sus niveles producto de la presencia de cobre en el medio de cultivo (30 aumentos y 18 disminuciones). En este estudio se consideraron las proteínas cuyo log₂ del factor de cambio (poliP+ Cu/polip+)- mediana fue superior a 0,5 o inferior a -0,55 y de las cuales se identificaron al menos 2 péptidos. Estos rangos de corte, se determinaron según lo descrito en la sección 3.2.

Para la mejor comprensión y análisis de los cambios observados, las proteínas que cambiaron sus niveles se agruparon según sus categorías funcionales (Tablas 5 y 6).

Al igual que en células de *S. solfataricus* carentes de poliP, la categoría funcional que más cambios experimentó fue el metabolismo, ya que un 44% de las proteínas que aumentaron o disminuyeron sus niveles en la condición poliP+/Cu están

involucradas con esta función celular. Respecto a las proteínas involucradas en el procesamiento y almacenaje de la información, un 23% de las proteínas que cambiaron sus niveles están asociadas a esta función. Finalmente, es porcentaje de proteínas de función desconocida que experimento aumentos o disminuciones fue 23% respecto al total de proteínas que experimentaron cambios en esta condición de estudio (Fig. 8 A).

Péptidos encontrados	3737
Péptidos cuantificados	1885
Proteínas identificadas	374
Proteínas que experimentaron cambios significativos	48
Proteínas que aumentaron sus niveles	30
Proteínas que disminuyeron sus niveles	18

Un desglose de las categorías funcionales nos permitió establecer que dentro del metabolismo, la función que experimentó mayor cantidad de cambios fue el metabolismo y transporte de aminoácidos (15,4%). Además, dentro de la categoría funcional procesamiento y almacenaje de la información la función traducción, estructura ribosomal y biogénesis representa un 15,4% de los cambios, situación que no observamos en la condición poliP- (Fig. 8 B).

Entre las proteínas que aumentaron sus niveles en presencia de cobre, destacan aquellas involucradas en la degradación de péptidos. Tal es el caso de la acilaminoacil-peptidasa (isoformas ApeH-1 y ApeH-3) y de la proteasa tricorn. La acilaminoacil-peptidasa es una enzima que pertenece a la familia de las propiloligopeptidasas (POP). Fue cristalizada desde el arqueón *Aeropyrum pernix* (Bartlam y col., 2004) y cataliza la remoción de un aminoácido N-acetilado desde un péptido pequeño (Tsunasawa y col., 1975). En mamíferos, esta enzima y el proteosoma actúan de forma coordinada para eliminar proteínas desnaturadas que podrían resultar citotóxicas (Fujino y col., 2000; Shimizu y col., 2004).

Categoría funcional	Anotación	Locus	# q-Pept.	Log ₂ (poliP+Cu/poliP+) - mediana
Metabolismo				
Metabolismo y transporte de coenzimas	Acetilactato sintasa, subunidad grande (IivB-1)	SSO0170	1	1,83
	Precorrina isomerasa, putativa (CbiC)	SSO2308	2	1,55
Metabolismo y transporte de aminoácidos	Acetilactato sintasa, subunidad grande (IivB-1)	SSO0170	1	1,83
	Acilaminoacil-peptidasa, putativa (ApeH-3)	SSO2693	2	0,82
	Glutamato deshidrogenasa 2	SSO1907	46	0,62
	Transportador de prolina/betaina, putativo	SSO2852	2	0,60
	Glutamato deshidrogenasa NAD específica (GdhA-4)	SSO2044	52	0,55
	Transportador de dipéptidos ABC (DppA)	SSO2619	2	0,55
	Acilaminoacil-peptidasa, putativa (ApeH-1)	SSO1419	8	0,54
Metabolismo y transporte de carbohidratos	Transportador de prolina/betaina, putativo	SSO2852	2	0,60
	Aldolasa no caracterizada SSO3226	SSO3226	5	0,51
Conversión y producción de energía	Malato sintasa, putativa (AceB/mas)	SSO1334	5	1,10
	Ferredoxina (Zfx-1)	SSO2574	4	0,71
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Tiosulfato sulfurtransferasa (CysA-2)	SSO1817	8	1,42
	Transportador de prolina/betaina, putativo	SSO2852	2	0,60
	Transportador de dipéptidos ABC (DppA)	SSO2619	2	0,55
Procesos celulares y de señalización				
Modificaciones Postraduccionales, recambio proteico y chaperonas moleculares	Tioredoxina reductasa (TrxB-3)	SSO2416	2	1,03
	Peroxiredoxina probable	SSO2121	8	0,59
Pared celular y membrana	Proteasa tricorn homóloga	SSO2098	2	3,62
	Nucleotidil azúcar fosfato transferasa	SSO0989	4	0,77
Procesamiento y almacenamiento de la información				
Transcripción	Regulador transcripcional, putativo	SSO1101	6	1,39
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Posible exosoma, complejo exonucleasa 2	SSO0732	2	1,74
	50S proteína ribosomal L15e	SSO0742	5	1,05
	Nucleotidil azúcar fosfato transferasa	SSO0989	4	0,77
	50S proteína ribosomal L24P	SSO0707	7	0,55
	30S proteína ribosomal S12P	SSO0219	6	0,55
	Endonucleasa IV	SSO2156	3	0,89
Proteínas pobremente caracterizadas				
Función desconocida	Factor de procesamiento del extremo 3' ARNm, putativo	SSO0761	4	1,29
	Proteína hipotética	SSO1641	1	3,11
	Proteína hipotética	SSO1586	1	0,84
	Proteína hipotética	SSO7239	2	0,74
	Proteína hipotética	SSO0582	2	0,72
	Proteína hipotética	SSO10285	7	0,69
	Proteína hipotética	SSO10788	3	0,56

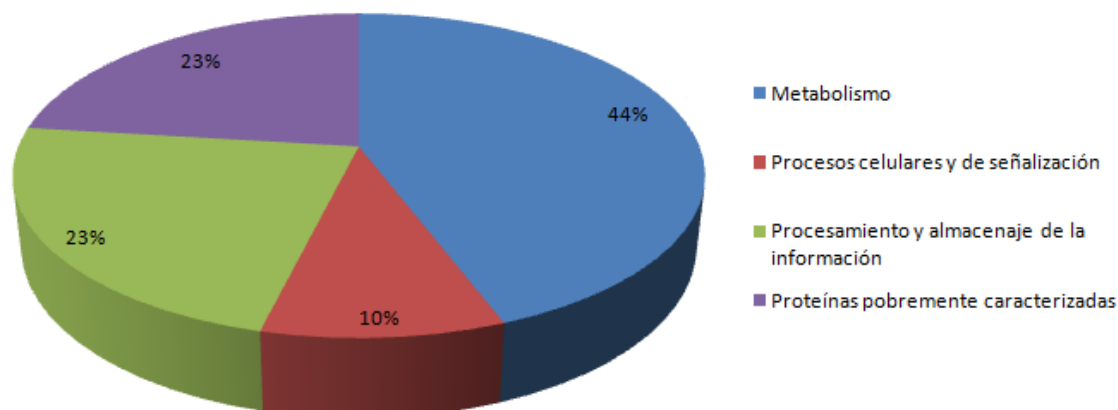
Tabla 5. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en las células de *S. solfataricus* M16 (poliP+) en presencia de cobre. (Locus), indica el ORF de los genes que codifican las proteínas de la tabla; ;(#q-Pept.), indica el número de péptidos usados para la

Categoría funcional	Anotación	Locus	# q-Pept.	Log ₂ (poliP+Cu/poliP+) - mediana
Metabolismo				
Metabolismo y transporte de lípidos	Acetil-CoA sintetasa (Acetato-CoA ligasa) (AcsA-6)	SSO2059	4	-1,42
	Acetil-CoA c-acetiltransferasa (AcaB-7)	SSO2625	1	-1,69
Metabolismo y transporte de coenzimas	Piridoxal biosíntesis liasa pdxS	SSO0570	1	-1,85
Metabolismo y transporte de aminoácidos	3-isopropilmalato deshidratasa, subunidad grande	SSO2471	1	-0,66
Metabolismo y transporte de Carbohidratos	Fosfoglicerato quinasa	SSO0527	1	-1,69
Conversión y producción de energía	Isocitrato liasa (AceA/icl)	SSO1333	2	-1,62
Catabolismo, transporte y biosíntesis de metabolitos secundarios	2-hidroxihepta-2,4-dieno-1,7-dioato isomerasa (HpcE-2)	SSO2773	1	-1,66
Procesos celulares y de señalización				
Modificaciones Postraduccionales, chaperonas moleculares	Proteína de shock térmico pequeña, familia hsp20	SSO2427	5	-0,73
Procesamiento y almacenamiento de la información				
Transcripción	Proteína de unión a DNA/RNA Alba 2	SSO6877	4	-0,67
Dinámica y estructura de la cromatina	Proteína de unión a cromatina Cren7	SSO6901	5	-0,93
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	Arginil-tARN sintetasa	SSO0857	2	-0,77
	50S proteína ribosomal LX	SSO5668	2	-0,79
	Factor de inicio de la traducción 2, subunidad alfa	SSO1050	1	-0,91
Proteínas pobremente caracterizadas				
Función desconocida	Proteína hipotética	SSO2254	2	-0,75
	Proteína hipotética	SSO1098	3	-0,83
	Proteína hipotética	SSO1126	2	-1,07
	Proteína hipotética	SSO1325	1	-1,85
	Proteína hipotética	SSO2085	1	-1,85

Tabla 6. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células de *S. solfataricus* M16 (poliP+) en presencia de cobre. (Locus), indica el ORF de los genes que codifican las proteínas de la tabla; (: #q-Pept.), indica el número de péptidos usados para la cuantificación.

Por otro lado, tricorn es una proteasa, descrita en el arqueón *Thermoplasma acidophilum* que degrada oligopéptidos generados por el proteosoma o por otras proteasas dependientes de ATP (Tamura y col., 1998).

A



B

	Categoría Funcional	N° de proteínas	%
Metabolismo	Metabolismo y transporte de lípidos	2	3,8
	Metabolismo y transporte de coenzimas	3	5,8
	Metabolismo y transporte de aminoácidos	8	15,4
	Metabolismo y transporte de carbohidratos	3	5,8
	Conversión y producción de energía	3	5,8
	Catabolismo, transporte y biosíntesis de metabolitos secundarios	1	1,9
	Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	3	5,8
Procesos celulares y de señalización	Modificaciones postraduccionales, recambio proteico y chaperonas moleculares	3	5,8
	Pared celular y membrana	2	3,8
Procesamiento y almacenaje de la información	Transcripción	2	3,8
	Dinámica y estructura de la cromatina	1	1,9
	Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	8	15,4
	Replicación, recombinación y reparación	1	1,9
Proteínas pobremente caracterizadas	Función desconocida	12	23,1

Figura 8. Análisis global de las proteínas de *S. solfataricus* que experimentaron cambios en la condición poliP+ en presencia de cobre. A, distribución de las proteínas según categorías funcionales. B, desglose del porcentaje de distribución.

En nuestros estudios, también fue posible identificar proteínas involucradas en el metabolismo de aminoácidos. Entre ellas encontramos la glutamato deshidrogenasa (GdhA-2,-4), que cataliza la desaminación oxidativa del glutamato para generar 2-oxoglutarato, un intermediario clave del ciclo del TCA (Consalvi y col., 1991). A esto se suma el aumento de los niveles de dos transportadores: un transportador de prolina/betaína y un transportador de dipéptidos, lo cual sugiere una mayor demanda de aminoácidos frente a una situación de estrés por cobre.

Adicionalmente, también aumentaron los niveles de tioredoxina reductasa (SsTrx-B3) y de peroxiredoxina (Bcp-2). La tioredoxina reductasa es parte del sistema tiorredoxina, compuesto por tiorredoxina, tiorredoxina reductasa y NADPH. Este sistema está presente en arqueas, bacterias y eucariotas y juega un papel primordial en mantener el equilibrio redox de la célula y protegerla del estrés oxidativo (Mustacich y Powis, 2000; Williams y col., 2001). La peroxiredoxina, como se discute en la sección 4.3.3, también participa en la respuesta celular al estrés oxidativo.

En relación al metabolismo energético, en nuestros experimentos de proteómica vimos el aumento de los niveles de la ferredoxina y la malato sintasa. Adicionalmente, vimos que dentro de la categoría funcional procesamiento y almacenamiento de la información aumentaron los niveles de una proteína tipo endonucleasa IV. Por otro lado, dentro las proteínas que disminuyeron sus niveles encontramos algunas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y energético, como la fosfoglicerato quinasa y la isocitrato liasa. Finalmente, también disminuyeron sus niveles la arginil-tRNA sintetasa, el factor de iniciación 2 y una proteína pequeña de la familia Hsp20.

3.4 Cambios en el proteoma total de las células de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-) en presencia de cobre

Para establecer el efecto que tiene la carencia de poliP sobre la resistencia a cobre se creció la cepa *S. solfataricus* M16-PPX hasta alcanzar el inicio de la fase exponencial de crecimiento (0,3 DO₆₀₀), en la cual se suplementó el medio con 0,2 % de D-arabinosa y luego de 3 h de inducción se agregó CuSO₄ 1 mM.

Posteriormente, se prepararon los extractos proteicos tras 24 h de agregar CuSO_4 (ver sección 2.4) y se realizaron los estudios de proteómica mediante ICPL.

Como muestra la Tabla 7 se observaron proteínas que aumentan o disminuyen sus niveles en las células poliP- (M16-PPX), expuestas a una concentración de CuSO_4 1 mM, comparadas con las células control poliP- no expuestas a cobre. e encontraron 73 proteínas que experimentaron cambios en sus niveles producto de la carencia de poliP y la presencia de cobre en el medio de cultivo (40 aumentos y 33 disminuciones). En este estudio se consideraron las proteínas cuyo \log_2 del factor de cambio (poliP-Cu/poliP-) mediana fue superior a 0,61 o inferior a -0,72 y de las cuales se identificaron al menos 2 péptidos. Las Tablas 5 y 6 muestran las proteínas que aumentaron y disminuyeron sus niveles respectivamente.

Péptidos encontrados	4440
Péptidos cuantificados	2293
Proteínas identificadas	432
Proteínas que experimentaron cambios significativos	73
Proteínas que aumentaron sus niveles	40
Proteínas que disminuyeron sus niveles	33

Al medir el efecto de la exposición a cobre en células carentes de poliP, la categoría funcional que agrupa la mayor cantidad de proteínas que experimentó cambios fue el metabolismo (47%), cuyo porcentaje se acerca bastante a lo ocurrido en la condición poliP+/Cu (44%). Esta similitud también se observó en la categoría funcional procesamiento y almacenaje de la información, que representa un 29% de los cambios, lo que se acerca bastante al 23% de proteínas que experimentaron cambios en la condición poliP+/Cu. Sin embargo, a pesar que los porcentajes son parecidos, el número de proteínas involucradas es considerablemente mayor en la condición poliP-/Cu, comparada con la condición poliP+/Cu. Además de esto, el porcentaje de proteínas de función desconocida que experimentó aumentos o disminuciones se mantuvo cercano al 20% (Fig. 9A).

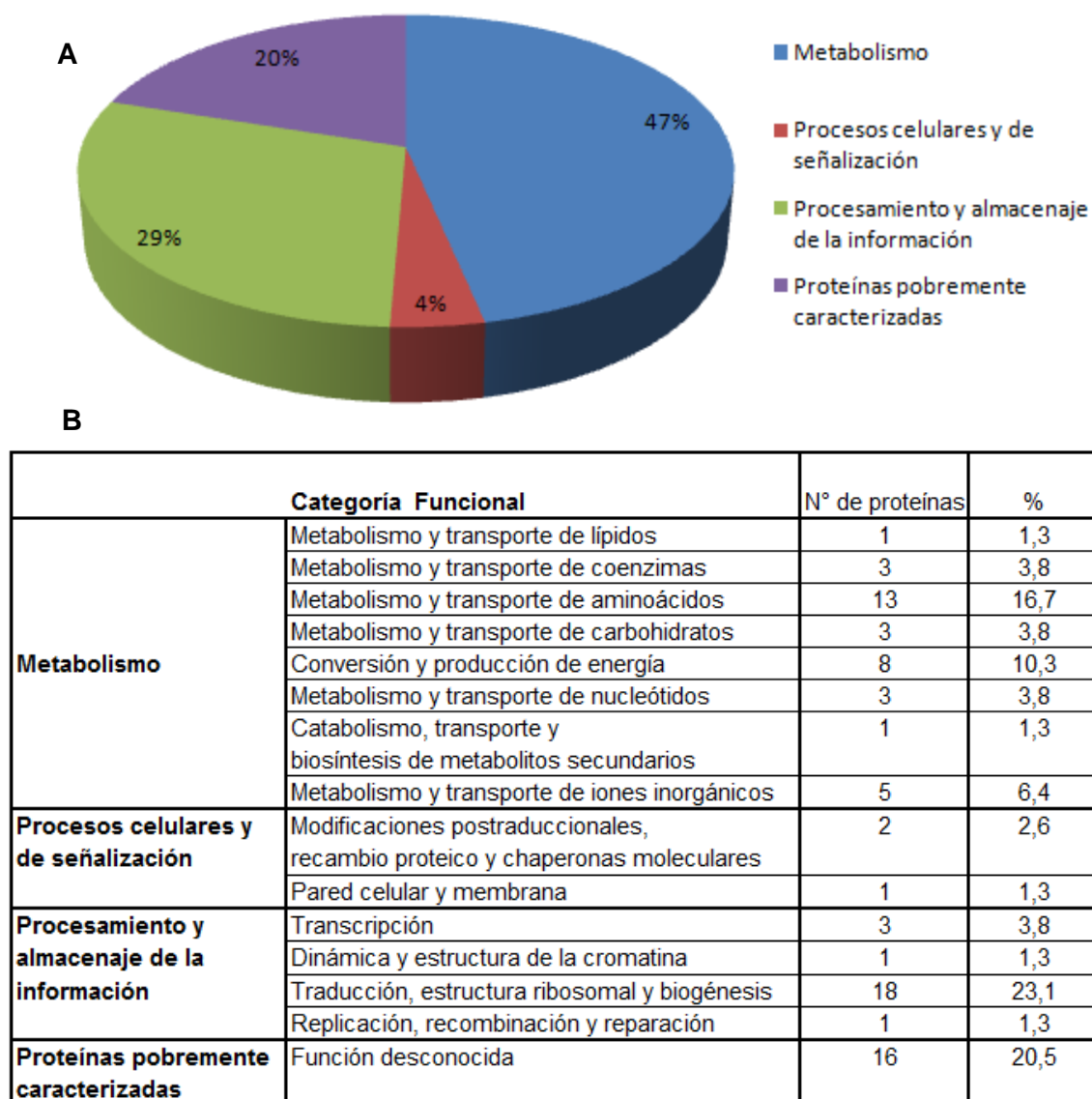


Figura 9. Análisis global de las proteínas de *S. solfataricus* que experimentaron cambios en la condición poliP- en presencia de cobre. A, porcentaje de distribución de las proteínas según categorías funcionales. B, desglose del porcentaje de distribución.

Nuestros resultados muestran que la función que experimentó mayor cantidad de cambios fue el metabolismo y transporte de aminoácidos (16,7%). Además, dentro de la categoría funcional “procesamiento y almacenaje de la información” la función traducción, estructura ribosomal y biogénesis agrupa un 23,1% de los cambios,

situación que representa el porcentaje más alto de cambios dentro de esta categoría en todas las condiciones estudiadas (Fig. 9B).

Además, la exposición a cobre en carencia de poliP, aumenta los niveles de la 6,7-dimetil-8-ribilumazina sintasa, enzima que participa de la biosíntesis de riboflavina, precursor de los cofactores FMN y FAD, los cuales se usan en una gran variedad de reacciones redox (Fischer y col., 2004).

En relación al metabolismo de aminoácidos, aumentaron los niveles de la homoserina deshidrogenasa, la cual cataliza la tercera etapa de transformación del aspartato a homoserina, molécula precursora de treonina, metionina y cisteína (White, 2003). Además, aumentaron los niveles de la PAPS reductasa y la sulfato adenililtransferasa. En *E.coli*, ambas enzimas participan de la reducción del azufre, transformando el sulfato en sulfito (Fig.10) (Sekowska y col., 2000). El sulfito es un metabolito importante en la biosíntesis de metionina y cisteína. La relación que puede existir entre estos aminoácidos y la resistencia a cobre se discutirá con mayor profundidad en la sección 4.5.3. Junto con estos cambios, también observamos el aumento en los niveles de una posible espermidina sintasa, enzima que participa en la síntesis de poliaminas; de un posible sistema H de fragmentación de glicina y de la metionina aminopeptidasa. Esta última remueve el aminoácido metionina del extremo N-terminal de péptidos y arilamidas.

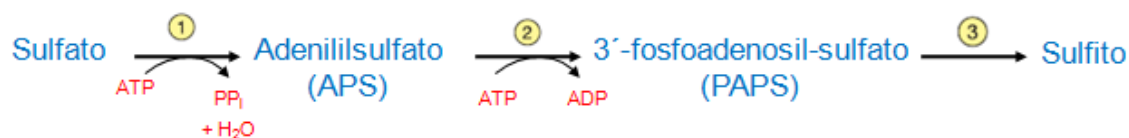


Figura 10. Reducción del sulfato a sulfito en *E.coli*. Enzimas: (1) Sulfato adenililtransferasa; (2) Adenililsulfato quinasa; (3) PAPS reductasa.

Categoría funcional	Anotación	Locus	# q-Pept.	Log ₂ (poliP-Cu/polip-) - mediana
Metabolismo				
Metabolismo y transporte de lípidos	Acetil-CoA C-acetiltransferasa (AcaB-4)	SSO2377	2	1,16
Metabolismo y transporte de coenzimas	6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintasa	SSO0400	1	1,63
	PAPS reductasa (CysH)	SSO2911	4	1,53
	Piridoxal biosíntesis liasa pdxS	SSO0570	3	1,17
Metabolismo y transporte de aminoácidos	Homoserina deshidrogenasa (Thra/hom)	SSO0657	2	3,74
	PAPS reductasa (CysH)	SSO2911	4	1,53
	Transportador de maltosa ABC	SSO3055	3	1,30
	Transportador de dipéptidos ABC	SSO2619	3	1,02
	Transportador de prolina/betaina, putativo	SSO2852	5	0,90
	Agmatinasa (SpeB-2)	SSO2732	4	0,73
	Posible espermidina sintasa	SSO0757	6	0,73
	Posible sistema H de fragmentación de glicina, proteína 2	SSO1061	2	0,72
	Glutamato deshidrogenasa NAD específica (GdhA-4)	SSO2044	48	0,61
Metabolismo y transporte de carbohidratos	Transportador de prolina/betaina, putativo	SSO2852	5	0,90
Conversión y producción de energía	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena mediana (CutB-2)	SSO2636	2	2,00
	Ferredoxina (Zfx-1)	SSO2574	4	1,30
	Quinol oxidasa (SoxABC), subunidad citocromo B (SoxC)	SSO2656	3	1,29
	Rieske proteína-1 hierro-sulfuro (SoxL-1)	SSO2660	2	0,65
	Pirfosfatasa inorgánica	SSO2390	10	0,61
Metabolismo y transporte de nucleótidos	Orotato fosforibosiltransferasa	SSO0615	1	1,63
	Trimidilato sintasa thyX	SSO0321	2	1,49
Catabolismo, transporte y biosíntesis de metabolitos secundarios	Delta-ácido aminolevulinico deshidratasa	SSO0181	2	1,10
Metabolismo y transporte de iones inorgánicos	Sulfato adeniltransferasa (Sat)	SSO2912	2	2,00
	Tiosulfato sulfotransferasa (CysA-2)	SSO1817	10	1,80
	Transportador de maltosa ABC	SSO3055	3	1,30
	Transportador de dipéptidos ABC	SSO2619	3	1,02
	Superóxido dismutasa [Fe]	SSO0316	8	0,94
Procesos celulares y de señalización				
Modificaciones Posttraduccionales, recambio proteico y chaperonas moleculares	Prefoldina, subunidad alfa	SSO0349	4	1,20
	Peroxiredoxina probable	SSO2121	13	1,00
	Proteasa Tricorn homóloga	SSO2098	2	0,98
Procesamiento y almacenaje de la información				
Transcripción	Regulador transcripcional, putativo	SSO1101	2	2,06
	ARN polimerasa, subunidad N	SSO5140	2	1,12
	Proteína de unión a DNA/RNA Alba 1	SSO0962	18	0,76
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	50S proteína ribosomal L40e	SSO5336	4	2,28
	Metionina aminopeptidasa	SSO0098	5	0,65
	50S proteína ribosomal L7Ae	SSO0091	7	0,67
	DNA topoisomerasa	SSO0907	6	0,77
Proteínas pobremente caracterizadas	Proteína hipotética	SSO0273	2	3,72
Función desconocida	Proteína hipotética	SSO0403	2	1,91
	Proteína hipotética	SSO2749	9	0,80
	Proteína hipotética	SSO0992	4	0,75
	Proteína hipotética	SSO2829	2	0,71
	Proteína hipotética	SSO7239	2	0,65

Tabla 8. Identificación de las proteínas que aumentaron sus niveles en las células de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-) en presencia de cobre. (Locus), indica el ORF de los genes que codifican las proteínas de la tabla; (#q-Pept.), indica el número de péptidos cuantificados.

Categoría funcional	Anotación	Locus	# q-Pept.	Log ₂ (poliP-Cu/poliP-) - mediana
Metabolismo				
Metabolismo y transporte de aminoácidos	Carbamoil-fosfato sintasa, cadena larga	SSO0641	1	-1,39
	N-metil hidantoïnasa A (HyuA-2)	SSO2008	1	-0,89
	Corismato mutasa (AroG)	SSO0304	2	-0,89
	Ácido- dihidroxideshidratasa	SSO3107	4	-0,79
Metabolismo y transporte de carbohidratos	Transcetolasa, sección C-terminal (Tkt-2)	SSO0299	2	-0,86
	Ácido- dihidroxideshidratasa	SSO3107	4	-0,79
Conversión y producción de energía	Zn-deshidrogenasa alcohólica (Adh-8)	SSO2494	4	-1,25
	Zn-deshidrogenasa alcohólica (Adh-2)	SSO0764	2	-1,39
	Isocitrato liasa (AceA/icl)	SSO1333	1	-0,89
Metabolismo y transporte de nucleótidos	Carbamoil-fosfato sintasa, cadena larga	SSO0641	1	-1,39
Procesamiento y almacenaje de la información				
Dinámica y estructura de la cromatina	Proteína de unión a cromatina Cren7	SSO6901	5	-0,89
Traducción, estructura ribosomal y biogénesis	50S proteína ribosomal L21e	SSO0752	4	-0,76
	50S proteína ribosomal L34e	SSO6374	3	-0,76
	50S proteína ribosomal L22P	SSO0713	7	-0,76
	30S proteína ribosomal S14P tipo Z	SSO6391	2	-0,76
	30S proteína ribosomal S17P	SSO0709	4	-0,86
	Alanil-tARN sintetasa	SSO0341	7	-0,86
	30S proteína ribosomal S8e	SSO0164	4	-0,89
	50S proteína ribosomal L12P	SSO0342	5	-0,96
	LSU proteína ribosomal S26E (Rps26E)	SSO6179	2	-0,96
	50S proteína ribosomal L30P	SSO0697	4	-1,04
	30S proteína ribosomal S8P	SSO0703	4	-1,12
	50S proteína ribosomal L6P	SSO0702	10	-1,12
	30S proteína ribosomal S27e	SSO7114	2	-1,16
	50S proteína ribosomal L14P	SSO0708	4	-1,16
	50S proteína ribosomal L37e	SSO6453	3	-1,25
Proteínas pobremente caracterizadas				
Función desconocida	Proteína hipotética	SSO1100	3	-0,79
	Proteína hipotética	SSO2509	3	-0,82
	Proteína hipotética	SSO5343	2	-0,89
	Proteína hipotética	SSO1126	4	-0,89
	Proteína hipotética	SSO1098	3	-1,00
	Proteína hipotética	SSO1109	2	-1,12
	Proteína hipotética	SSO2633	3	-1,16
	Proteína hipotética	SSO0191	1	-1,34
	Proteína hipotética	SSO2515	3	-1,66

Tabla 9. Identificación de las proteínas que disminuyeron sus niveles en las células de *S. solfataricus* M16-PPX (poliP-) en presencia de cobre. (Locus), indica el ORF de los genes que codifican las proteínas de la tabla; (#q-Pept.), indica el número de péptidos cuantificados.

Adicionalmente, aumentaron los niveles de dos proteínas involucradas en la cadena respiratoria. Estas son la subunidad citocromo b de la quinol oxidasa (SoxC) y la proteína-1 rieske hierro-azufre (SoxL). También aumentó sus niveles la superóxido dismutasa, enzima involucrada en la respuesta al estrés oxidativo, la subunidad alfa de la chaperona prefoldina y la ADN topoisomerasa, entre otras.

Finalmente, dentro de las proteínas que disminuyeron sus niveles encontramos la corismato mutasa, enzima que participa en la biosíntesis de corismato, que a su vez es precursor de los aminoácidos triptófano, fenilalanina y tirosina (Krappmann y col., 1999). La carbamoil-fosfosintasa, involucrada en la biosíntesis de arginina (Legrain y col., 1995) y la ácido-dihidroxideshidratasa, involucrada en la síntesis de isoleucina y valina (Kim y Lee, 2006). Se suman a este grupo una gran cantidad de proteínas ribosomales y la alanil-tARN sintetasa. Estos resultados en primera instancia resultan confusos, pues por un lado vemos favorecida la biosíntesis de aminoácidos como cisteína y metionina y por otro lado se observó que la biosíntesis de otros aminoácidos (ej: Arg, Ile, Trp) se ve inhibida. Una posible explicación de este fenómeno se discutirá con más profundidad en la sección 4.5.3.

4. DISCUSIÓN

4.1 Respuesta de *copA* frente al cobre en carencia de poliP

Como se mencionó en la introducción de esta memoria de título (sección 1.3), *copA* es parte de un grupo de genes que participan en la homeostasis de cobre (Ettema y col., 2006). Este grupo de genes (*copRTA*) codifica para tres proteínas: CopR, regulador transcripcional; CopT, metalochaperona de cobre; y CopA, transportador de cobre dependiente de ATP. Estudios en *S. solfataricus* muestran que en presencia de cobre se induce la co-transcripción de *copTA*. Sin embargo, también se encontró que este cotranscrito está presente en bajos niveles en células de *S. solfataricus* no expuestas a cobre. CopR en cambio, no ve afectados sus niveles de transcrito en presencia de cobre. Estos antecedentes indican que *copRTA* se transcriben basalmente en condiciones control (sin cobre) (Villafane y col., 2009). En cambio, en presencia de altas concentraciones de cobre, CopR aumenta la transcripción de *copTA* uniéndose a un promotor río arriba de estos genes y río abajo de *copR* (Villafane y col., 2011). Por lo tanto, es muy probable que la actividad de CopR esté regula de forma alostérica por el cobre.

Además de este sistema canónico de resistencia a cobre, se cree que los poliP podrían desempeñar un papel importante en la destoxicación de este metal. Estudios realizados en microorganismos biomineros y altamente resistentes a cobre como *A. ferrooxidans* y *S. metallicus* muestran que al interior de éstas células se acumula una gran cantidad de poliP. Los niveles de este polímero disminuyen cuando las células son expuestas a cobre y junto con esto, también se observó que la actividad de la PPX, enzima que degrada los poliP, aumenta (Alvarez y Jerez, 2004; Remonsellez y col., 2006; Orell y col., 2010). Estos antecedentes, junto con los ya mencionados en la sección 1.4.2, permiten relacionar los poliP con la resistencia a cobre.

Nuestros resultados de PCR en tiempo real concuerdan con lo documentado en la literatura respecto al comportamiento de *copA* en respuesta a cobre. Como se expuso en la sección 3.1, los niveles de transcrito aumentan en respuesta a cobre en forma transiente, tanto en carencia como en presencia de poliP. Sin embargo, en

carencia de poliP, los niveles máximos de transcrito se alcanzaron antes que en la condición poliP+. La explicación propuesta para este fenómeno es que en carencia de poliP el cobre no podría ser expulsado de la célula en la forma de Cu-Pi y esto aumentaría las concentraciones intracelulares de cobre. Para hacer frente a estas condiciones, las células de *S. solfataricus* compensarían el papel de los poliP en la detoxificación del cobre, no sólo aumentando los niveles de transcrito de *copA* sino también, activando su transcripción más tempranamente que en presencia de poliP.

Finalmente, a pesar que los niveles de transcrito de *copA* se elevaron luego de la exposición a cobre, los niveles proteicos de este transportador no fueron detectados por la técnica ICPL. Posiblemente, se debe a limitaciones de la técnica proteómica y a lo complejo que resulta poder solubilizar proteínas de membrana. Otra explicación, es que debido al recambio proteico, los niveles de CopA hayan vuelto a niveles bajos luego de las 24 h que se esperaron para preparar los extractos proteicos que se utilizaron en los experimentos de proteómica cuantitativa.

4.2 Proteínas que experimentaron cambios en más de una condición de estudio y proteínas hipotéticas

Dentro de las proteínas que cambiaron sus niveles en más de una condición encontramos un grupo relacionadas con la estructura de ADN. Éstas son la proteína de unión a cromatina Cren7 y las proteínas de unión a ARN/ADN alba 1 y alba 2. Cren7 es una proteína que junto a la proteína Sac7d compactan el ADN, cumpliendo una función similar a las histonas en eucariontes (Zhang y col., 2010). Nuestros experimentos muestran que esta proteína aumenta sus niveles en la condición poliP- y los disminuye tanto en la condición poliP+/Cu como poliP-/Cu. Hasta la fecha sólo se han realizado estudios estructurales de Cren7 (Feng y col., 2010). Para poder establecer una relación entre esta proteína y un fenómeno de estrés, se requiere más información.

Por otro lado, alba 1 y alba 2 son proteínas ampliamente distribuidas en las arqueas. Mientras alba 1 es una proteína altamente conservada entre las Creanarqueas, alba 2 en cambio, es mucho más divergente (Jelinska y col., 2005). Estas proteínas se unen tanto al ADN, como al ARN *in vivo* (Guo y col., 2003; Marsh y

col., 2005). Estudios de cristalografía muestran que alba 1 puede formar un homodímero o un heterodímero con alba 2 en la proporción 1:1. Estos dímeros generan distintos niveles de condensación del ADN circular *in vitro*. El heterodímero siempre genera estructuras altamente condensadas, mientras el homodímero puede generar estructuras relajadas, tanto como condensadas. Una relación 6pb/dímero genera una estructura relajada de ADN y una relación 12 bp/dímero, una condensada (Jelinska y col., 2005). Además de una función estructural, las proteínas alba pueden tener funciones reguladoras de la transcripción. Estudios en *S. solfataricus* muestran que la afinidad de la proteína alba 1 por el ADN está regulada por la acetilación de la Lys16. Cuando alba 1 está desacetilada posee mayor afinidad por el ADN y es capaz de reprimir la transcripción del promotor T6 del SSV1 (de *Sulfolobus* spindle-shaped virus) *in vitro* (Bell y col., 2002). Por otro lado, debido a su capacidad de unirse al ARN *in vivo* (ARNr y ARNm), se propuso que una de las funciones de la proteína alba 1 es mantener la estructura y la estabilidad de ARN.

Nuestros resultados de proteómica mostraron que tanto en la condición poliP- como en la condición poliP-/Cu aumentan los niveles de la proteína alba 1. Alba 2 en cambio aumenta sus niveles en la condición poliP- y los disminuye en la condición poliP+/Cu. Debido a las múltiples funciones y el poco conocimiento que se tiene de las proteínas alba, es difícil determinar el efecto que tendría el aumento o disminución de los niveles de esta proteína. Sin embargo, nuestros resultados en la condición poliP+/Cu sugieren que alba 2 podría tener una función protectora del ADN y del ARN. Esto explicaría que junto con la disminución de los niveles de alba 2, se observara el aumento de la endonucleasa IV y de una proteína del exosoma (ver sección 4.4.1).

Otra proteína que cambió en más de una condición es la piridoxal biosíntesis liasa. Esta enzima, participa en la biosíntesis de piridoxal 5-fosfato (PLP), un cofactor esencial de enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos (Mittenhuber, 2001). Nuestros estudios mostraron que la enzima piridoxal biosíntesis liasa aumentó sus niveles en la condición poliP-/Cu, lo que podría conducir a una mayor producción de PLP. La relación más interesante que podemos encontrar entre el posible aumento de este cofactor y la carencia de poliP en presencia de cobre, es que la cisteína sintasa es una enzima dependiente de PLP (Alexander y col., 2005) y, como se discutirá en la

sección 4.5.2, se observa favorecida la biosíntesis de cisteína en esta condición de estudio.

Finalmente, dentro de nuestros resultados de proteómica encontramos un grupo de proteínas cuya función es hasta hoy desconocida (proteínas hipotéticas). Además, hubo proteínas de las cuales se conoce su función, pero sus cambios no se pudieron relacionar ni con la resistencia a cobre ni con la carencia de poliP. Las principales razones de esta situación fue el poco conocimiento de algunas vías metabólicas en arqueas y las múltiples funciones que puede cumplir una misma proteína, haciendo difícil relacionar sus cambios con un fenómeno específico.

4.3 Efecto de la carencia de poliP en el arqueón *S. solfataricus*

Como se mencionó anteriormente, los poliP son polímeros lineales de decenas o centenas de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido (Kornberg y col., 1999). Los poliP se observan, mediante microscopía electrónica, como gránulos densos al paso de los electrones (Wiame, 1947) y además, se han encontrado en todos los seres vivos en los que se ha buscado: bacterias, hongos, protistas, plantas, animales (Wood y Clark, 1988) y también en arqueas (Scherer y Bochem, 1983; Rudnick y col., 1990; Remonsellez y col., 2006, Orell y col., 2012). El posible origen prebiótico y el carácter ubicuo de los poliP sugieren una multiplicidad de funciones.

En esta memoria de título nos interesó conocer el efecto que tendría la carencia de poliP en *S. solfataricus* y de esta forma comprender mejor el papel que desempeña este polímero en arqueas. Con este objetivo en mente, diseñamos experimentos de proteómica cuantitativa que nos permitieron comparar las proteínas de una cepa recombinante carente de poliP (poliP-) frente a una cepa silvestre (poliP+).

4.3.1 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y conversión de energía

Nuestros datos proteómicos apoyan la hipótesis que los poliP tienen un papel energético, en particular en la regeneración de ATP y del poder reductor. Así, observamos que la carencia de poliP aumentó la expresión de la α -amilasa. Esta

enzima participa en la degradación del glucógeno, polímero capaz de actuar como una reserva de polisacáridos en arqueas (Konig y col., 1982) y cuya degradación liberaría glucosa al medio intracelular para incorporarse finalmente a la vía glicolítica. Además, una disminución de la fosfoenolpiruvato sintasa, enzima involucrada en la gluconeogénesis y que cataliza la conversión de piruvato a fosfoenolpiruvato. Un descenso en los niveles de esta proteína sugiere que en carencia de poliP se favorece la vía glicolítica, sobre la gluconeogénesis (Fig.11). Finalmente, el aumento en los niveles de la acil- CoA deshidrogenasa, da cuenta de una mayor degradación de ácidos grasos y subsecuente producción de acetil- CoA (Fig. 11), molécula que al incorporarse al ciclo del TCA podría actuar como un mecanismo que permite hacer frente a una posible carencia de ATP. Por otro lado, la disminución de los niveles de transportadores de maltosa y arabinosa en *S. solfataricus*, se reportó anteriormente, a nivel de transcrito, por Tacholjian y col. (Tacholjian y col., 2006) al exponer estas células a un estrés por calor. Considerando el antecedente ya mencionado, la posible explicación para la disminución de los niveles de estos transportadores es que, frente a una situación de estrés, la célula obtiene ATP desde sus reservas energética en vez de consumir ATP en el transporte de azúcares hacia el medio intracelular. Esto sugiere que la cepa deficiente de poliP podría ser menos activa metabólicamente y ajusta la asimilación de nutrientes a esta condición.

En este estudio no se encontraron cambios de proteínas involucradas directamente con el ciclo del TCA, el cual tiene una función relevante dentro del metabolismo energético. Sin embargo, es posible relacionar la disminución de los niveles de la malato sintasa y de la maleato isomerasa con este proceso celular pues, como indica la Figura 12, una disminución de la malato sintasa favorece que la acetil-CoA ingrese al ciclo de los TCA. La maleato sintasa es una enzima que transforma el maleato a fumarato. Una disminución de sus niveles conllevaría a una acumulación de maleato, molécula que *in vitro* es capaz de inhibir la isocitrato liasa del arqueón halófilo *Haloflex mediterranei* (Oren y col., 1995). Si bien es necesario estudiar si el maleato tiene el mismo efecto sobre la isocitrato liasa de microorganismos termófilos, este dato sugiere que la reducción de la actividad de la isocitrato liasa y la disminución

de los niveles de malato sintasa favorecen el ciclo del TCA sobre al ciclo del ácido glioxílico, lo que implica una mayor generación de poder reductor y ATP.

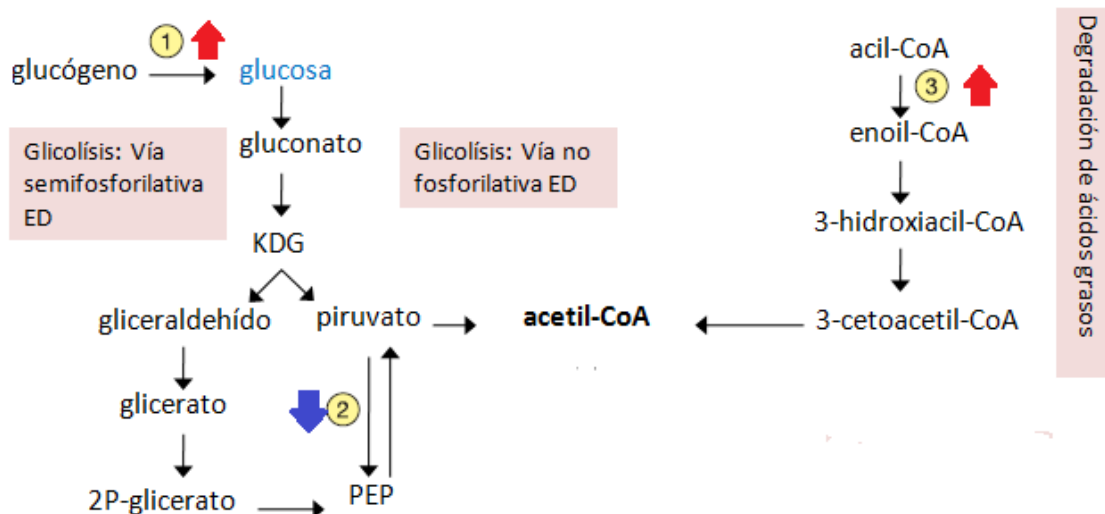


Figura 11. Esquema de la vía glicolítica Entner–Doudoroff (ED) y de la degradación de ácidos grasos en *S. solfataricus*. Enzimas: (1) alfa amilasa; (2) fosfoenolpiruvato sintasa; (3) acil-CoA deshidrogenasa. Las flechas rojas indican las enzimas que aumentaron sus niveles en carencia de poliP y la flecha azul indica la enzima que los disminuyó.

En relación a la cadena respiratoria, en nuestros estudios vimos el aumento de los niveles de la subunidad D de la NADH deshidrogenasa (NuoD). Respecto a esta proteína, She y col. (2001) lograron identificar el operón *nuoBCDHI* (SSO0665, SSO0322-0329) en *S. solfataricus*, pero no así los genes que codifican para las subunidades que participan en la unión de NADH y la oxidación (*nuoEFG*). Por lo tanto, ellos concluyeron que la NADH deshidrogenasa no es funcional en la cadena respiratoria de *S. solfataricus* (She y col., 2001). Sin embargo, resultados de transcriptómica muestran que células de *S. solfataricus* aumentan los niveles de transcrito del operón *nuoBCDHI* frente a un estrés por calor (Tacholjian y col., 2006). Para tener una idea clara, de la función que cumple la NADH deshidrogenasa en arqueas serán necesarios más estudios que permitan relacionar esta proteína con situaciones de estrés.

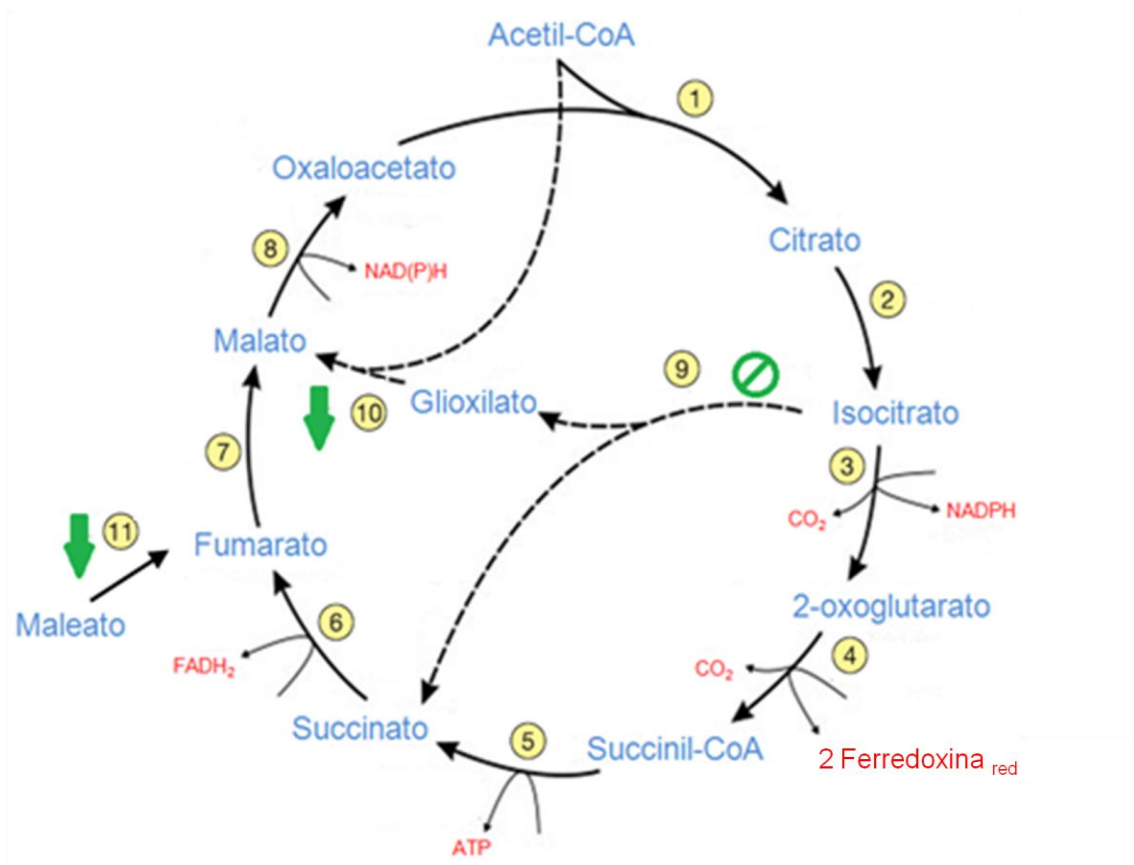



Figura 12. Esquema del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en *S. solfataricus*. Enzimas: (1) citrato sintasa; (2) aconitasa; (3) isocitrato deshidrogenasa; (4) 2-oxoácido ferredoxina oxidoreductasa; (5) succinil-CoA sintetasa; (6) succinato deshidrogenasa; (7) fumarasa; (8) malato deshidrogenasa; (9) isocitrato liasa; (10) malato sintasa; (11) maleato cis-trans isomerasa. Las flechas en verdes indican las proteínas que disminuyeron sus niveles en carencia de poliP.  Indica la posible inhibición de la isocitrato liasa por maleato.

Finalmente, hubo un grupo de proteínas cuyos cambios resultaron ambiguos, ya que proteínas con una función similar mostraron diferentes patrones de cambio. Tal es el caso de la acetil-CoA C-acetiltransferasa, proteína que participa en el metabolismo de lípidos, el ciclo fijador de carbono del 3-hidroxiisovalerato/4-hidroxiisovalerato y la degradación de isoleucina, en donde la isoformas Acab-3 y Acab-4, disminuyeron sus niveles mientras que la isoforma Acab-6 los aumentó. Esta situación fue reportada con anterioridad por Tacholjian y col. en donde los genes *acab-1,-3,-8,-10* disminuyeron

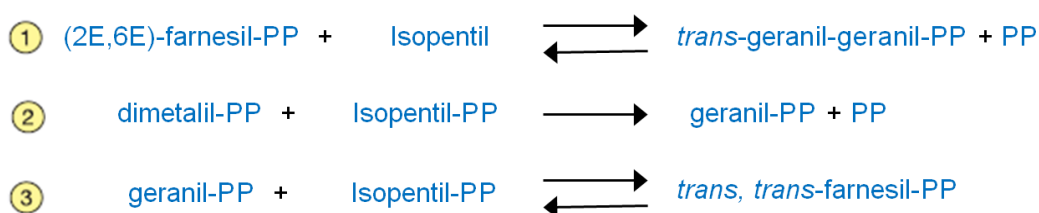
sus niveles y los genes *acab-4,-5,-6* los aumentaron frente a un estrés por calor (Tacholjian y col., 2006).

Por otro lado, en relación a la vía de las pentosas fosfato observamos una disminución de los niveles de la ribosa-5-fosfato isomerasa. En *S. solfataricus*, sólo se han identificado los genes que codifican para la ribosa-5-fosfato isomerasa (Sso1978) y la transcetolasa (Sso0297 y Sso0299). Por lo tanto, la función y la implicancia de la disminución de los niveles de esta proteína en carencia de poliP son hasta ahora desconocidas.

4.3.2 Metabolismo de coenzimas y aminoácidos

Dentro de este grupo encontramos un aumento en los niveles de una cobalto-precorrina-6Y C(15)-metiltransferasa. Esta proteína es una enzima que participa en la biosíntesis de la vitamina B12 (Rodionov y col., 2003). Está descrito que la vitamina B12 es un cofactor de enzimas con actividad isomerasa, metiltanferasa y deshalogenasa (Banerjee y col., 2003). Mediante estudios genómicos, se determinó que en arqueas del género *Sulfolobus* la vitamina B12 es esencial para la actividad de la metilmalonil-CoA mutasa (Zhang y col., 2009), la cual cataliza la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA, siendo este último un intermediario del ciclo del TCA.

Adicionalmente, observamos un aumento de la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa, la cual cataliza las siguientes reacciones:



Como se puede ver en las reacciones (1), (2) y (3), un aumento en los niveles de esta enzima conduce a un aumento de geranil-PP, geranilgeranil-PP y farnesil-PP. Estos tres compuestos son relevantes para la síntesis de terpenoides y lípidos de membrana (DeRosa y Gambacorta, 1986), además son componentes esenciales para la síntesis de las ubiquinonas (Meganathan, 2001), proteínas que participan en la

cadena respiratoria recibiendo electrones de la NADH deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa para transferirlos al citocromo bc₁ (Complejo III).

De esta forma, tanto los cambios observados en la cobalto-precorrina-6Y C(15)-metiltransferasa, como en la geranilgeranil pirofosfato sintasa sugieren que en carencia de poliP la células de *S. solfataricus* aumentan sus requerimientos de proteínas involucradas en el metabolismo y la producción de energía. Otros antecedentes que apoyan una posible función energética de los poliP son aportados por el trabajo de Varela y col. en donde la carencia de poliP en células de *Pseudomonas sp.* B4, produce un aumento en los niveles de proteínas que participan en el ciclo de TCA y en la degradación de ácidos grasos (Varela y col., 2010)

Por otro lado, respecto al metabolismo de aminoácidos observamos que aumentaron los niveles de la D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa, enzima que cataliza la primera reacción de la vía fosforilativa de la biosíntesis de serina (Fig.13). Además, el aumento en los niveles de la enzima serina-piruvato aminotransferasa, la cual participa en la vía no fosforilativa de la biosíntesis de serina. Sin embargo, estudios realizados en *S. tokodaii* mostraron que esta proteína tiene actividad fosfoserina aminotransferasa y por lo tanto podría participar en la vía fosforilativa de la síntesis de serina (Shimizu y col., 2007). Los aumentos de estas dos enzimas muestran que no sólo se incrementa la biosíntesis de serina, sino también de aminoácidos que pueden ser obtenidos a partir de ella. Tal es el caso de la glicina y la treonina.



Figura 13. Vía fosforilativa de síntesis de serina. Enzimas: (1) D-3 fosfoglicerato deshidrogenasa; (2) L-fosfoserina aminotransferasa; (3) fosfoserina fosfatasa. Esta vía ha sido descrita tanto en *E. coli* como en algunos *Sulfolobales*.

Finalmente, otra de las proteínas que aumentó sus niveles en carencia de poliP es la acetolactato sintasa, enzima que participa en la biosíntesis de leucina, isoleucina y valina (Singh y Shaner, 1995). Estudios transcriptómicos en el arqueón hipertermófilo *Pyrococcus furiosus* dan cuenta tanto del aumento de los niveles de

transcrito del gen que codifica para la acetolactato sintasa, como del aumento de los niveles de transcrito de genes involucrados en la biosíntesis de serina/treonina, luego de 5 h de un estrés por frío. Este hallazgo, sería una respuesta tardía que se produce como consecuencia del incremento de intermediarios C-3 y C-4 generados por el aumento de la degradación de glucosa durante las primeras 2 h post-estrés (Weinberg y col., 2005). De esta forma, es posible que el aumento en la biosíntesis de los aminoácidos ya mencionados esté supeditado al aumento de las vías de degradación de glucosa y glucógeno que se discutieron en la sección 4.3.1.

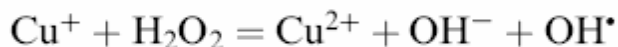
4.3.3 Modificaciones postraduccionales y chaperonas

Dentro de esta categoría funcional encontramos el aumento de los niveles de dos peroxiredoxinas (Bcp-2 y Bcp-4), las cuales tienen un papel central en la protección de *S. solfataricus* frente al estrés oxidativo acoplado al ciclo del TCA y la cadena respiratoria (Rhee y col., 2005; Limauro y col., 2006). Junto con transformar el H_2O_2 en H_2O y O_2 , regeneran el contenido intracelular de NAD y mantienen el equilibrio redox (Nishiyama y col., 2001; Seib y col., 2006). El aumento en los niveles de peroxiredoxinas fue reportado antes por Varela y col. en *Pseudomonas* sp. B4 carente de poliP (Varela y col., 2010) y por Maaty y col. en células de *S. solfataricus* expuestas a H_2O_2 (Maaty y col., 2009). Por lo tanto, es posible que el aumento de proteínas que participan en las vías catabólicas, producto de la carencia de poliP, conlleve también un aumento de las especies reactivas del oxígeno. Frente a esta situación, las peroxiredoxinas actuarían como un mecanismo de protección frente a los mayores niveles de ROS.

4.4 Efecto del cobre en el proteoma del arqueón *S. solfataricus*

El cobre es un micronutriente esencial para todos los seres vivos (eucariotas, procariotas y arqueas), que 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 (Lloyd y Phillips, 1999; Bruins y col., 2000; Teitzel y col., 2006).



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). Además de este mecanismo de daño, Macomber e Imlay (2009) proponen que el cobre es capaz de dañar los centros Fe-S de las proteínas.

En esta memoria de título nos interesaba conocer los mecanismos de *S. solfataricus* que le permiten hacer frente a una situación de estrés generada por el cobre. Con este objetivo en mente, diseñamos experimentos de proteómica cuantitativa que nos permitieron comparar las proteínas de este microorganismo en presencia de una concentración de CuSO_4 1 mM respecto a la condición control sin cobre.

4.4.1 Procesamiento y almacenaje de la información

Dentro de esta categoría funcional aumentaron los niveles de dos proteínas que están involucradas con el procesamiento del ARN. Una es el factor de procesamiento del extremo 3' ARNm cuya función aún no es del todo clara. Sin embargo, estudios proteómicos en el arqueón *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 mostraron que en presencia de cobre, este factor aumenta sus niveles respecto a la condición control (Baker-Austin y col., 2005). El otro aumento a considerar es el de una proteína del exosoma. Estudios realizados en *S. solfataricus* muestran que el exosoma participa en la poliadenilación del extremo 3' del ARNm y su posterior degradación (Portnoy y col. 2005). La actividad del exosoma es importante, pues permite eliminar ARNm defectuoso; determinar la abundancia de ARNm; y la velocidad de la síntesis de proteínas (revisado por Houseley y col., 2006). Es posible que en presencia de cobre se genere una situación de estrés ta, que la célula aumente su

maquinaria de degradación de ARN, el cual puede presentar daños debido a una posible condición de estrés oxidativo.

Adicionalmente, también logramos identificar una proteína tipo endonucleasa IV, que aumentó sus niveles en presencia de cobre. La endonucleasa IV es una proteína que pertenece a la familia de las AP-endonucleasas (Ljungquist, 1977) que son proteínas que catalizan la ruptura del enlace fosfodiéster de una molécula de ADN cuando se generan sitios apurínicos-apirimidínicos (AP) (Fig.14) La ruptura del enlace fosfodiéster es la primera etapa del sistema de reparación del ADN BER (de Base Exicision Repair) (Barzilay e Hickson, 1995). La pérdida de una base nitrogenada es una de las lesiones más frecuentes del ADN, la cual necesita ser corregida rápidamente pues puede generar mutaciones y bloqueo de la replicación (Loeb, 1985; Sobol y col., 2003). Estudios en *E. coli* muestran que la expresión de la endonucleasa IV es inducida por un regulón de respuesta al ion O_2^- (*soxRS*). Si bien la endonucleasa IV no es la principal responsable de la actividad AP-endonucleasa en *E.coli*, su actividad es relevante en la reparación del ADN, especialmente en situaciones de estrés oxidativo (Demple y col., 1986). Estos antecedentes, junto con el aumento observado en los niveles de una proteína tipo endonucleasa IV, nos permiten sugerir que el cobre genera una situación de estrés oxidativo y daño en el ADN de *S. solfataricus*. Finalmente, estudios proteómicos realizados en *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 muestran que en presencia de cobre también se sobreexpresa la endonucleasa IV, permitiendo relacionar esta enzima con una situación de estrés generada por el cobre (Baker-Austin y col., 2005).

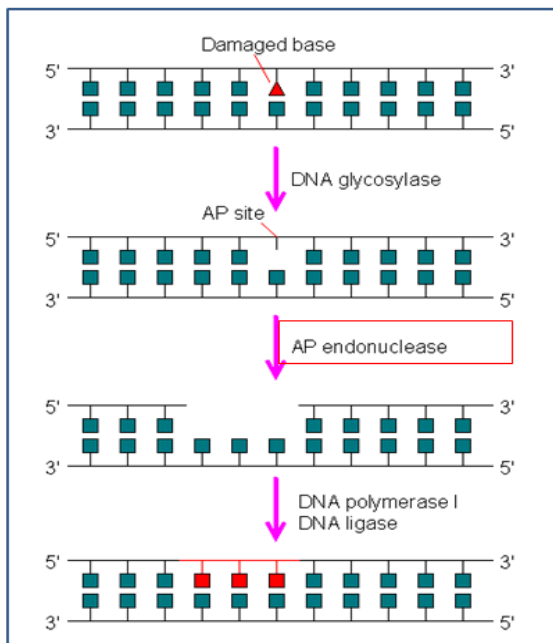


Figura 14. Esquema del sistema BER. En el cuadro rojo se destaca la AP-endonucleasa que aumentó sus niveles en las células *S. solfataricus* poliP+ expuestas a cobre.

4.4.2 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y conversión de energía

Dentro de estas funciones celulares aumentaron los niveles de la ferredoxina y la malato sintasa. También disminuyeron los niveles de la isocitrato liasa y la fosfoglicerato quinasa.

Las ferredoxinas son pequeñas proteínas con centros hierro-sulfuro que funcionan como transportadores de electrones intracelulares. En el caso de *S. solfataricus*, la ferredoxina posee un centro 2Fe-2S y actúa como aceptor de electrones de la 2-oxoácido ferredoxina oxidoreductasa (Iwasaki y col., 1995), enzima que participa en el ciclo del TCA convirtiendo el 2-oxoglutarato en succinil-CoA (Park y col., 2006). A pesar que nuestros experimentos de proteómica no mostraron un aumento en los niveles de la 2-oxoácido ferredoxina oxidoreductasa, el aumento de los niveles de la ferredoxina sugiere una mayor actividad de esta enzima, lo que implica una mayor actividad del ciclo del TCA (Fig.15). Este ciclo también se ve favorecido por la disminución de los niveles de la isocitrato liasa. Sin embargo, resulta curioso que los niveles de esta última enzima disminuyeran mientras los niveles de la malato sintasa,

enzima estrechamente relacionada con ella, aumentarán. Estudios del metabolismo de azúcares C5 en *S. solfataricus* mostraron que es posible observar actividad malato sintasa en ausencia de actividad isocitrato liasa al degradar azúcares como xilosa o arabinosa (Brouns y col., 2006; Nunn y col., 2010). Además, a pesar que ambas proteínas estén estrechamente relacionadas, la distancia de los genes que las codifican es de 461 pb y no forman un operón (Reiter y col., 1990). La D-arabinosa además de funcionar como fuente de energía, es inductor de la expresión de la PPX en la cepa *S. solfataricus* M16-PPX. En cambio, en el caso de la cepa *S. solfataricus* M16 (silvestre), sólo actuaría como fuente de energía ya que no induce la expresión de ninguna proteína. De esta forma, el comportamiento de la isocitrato liasa y la malato sintasa sugiere que en presencia de cobre la de D-arabinosa es degradada y utilizada como fuente de energía. Finalmente, la disminución de los niveles de la fosfoglicerato quinasa podría dar cuenta de un apagamiento de la vía gluconeogénica.

Estos resultados en conjunto sugieren que en presencia de cobre se privilegian las vías catabólicas (como el ciclo del TCA y la degradación de D-arabinosa), produciendo mayores niveles de ATP y poder reductor.

4.4.3 Metabolismo de coenzimas, aminoácidos e iones inorgánicos

A nivel celular, las proteínas están dentro de un ciclo de degradación y regeneración. Este constante recambio le permite a la célula responder eficientemente a cambios en su hábitat natural. No sólo las proteínas normales son degradadas, sino también aquellas proteínas mal plegadas o desnaturaladas, que se acumulan luego de una situación de estrés (revisado por Goldberg, 2003). En nuestros estudios de proteómica el estrés generado por el cobre tuvo como consecuencia el aumento en los niveles de la proteasa tricorn y dos acilaminoacil-peptidasas (ApeH-1 y ApeH-3). La explicación al aumento en los niveles de proteasa podría ser que la presencia de cobre dé origen a proteínas mal plegadas, las cuales deben ser rápidamente degradadas para no incurrir en la producción y acumulación de proteínas que pudieran resultar citotóxicas. Adicionalmente, también destaca el aumento de los niveles de la tiosulfato azufretransferasa, ya que una de las funciones propuestas para esta proteína es la

Finalmente, dentro de este grupo aumentaron los niveles de la glutamato deshidrogenasa, enzima que convierte el glutamato en 2-oxoglutarato, intermediario central de ciclo del TCA. La producción de mayores niveles de 2-oxoglutarato refuerza la idea de una mayor actividad de la 2-oxoácido ferredoxina oxidoreductasa (ver sección 4.4.2), lo que favorecería el ciclo del TCA y por lo tanto la producción de ATP y poder reductor (Fig. 16). El favorecer las vías de producción de ATP es relevante a la luz de los resultados expuestos, pues la proteólisis es un proceso dependiente de energía (Gottesman y Maurizi, 1992).

4.4.4 Modificaciones postraduccionales y chaperonas

Nuestros resultados de proteómica dan cuenta de algunos de los mecanismos que tiene *S. solfataricus* para hacer frente a una situación de estrés por cobre. Es así como un aumento de los niveles de la peroxiredoxina Bcp-2, junto con la tioredoxina reductasa.

En levaduras y mamíferos el sistema tioredoxina, además de proteger a la célula del estrés oxidativo, regula la síntesis de ADN, la transcripción génica, el crecimiento celular y la apoptosis (Mustacich y Powis, 2000; Arner y Holmgren, 2000). Además, en *E. coli* se reportó que la tioredoxina y la tioredoxina reductasa presentan actividad chaperona al ser capaces de renaturalizar y plegar proteínas desnaturadas *in vitro* (Kern y col., 2003). En el genoma de *S. solfataricus* se han identificado dos tioredoxinas (SsTrx-A1, -A2) y tres tioredoxinas reductasas (SsTrx-B1, -B2, -B3) putativas. Mientras ambas tioredoxinas son funcionales, sólo la SsTrx-B3 opera en *S. solfataricus* (Grimaldi y col., 2003). SsTrx-B3, además de participar del sistema tioredoxina junto con las tioredoxinas, puede participar de un nuevo sistema tioredoxina conformado por una proteína disulfuro oxidoreductasa (SsPDO), la cual es sustrato de SsTrx-B3 y NADPH (Pedone y col., 2006). La SsPDO, también llamada glutaredoxina, es una proteína que presenta actividad chaperona, oxidoreductasa (forma y reduce puentes disulfuro) e isomerasa (reordena puentes disulfuro). El papel que desempeña la SsPDO es relevante si consideramos que, a diferencia de la mayoría de las células, en el citoplasma de microorganismos termófilos es posible encontrar proteínas con puentes disulfuro. La importancia de los puentes disulfuro radica en que éstos

contribuyen significativamente a la termoestabilidad de las proteínas (Beeby y col., 2005). Finalmente, un sustrato importante del sistema SsPDO/SsTrx-B3/NADPH es la peroxiredoxina, ya que en *S. solfataricus* las isoformas Bcp-1, -3, -4 de la peroxiredoxina son restituidas (reducidas) por este sistema (Limauro y col., 2008) (Fig. 16).

Por lo tanto, en el contexto de un posible estrés oxidativo generado por el cobre, el aumento en los niveles de la SsTrx-B3 es relevante ya que ayudaría a proteger a la célula de tres maneras: reduciendo proteínas oxidadas mediante el sistema tioredoxina; restableciendo puentes disulfuro de proteínas mal plegadas mediante el sistema SsPDO/SsTrx-B3/NADPH y finalmente, restituyendo (reduciendo) las peroxiredoxinas que ayudan en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno generadas tanto una reacción tipo Fenton, como por el aumento de la vías catabólicas discutidas en la sección 4.4.2.

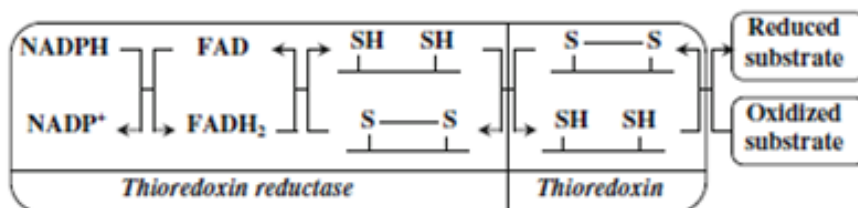


Figura 16. Sistema tioredoxina. Imagen obtenida de Grimaldi y col., 1994. La tioredoxina reductasa utiliza NADPH para catalizar la conversión de tioredoxina ox. a tioredoxina red. A su vez la tioredoxina, reduce múltiples sustratos intracelulares.

4.5 Efecto de la carencia de poliP y la presencia cobre en el proteoma del arqueón *S. solfataricus*

Una de las funciones que se le han atribuido a los poliP es participar en la destoxificación de metales pesados, para lo cual se han propuesto al menos tres mecanismos potenciales. El primero sería como quelante de iones metálicos; el segundo establece 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 para ser eliminados de la célula mediante transportadores de fosfato inorgánico ubicados en la membrana plasmática.

Finalmente, el tercer mecanismo sería que los poliP son 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.

Para profundizar en el conocimiento que se tiene de los poliP en la resistencia al cobre en arqueas, diseñamos experimentos de proteómica cuantitativa que nos permitieron comparar los niveles de proteínas del arqueón *S. solfataricus*, en carencia de poliP y presencia de cobre, respecto de la condición control poliP+ y ausencia de cobre.

4.5.1 Procesamiento y almacenaje de la información

Una de las proteínas que aumentó sus niveles dentro de esta categoría funcional es la ADN topoisomerasa. Las topoisomerasas son enzimas que resuelven problemas topológicos del ADN, es decir problemas asociados a su geometría durante los procesos de replicación, transcripción, recombinación y estructura de la cromatina (revisado por Champoux, 2001). La ADN topoisomerasa de *S. solfataricus* pertenece a la familia IA y relaja el sobrenrollamiento negativo del ADN (Dai y col., 2003). En líneas celulares de linfoma de histiocitos tratadas con H_2O_2 , la ADN topoisomerasa II participa del proceso de ruptura del ADN que conduce finalmente a la apoptosis (Li y col., 1999). Este antecedente sugiere que las topoisomerasas podrían tener una función en una situación de estrés. Sin embargo, hacen falta más estudios para esclarecer la función de las ADN topoisomerasas en arqueas sometidas a estrés.

Por otro lado, nuestros resultados también mostraron una importante disminución en los niveles de proteínas ribosomales. Este hallazgo sugiere que en carencia de poliP y presencia de cobre, hay una disminución en la síntesis proteica. Esta afirmación se condice con lo expuesto en la sección 4.5.3., donde se discute sobre la disminución de la biosíntesis de aminoácidos, a excepción de la cisteína que podría desempeñar un papel importante en la resistencia a estrés oxidativo. Además, antecedentes de nuestro laboratorio señalan que en presencia de 1 mM de $CuSO_4$, las células *S. solfataricus* poliP- disminuyen aproximadamente el 40% de su crecimiento comparadas con las células poliP+ (Orell, 2010). Por lo tanto, es posible que células

carentes de poliP, sean más sensibles frente a una condición nociva como la exposición al cobre, al ver afectada su síntesis proteica.

Finalmente, observamos que la agmatinasa aumenta sus niveles en las células *S. solfataricus* poliP- expuestas a cobre. La agmatinasa, es una enzima involucrada en la síntesis de poliaminas (Panagiotidis y col., 1987). Las poliaminas son moléculas polianiónicas con diversas funciones celulares. En *S. solfataricus* desempeñan un papel importante al ser necesarias tanto para el ensamblaje como para la estabilidad de los ribosomas (Londei y col., 1986). Además, en esta condición también aumentaron los niveles de una espermidina sintasa, otra enzima involucrada en la síntesis de poliaminas (Panagiotidis y col., 1987). Por lo tanto, es posible que en presencia de cobre y carencia de poliP se produzca una degradación de los ribosomas (lo que explicaría la disminución en los niveles de proteínas ribosomales) y por esa razón se requiera una mayor cantidad de poliaminas que permitan estabilizar los ribosomas y hacer frente a una situación de estrés.

4.5.2 Metabolismo de carbohidratos, lípidos y conversión de energía

Dentro de esta categoría funcional, en presencia de cobre y carencia de poliP aumentaron los niveles de proteínas involucradas en la cadena respiratoria. Entre ellas encontramos a la subunidad citocromo b de la quinol oxidasa (SoxC) y la proteína-1 rieske hierro-sulfuro (SoxL). Para entender la función que cumplen estas proteínas, es necesario conocer cómo se articula la cadena respiratoria en las arqueas del género *Sulfolobus*. El conocimiento actual que se tiene sobre la cadena respiratoria en *Sulfolobales*, se basa principalmente en estudios realizados en varios miembros de este orden. En resumen, lo que se sabe es que los electrones del NADH o de la oxidación del succinato, entran a la cadena transportadora de electrones vía NADH:quinona oxidoreductasas o succinato:quinona oxidoreductasas. Luego, las quinonas reducidas transportan los electrones hacia varios complejos oxidasas, los cuales le entregan los electrones al O₂, transformándolo en H₂O y bombean protones al medio extracelular (Auernik y Kelly, 2008) (Fig.17). Hasta la fecha se han encontrado tres tipos de complejos oxidasas en *S. solfataricus*: SoxABCD-SoxL, SoxEFGHIM y DoxBCE. Estudios de transcriptómica realizados en *S. solfataricus*, mostraron que el

complejo SoxABCD-SoxL se induce preferentemente en condiciones de crecimiento reducidas de O_2 y el complejo SoxEFGHIM en condiciones ricas de O_2 . Esto se debe a la mayor afinidad del complejo SoxABCD-SoxL por el O_2 , permitiendo que el proceso de respiración sea mucho más eficiente (Simon y col., 2009). En conjunto estos resultados sugieren que la carencia de poliP induce vías de producción de energía que deben ser eficientes para hacer frente a la condición de estrés por cobre. El aumento de estas vías no se observó en la condición poliP+/Cu, lo que deja de manifiesto la importancia de los poliP como reservorio de energía.

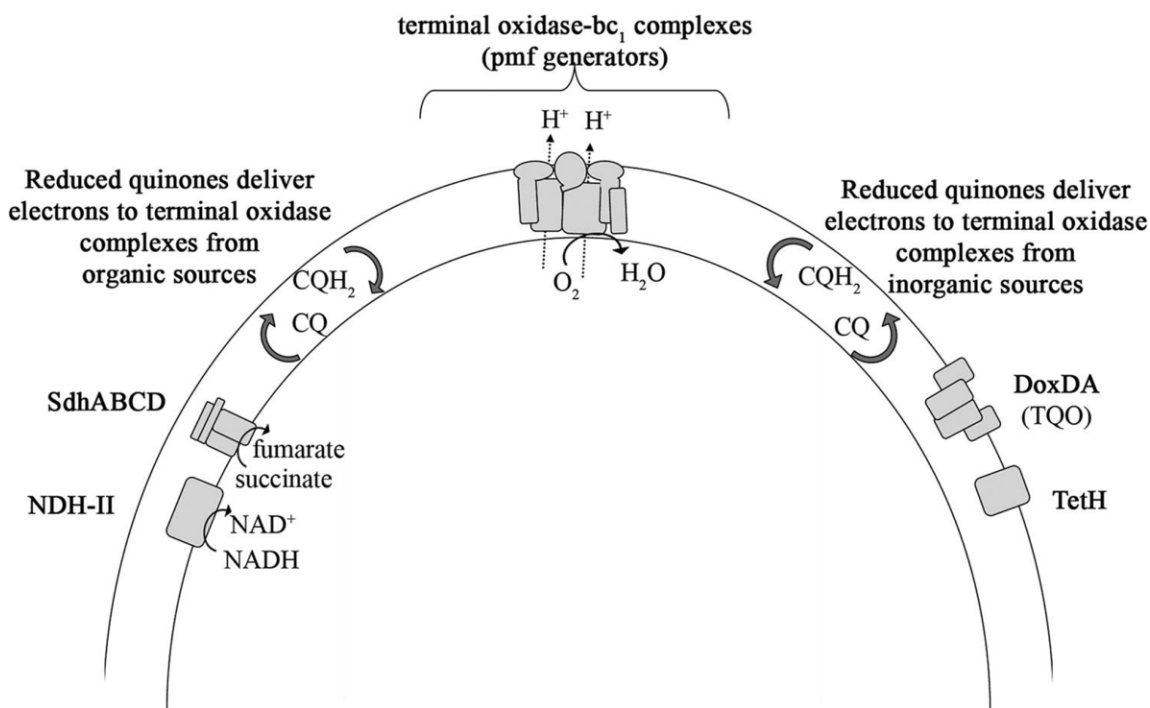


Figura 17. Esquema de la cadena respiratoria en *Sulfolobales*. Imagen obtenida de Auernik y Kelly, 2008.

4.5.3 Metabolismo de coenzimas, aminoácidos e iones inorgánicos

Nuestros experimentos de proteómica muestran que en carencia de poliP y presencia de cobre aumentan los niveles de la 6,7-dimetil-8-ribilumazina sintasa lo que sugiere un aumento en la síntesis de rivoflavina, precursor de los cofactores FMN y FAD. Las proteínas dependientes de FAD están involucradas en el sistema tioredoxina

(Lennon y col., 1999) y en diversos procesos celulares tales como: protección contra el estrés oxidativo (Karplus y Schulz, 1987), tranferencia de electrones en la cadena respiratoria (Foster y col., 1999; Roberts y col., 1996) y degradación de lípidos (Tiffany y col., 1997), entre otros. Por esta razón, no es de extrañar que frente a una situación de estrés, como la que representa la presencia de cobre, aumenten los requerimientos de un factor tan importante como FAD. Sin embargo, en la condición poliP+/Cu, no observamos aumentos en los niveles de ninguna proteína involucrada en la biosíntesis de rivo flavina (ver sección 3.2), lo que sugiere que la carencia de poliP es la responsable de dicho efecto.

Respecto al metabolismo de aminoácidos, nuestros resultados sugieren que frente a una situación de estrés como lo es la presencia de cobre en carencia de poliP hay una disminución de la biosíntesis de fenilalanina, triptófano, tirosina, arginina, isoleucina y valina. Sin embargo, no todos los aminoácidos presentaron una menor biosíntesis, ya que el aumento en los niveles de homoserina deshidrogenasa, PAPS reductasa y sulfato adeniltransferasa sugieren un aumento en la biosíntesis de cisteína, metionina y treonina, según lo ilustra la Figura 18.

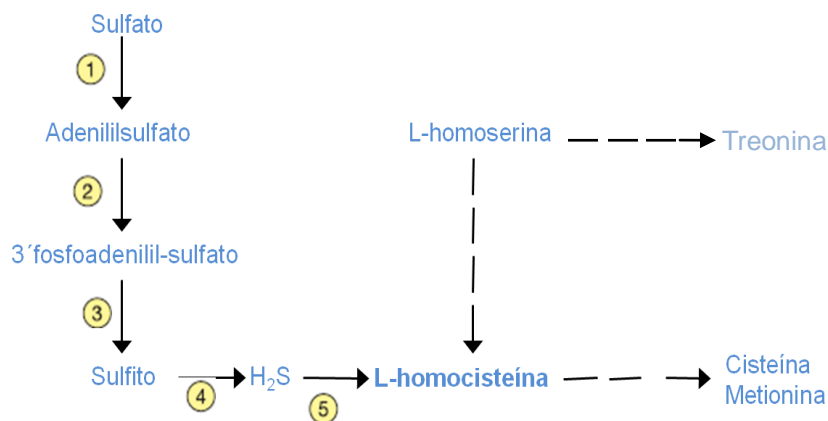


Figura 18. Posible vía metabólica de síntesis de treonina, cisteína y metionina en *S. solfataricus*. Enzimas: (1) Sulfato adenililtransferasa; (2) Adenililsulfato quinasa; (3) PAPS reductasa; (4) Sulfito reductasa; (5) Homocisteína desulfhidrasa.

En el contexto de nuestras condiciones experimentales (poliP-/Cu), un aumento en el repertorio intracelular de cisteína podría ser relevante, si consideramos antecedentes que vinculan este aminoácido con la resistencia al estrés oxidativo. Estudios realizados en las especies vegetales *Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana* muestran que la sobreexpresión del gen de la O-acetyl-Ser(thiol) liasa (*oas-a*), enzima clave en la biosíntesis de cisteína, aumenta la tolerancia al estrés oxidativo generado por SO₂ (Youssefian y col., 2001) y al estrés generado por metales pesados (López-Martín y col., 2008), respectivamente. Además, la delección de las isoformas *oas-a1* y *oas-a1.2* en *A. thaliana* provoca un aumento en la acumulación de ROS (López-Martín y col., 2008). La posible explicación a este fenómeno radica en que la cisteína es precursor de la síntesis de varios metabolitos sulfuro-dependientes, como por ejemplo el glutatión (GSH), un importante antioxidante. De esta forma, la disminución en el contenido intracelular de cisteína conduce a una disminución en los niveles de GSH, pero más importante aún, privilegia la existencia del glutatión en su forma oxidada, lo que genera finalmente un desbalance de la homeostasis de H₂O₂. Sin embargo, hasta la fecha no hay indicios de la existencia de glutatión en arqueas, pero sí de proteínas importantes para la remoción de ROS, cuya función catalítica o estructura son dependientes de cisteína. Entre ellas encontramos las peroxiredoxinas (Limauro y col., 2006; Limauro y col., 2008a), la disulfuro oxidoreductasa (Limauro y col., 2008b), las tioredoxinas (Guagliardi y col., 1994) y la ferredoxina tipo rieske (Kounosu y col., 2004). Por lo tanto, considerando la importancia de la cisteína en la respuesta a un posible estrés oxidativo generado por el cobre, es de esperar que se aumenten proteínas involucradas en su biosíntesis. Adicionalmente, nuestros resultados también mostraron un aumento en los niveles de la superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima cataliza la dismutación del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno y participa en la respuesta de *S. solfataricus* contra el estrés oxidativo (Maaty y col., 2009). Es interesante notar que esta enzima sólo aumentó sus niveles en la condición poliP-/Cu, no así en la condición poliP- ni poliP+/Cu, indicando un mayor nivel de estrés oxidativo en la condición poliP-/Cu.

Finalmente, nuestros experimentos mostraron una disminución en los niveles de una proteína relacionada con el estrés térmico. Esta proteína pertenece a la familia de

las Hsp20, las cuales actúan como chaperona frente a un estrés por calor. Su actividad permite prevenir que se agreguen proteínas mal plegadas que podrían resultar citotóxicas (Li y col., 2012). Llama la atención que los niveles de esta proteína disminuyeran, ya que su actividad chaperona podría facilitar el plegamiento de proteínas desnaturadas producto de una situación de estrés. Se requerirán más estudios que permitan entender como responden las proteínas Hsp20 frente a un estrés producido por el cobre.

4.5.4 Modificaciones postraduccionales y chaperonas

Dentro de esta categoría funcional, además de aumentar los niveles de la peroxiredoxina, aumentaron los niveles de la subunidad alfa de la prefoldina. La prefoldina es una chaperona ATP-independiente presente tanto en eucariontes como en arqueas. En el caso de *S. solfataricus*, las prefoldinas están constituidas por dos subunidades alfa y cuatro subunidades beta formando un hexámero (Leroux y col., 1999). Su función celular consiste en unirse tanto a proteínas en formación, como a proteínas desnaturadas para llevarlas hacia el termosoma en donde son plegadas (Okoshi y col., 2002). De esta forma, las prefoldinas pueden prevenir la agregación de proteínas mal plegadas producto de una situación de estrés. El aumento en los niveles de prefoldina se observó solamente en la condición poliP-/Cu, por lo tanto es posible que las células carentes de poliP muestren un estado de mayor estrés y por lo tanto estas células serían más sensibles frente a una condición nociva, como la exposición al cobre. Sin embargo, debido a que sólo observamos el aumento de la subunidad alfa, se requerirán más estudios para verificar si efectivamente la prefoldina cumple una función en la condición poliP-/Cu.

5. CONCLUSIONES

En presencia de cobre, las células de *S. solfataricus* poliP⁻ aumentan los niveles de transcrito de *copA*, más rápido que las células poliP⁺. Esto sugiere que los poliP son un mecanismo complementario de respuesta a cobre, el cual al no estar presente, es compensado por un aumento en la expresión de *copA*.

La carencia de poliP produce la expresión diferencial de proteínas que indicarían un déficit energético a nivel celular. Algunas de ellas son enzimas de las vías de degradación de lípidos y glucógeno que permitirían mantener el suministro energético, de forma alternativa al que pudiera ser aportado por el poliP.

En carencia de poliP las células de *S. solfataricus* aumentan los niveles de proteínas involucradas en procesos de detoxificación celular (peroxiredoxinas), reflejan un estado de mayor estrés en las células de *S. solfataricus* poliP⁻, en comparación con células que poseen poliP.

En presencia de cobre las células de *S. solfataricus*, aumentan los niveles de proteínas involucradas en vías de detoxificación, plegamiento de proteínas y proteólisis. Esto sugiere que uno de los mecanismos de citotoxicidad del cobre es la generación de ROS y por lo tanto de estrés oxidativo.

El daño generado por el cobre, no sólo tiene un efecto a nivel proteico, sino también nucleico. Esto queda de manifiesto, frente al aumento de los niveles de enzimas involucradas en procesos de degradación de ARN y reparación del ADN.

El aumento de los niveles de nuevas proteínas que participan en la remoción de ROS (ej. SOD), sugieren que las células de *S. solfataricus* poliP⁻ presentan un mayor nivel de estrés oxidativo que las poliP⁺, cuando son expuestas a cobre. El estrés oxidativo generado en esta condición de estudio, puede relacionarse tanto con la presencia de cobre, como con el aumento de los niveles de proteínas que participan en la cadena respiratoria.

Las células carentes de poliP- disminuyeron los niveles de varias proteínas ribosomales en presencia de cobre, lo que podría afectar directamente la síntesis proteica, revelando una menor capacidad de *S. solfataricus* poliP- de responder a una situación de estrés, en comparación con las células 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
- Aiking H., Stijnman A., van Garderen C., van Heerikhuizen H. y van 't Riet, J. 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. Appl Environ Microbiol **47**:374-377
- 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
- Alexander F.W., Sandmeier E., Mehta P.K. y Christen P. 2005. Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. FEBS Journal **219**(3):953-960
- Alvarez S. y Jerez C.A. 2004. Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Appl Environ Microbiol **70**:5177-5182
- Arnér E.S. y Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase Eur J Biochem **267**:6102-6109
- Auernik K.S. y Kelly R. 2008. Identification of components of electron transport chains in the extremely thermoacidophilic crenarchaeon *Metallosphaera sedula* through iron and sulfur compound oxidation transcriptomes. Appl Environ Microbiol **74**(24):7723-7732
- 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
- Bartlam M., Wang G., Yang H., Gao R., Zhao X., Xie G., Cao S., Feng Y., Rao Z. 2004. Crystal structure of an acylpeptide hydrolase/esterase from *Aeropyrum pernix* K1. Struct **12**(8):1481-1488
- 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. Microbiol **151**:2637-2646
- Banerjee R. y Ragsdale S. 2003. The many faces of vitamin B₁₂ catalysis by cobalamin-dependent enzymes. Annu Rev Biochem **72**: 209-247.
- Barzilay G. y Hickson I.D. 1995. Structure and function of apurinic/apyrimidinic endonucleases. Bioessays **17**:713-719
- Beeby B.D., O'Connor C., Ryttersgaard D.R., Boutz L.J. y Perry T.O. 2005. The genomics of disulfide bonding and protein stabilization in thermophiles. PLoS Biol **3**:e309
- Bell S.D., Botting C.H., Wardlewortg B.N., Jackson S.P. y White M. F. 2002. The interaction of alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. Science **296**:148-151

- 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
- Brouns S. J., Walther J., Snijders A. P., van de Werken H. J., Willems H. L., Worm P., de Vos M. G., Andersson A., Lundgren M., Mazon H. F., van den Heuvel R. H., Nilsson P., Salmon L., de Vos W. M., Wright P. C., Bernander R., y van der Oost J. 2006. Identification of the missing links in prokaryotic pentose oxidation pathways. J Biol Chem **28**(37):27378-27388
- Bruins M.R., Kapil S. y Oehme F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol Environ Saf **45**:198-207
- 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**:4812-4819
- Champoux J. 2001. DNA TOPOISOMERASES: structure, function, and mechanism. Annu Rev Biochem **70**:369-413
- Consalvi V., Chiaraluce R., Politi L., Gambacorta A., DeRosa M. y Scandura R. 1991. Glutamate deshydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. Eur J Biochem **146**:459-467
- Dai P., Wang Y., Ye R., Chen L. y Huang L. 2003. DNA topoisomerase III from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* with specific DNA cleavage activity. J Bacteriol **185**(18):5500–5507
- 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**:215-22
- Demple B., Johnson A. y Fung D. 1986. Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci **83**:7731-7735
- DeRosa M. y Gambacorta A. 1986. Lipid biogenesis in archaebacteria. Sys Appl Microbiol **7**:278-285
- Dopson M., Baker-Austin C., Koppineedi P.R. y Bond P.L. 2003. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. Microbiol **149**:1959-1970
- 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. Microbiol **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
- Feng Y., Yao H. y Wang J. 2010. Crystal structure of the crenarchaeal conserved chromatin protein Cren7 and double-stranded DNA complex. Prot Science **19**:1253-1257
- Fischer M., Schott A., Römisch W., Ramsperger A., Augustin M., Fidler A., Bacher A., Richter G., Huber R. y Eisenreich W. 2004. Evolution of vitamin B₂ biosynthesis. A novel class of riboflavin synthase in archaea. J Mol Biol **343**(1):267-278

- Foster C.E., Bianchet M.A., Talalay P., Zhao Q. y Amzel L.M. 1999. Crystal structure of human quinone reductase type 2, a metalloflavoprotein. Biochem **38**:9881-9886
- Fristedt U., van Der Rest M., Poolman B., Konings W.N. y Persson, B.L. 1999. Studies of cytochrome c oxidase-driven H(+)-coupled phosphate transport catalyzed by the *Saccharomyces cerevisiae* Pho84 permease in coreconstituted vesicles. Biochem **38**:16010-16015
- Fujino T., Watanabe K., Beppu M., Kikugawa K. y Yasuda H. 2000. Identification of oxidized protein hydrolase of human erythrocytes as acylpeptide hydrolase, Biochim Biophys Acta **1478**:102-112
- Gentina J. y Acevedo F. 1985. Microbial ore leaching in developing countries. Trends Biotechnol **3**:86-89
- Goldberg A. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature **426**:895-899
- Gottesman S. y Maurizi M.R. 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. Microbiol Rev **56**: 592-621
- Grimaldi P., Ruocco M.R., Lanzotti M.A., Ruggiero A., Ruggiero I., Arcari P., Vitagliano L. y Masullo M. 2008. Characterisation of the components of the thioredoxin system in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Extremophiles **12**:553-562
- Guagliardi A., Nobile V., Bartolucci S. y Rossi M. 1994. A thioredoxin from the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Int J Biochem **26**:375-380
- Guo R., Xue H. y Huang L. 2003. Ssh10b, a conserved thermophilic archaeal protein, binds RNA *in vivo*. Mol Microbiol **50**:1605-1615
- Houseley J., LaCava J. y Tollervey D. 2006. RNA-quality control by the exosome. Nature Rev Mol Cell Biol **7**:529-539
- Iwasaki T., Wakagi T., Oshima T. 1995. Ferredoxin-dependent redox system of a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7. J Biol Chem **270**(30):17878-17883
- Jelinska C., Conroy M.J., Crawen C.J., Hounslow A. M., Bullough P.A., Waltho J.P., Taylor G.L. y White M.F. 2005. Obligate heterodimerization of the archaeal alba2 protein with alba1 provides a mechanism for control of DNA packaging. Struct **13**: 963-971
- Jerez C.A. 2009. Biomining microorganisms: molecular aspects and applications in biotechnology and bioremediation. Adv Appl Biorremed Soill Biol 17. A. Singh y col.,(eds.). pp. 239-256. DOI: 10. 1007/978-3-540-89621-0_13, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Jerez C.A. 2011. Bioleaching and biomining for the industrial recovery of metals. Comp Biotech, Second Edition, Moo-Young M., (ed.). Elsevier. **3**: 717- 729, DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00234.8.
- 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**:1241-52
- Karplus P.A. y Schulz G.E. 1987. Refined structure of glutathione reductase at 1.54 Å resolution. J Mol Biol **195**:701-729
- 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
- Kern R., Malki A., Holmgren A. y Richarme G. 2003. Chaperone properties of *Escherichia coli* thioredoxin and thioredoxin reductase. Biochem J **371**:965-972
- Kim S. y Lee S.B. 2006. Catalytic promiscuity in dihydroxy-acid dehydratase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. J Biochem **139**:591-596
- Konig H, Skorko R., Zillig W. y Reiter W. 1982. Glycogen in the thermoacidophilic archaeobacteria of genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. Arch Microbiol **32**:297-303
- Kornberg A., Rao N.N. y Ault-Riché D. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu Rev Biochem **68**:89-125
- Kounosu A., Li Z., Coper N.J., Shokes J.E., Scott R.A., Imai T., Urushiyama A. e Iwasaki T. 2004. Engineering a three-cysteine, one-histidine ligand environment into a new hyperthermophilic archaeal rieske-type [2Fe-2S] ferredoxin from *Sulfolobus solfataricus* J Biol Chem **279**:12519–12528
- Krappmann S., Helmstaedt K., Gerstberger T., Eckert S., Hoffmann B., Hoppert M., Schnappauf G. y Braus G.H.. 1999. The *aroC* gene of *Aspergillus nidulans* codes for a monofunctional, allosterically regulated chorismate mutase. J Biol Chem **274**(32): 22275-22282
- Lennon B.W., Williams C.H. Jr. y Ludwig M.L. 1999. Crystal structure of reduced thioredoxin reductase from *Escherichia coli*: structural flexibility in the isoalloxazine ring of the flavin adenine dinucleotide cofactor. Protein Sci **8**:2366–2379
- Legrain C., Demarez M., Glansdorff N. y Pierard A. 1995. Ammonia-dependent synthesis and metabolic channelling of carbamoyl phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. Microbiol **141**:1093-1099
- Leroux M.R., Fandrich M., Klunker D., Siegers K., Lupas A.N., Brown J.R., Schiebel E., Dobson C.M. y Hartl F.U. 1999. MtGimC, a novel archaeal chaperone related to the eukaryotic chaperonin cofactor GimC/prefoldin. EMBO Journal **18**:6730–6743
- Li D., Yang F., Lu B., Chen D. y Yang W. 2012. Thermotolerance and molecular chaperone function of the small heat shock protein HSP20 from hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2. Cell Stress Chap **17**:103-108
- Li T., Chen A.Y., Yu C., Mao Y., Wang H. y Liu L. F. 1999. Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress. Genes Dev **13**:1553-1560
- Limauro D., Pedone E., Galdi I. y Bartolucci S. 2008a. Peroxiredoxins as cellular guardians in *Sulfolobus solfataricus* – characterization of Bcp1, Bcp3 and Bcp4. FEBS Journal **275**:2067-2077
- Limauro D., Pedone E., Pirone L. y Bartolucci S. 2006. Identification and characterization of 1-Cys peroxiredoxin from *Sulfolobus solfataricus* and its involvement in the response to oxidative stress. FEBS Journal **273**:721-731
- Limauro D., Saviano M., Galdi I., Rossi M., Bartolucci S. y Pedone E. 2008b. *Sulfolobus solfataricus* protein disulphide oxidoreductase: insight into the roles of its redox sites. Protein Eng Design Selec **22**:19-26

- 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
- Ljungquist, S. 1977. A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA. J Biol Chem **252**:2808-2814
- Loeb, L.A. 1985. Apurinic sites as mutagenic intermediates. Cell **40**:483-484
- López-Martín M.C., Becana M., Romero L.C. y Gotor C. 2008. Knocking out cytosolic cysteine synthesis compromises the antioxidant capacity of the cytosol to maintain discrete concentrations of hydrogen peroxide in *Arabidopsis*. Plant Physiol **147**:562-572
- Lutsenko S. y Kaplan, J.H. 1996. P-type ATPases. Trends Biochem Sci **21**:467
- Maaty W.S., Wiedenheft B., Tarlykov P., Schaff N., Heinemann J., Robison-Cox J., Valenzuela J., Dougherty A., Blum P., Lawrence C.M., Douglas T., Young M.J. y Bothner B. 2009. Something old, something new, something borrowed; how the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* responds to oxidative stress. PLoS ONE **4**(9): e6964
- Macomber L. e Imlay J.A. 2009. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. PNAS **106**(20):8344-8349
- 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
- Marsh V.L., Peak-Chew S.Y. y Bell S.D. 2005. Sir2 and the acetyltransferase, Pat, regulate the archaeal chromatin protein, alba. J Biol Chem **280**:21122-21128
- Meganathan, R. 2001. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. FEMS Microbiol Lett **203**:131-139
- Mittenhuber G. 2001. Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. J Mol Microbiol Biotechnol **3**(1):1-20
- Mustacich D. y Powis G. 2000. Thioredoxin reductase. Biochem J **346**:1-84
- 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
- Nishiyama Y., Yamamoto H., Allakhverdiev S., Inaba M., Yokota A. y Murata N. 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. EMBO Journal **20**(20):5587-5594
- Nunn C., Johnsen U., Schonheit P., Fuhrer T., Sauer U. y Hough D. 2010. Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. J Biol Chem **285**(44):33701-33709
- Okochi M., Yoshida T., Maruyama T., Kawarabayasi Y., Kikuchi H. y Yohda M. 2002. *Pyrococcus* prefoldin stabilizes protein-folding intermediates and transfers them to chaperonins for correct folding. Biochem Biophys Res Commun **291**:769-774
- Orell A., Navarro C.A. y Jerez C.A. 2009. Copper resistance mechanisms of biomining bacteria and archaea living under extremely high concentrations of metals. Adv Materials Res **71-73**: 279-282

- Orell A. 2010. Estudios de los determinantes de resistencia al cobre en el arqueón termoacidófilo *S. metallicus*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile
- Orell A., Navarro C.A., Arancibia R., Mobarec J.C. y Jerez C.A. 2010. Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. Biotech Adv 28(6):839-848
- Orell A., Navarro C.A., Rivero M., Aguilar J.S. y Jerez C.A. 2012. Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. Extremophiles DOI: 10.1007/s00792-012-0457-9
- Oren A. y Gurevich P. 1995. Isocitrate lyase activity in halophilic archaea. FEMS Microbiol Lett 130:91-95
- Outten F.W., Huffman D.L., Hale J.A. y O'Halloran T.V. 2001. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. J Biol Chem 276:30670-30677
- Pagani S., Bonomi F. y Cerletti P. 1984. Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. Eur J Biochem 142:361-366
- Panagiotidis C.A., Blackburn S., Low K.B. y Canellakis E.S. 1987. Biosynthesis of polyamines in ornithine decarboxylase, arginine decarboxylase, and agmatine ureohydrolase deletion mutants of *Escherichia coli* strain K-12. Proc Natl Acad 84: 4423-4427
- Park Y., Yoo C., Choi S.Y. y Lee H. 2006. Purifications and characterizations of a ferredoxin and its related 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P1. J Biochem Mol Biol 39(1):46-54
- Pedone E., Limauro D., D'Alterio R., Rossi M. y Bartolucci S. 2006. Characterization of a multifunctional protein disulfide oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus*. FEBS Journal 273: 5407-5420
- Pena M.M., Lee J. y Thiele D.J. 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. J Nutr 129:1251-1260
- Pettersson A., Kunst L., Bergman B. y Roomans G.M. 1985. Accumulation of aluminium by *Anabaena cylindrica* into polyphosphate granules and cell walls: an X-ray energy-dispersive microanalysis study. J Gen Microbiol 131:2545-2548
- Pevery J.J., Adamec H. y Parthasarathy M.V. 1978. Association of potassium and some other monovalent cations with occurrence of polyphosphate bodies in *Chlorella pyrenoidosa*. Plant Physiol 62:120-126
- Pfaffl M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucl Acids Res 29(9):2002-2007
- Portnoy V., Evguenieva-Hackenberg E., Klein F., Walter P., Lorentzen E., Klug G. y Schuster G. 2005. RNA polyadenylation in archaea: not observed in *Haloflex* while the exosome polyribosylates RNA in *Sulfolobus*. EMBO Reports 6:1188-1193
- Rachlin J.W., Jensen T.E., Baxter M. y Jani V. 1982. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. Arch Environ Contam Toxicol 11:323-33
- Rawlings D.E. 2002. Heavy metal mining using microbes. Annu Rev Microbiol 56:65-91

- Reiter W. D., Hudepohl U. y Zillig W. 1990. Mutational analysis of an archaeobacterial promoter: essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection in vitro. Proc Natl Acad Sci **87**:9509-9513
- Remonsellez F., Orell A. y Jerez, C.A. 2006. Copper tolerance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus metallicus*: possible role of polyphosphate metabolism. Microbiol **152**:59-66
- Rensing C., Fan B., Sharma R., Mitra B. y Rosen, B.P. 2000. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proc Natl Acad Sci **97**:652-6
- Rhee S.G., Chae H.Z. y Kim K. 2005. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. Free Rad Biol Med **38**:1543-1552
- Roberts D.L., Freman F.E. y Kim J.J. 1996. Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. Proc Natl Acad Sci **93**:14355-14360
- Rodionov D., Vitreschak A., Mironov A. y Gelfand M. 2003. Comparative genomics of the vitamin B₁₂ metabolism and regulation in prokaryotes. J Biol Chem **278**:41148-41159
- Rohwerder T., Gehrke T., Kinzler K. y Sand W. 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. Appl Microbiol Biotechnol **63**:239-48
- 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
- Scherer P.A. y Bochem, H.P. 1983. Ultrastructural investigation of *Methanosarcinae* and related species grown on methanol for occurrence of polyphosphatelite inclusion. Can J Microbiol **29**:1190-1199
- Seib K., Wu H., Kidd S., Apicella M., Jennings M. y McEwan A. 2006. Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. Microbiol Mol Biol Rev **70**(2):344-361
- Sekowska A., Kung H. y Danchin A. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. J Mol Microbiol Biotechnol **2**(2):145-177
- 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 **98**:7835-7840
- Shimizu K., Kiuchi Y., Ando K., Hayakawa M. y Kikugawa K. 2004. Coordination of oxidized protein hydrolase and the proteasome in the clearance of cytotoxic denatured proteins, Biochem Biophys Res Commun **324**:140-146.
- Shimizu Y., Sakuraba H., Doi K. y Ohshima T. 2007. Molecular and functional characterization of D-3 phosphoglycerate dehydrogenase in the serine biosynthetic pathway of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokidaii*. Arch Biochem Biophys **470**(2008):120-128

- Sicko-Goad L. y Lazinsky, D. 1986. Quantitative ultrastructural changes associated with lead-coupled luxury phosphate uptake and polyphosphate utilization. Arch Environ Contam Toxicol **15**:617-627
- Simon G., Walther J., Zabeti N., Combet-Blane Y., Auria R., van der Oost J. y Casalot L. 2009. Effect of O₂ concentrations on *Sulfolobus solfataricus* P2. FEMS Microbiol Lett **299**:255-260
- Singh B. y Shaner D. 1995. Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. Plant Cell **7**:935-944
- Sobol R., Katalou M., Almeida K., Joyce D., Engelward B., Horton J., Prasad R., Samson L. y Wilson S. 2003. Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. J Biol Chem **278**:39951-39959
- Soloz M. y Stoyanov, J.V. 2003. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. FEMS Microbiol Rev **27**:183-195
- Tacholjian S. y Kelly R. 2006. Dynamic metabolic adjustments and genome plasticity are implicated in the heat shock response of the extremely thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. J Bacteriol **188**:4553-4559
- Tamura N., Lottspeich F., Baumeister W. y Tamura T. 1998. The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interactions factors in cellular protein degradation. Cell **95**:637-648
- 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
- Tiffany K.A., Roberts D.L., Wang M., Paschke R., Mohsen A.W., Vockley J. y Kim J.J. 1997. Structure of human isovaleryl-CoA dehydrogenase at 2.6 Å resolution: structural basis for substrate specificity. Biochem **36**:8455-8464.
- Tsunasawa S., Narita K. y Ogata K. 1975. Purification and properties of acylamino acid-releasing enzyme from rat liver. J Biochem **77**:89-102.
- Urech K., Durr M., Boller T. y Wiemken A. 1978. Localization of polyphosphates in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol **116**:2545-2548
- 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*. Biochem **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
- Vera M., Guilianini N. y Jerez C.A. 2003. Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Hydrometall **71**:125-132
- Villafane A., Voskoboynik Y., Cuebas M., Ruhl T. y Bini E. 2009. Response to excess copper in the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* strain 98/2. Biochem Biophys Res Commun **385**:67-71
- Villafane A., Voskoboynik Y., Ruhl I., Sannino D., Maezato Y., Blum P., Bini E. 2011. CopR of *Sulfolobus solfataricus* represents a novel class of archaeal-specific copper-responsive activators of transcription. Microbiol **157**:2808-2817

- Weinberg M., Schut G., Brehm S., Datta S. y Adams W. 2005. Cold shock of a hyperthermophilic archaeon: *Pyrococcus furiosus* exhibits multiple responses to a suboptimal growth temperature with a key role for membrane bound glycoproteins. J Bacteriol **187**:336-348
- White R. 2003. The biosynthesis of cysteine and homocysteine in *Methanococcus jannaschii*. Biochim Biophys Acta **1624**:46–53
- Wiame J.M. 1947. Yeast metaphosphate. Fed Proc **6**(1):302
- Williams C., Arscott LD., Muller S., Lennon B., Ludwig M., Wang P., Veine D., Becker K. y Schirmer RH. 2000. Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. Eur J Biochem **267**:6110-6117
- Wood H.G. y Clark J.E. 1988. Biological aspects of inorganic polyphosphates. Annu Rev Biochem **57**:235-260
- Youssefian S., Nakamura M., Orudjev E. y Kondo N. 2001. Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpressing an O-Acetylserine(thiol) lyase modifies plant responses to oxidative stress. Plant Physiol **126**:1001-1011
- Zhang W. y Majidi V. 1994. Monitoring the cellular response of *Stichococcus bacillaris* to exposure of several different metals using in vivo super(31)P NMR and other spectroscopic techniques. Environ Sci Technol **28**:1577-1581
- Zhang Y., Rodionov D., Gelfand M. y Gladyshev V. 2009. Comparative genomic analysis of nickel, cobalt and vitamin B₁₂ utilization. BCM genomics **10**:78-103
- Zhang Z., Gong Y., Guo L., Jiang T. y Huang L. 2010. Structural insights into the interaction of the crenarchaeal chromatin protein Cren7 with DNA. Mol Microbiol **76**(3):749-759

Anexo 1

Tabla A1. Oligonucleótidos usados en este trabajo. Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en la empresa Invitrogen.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido
copA_ Fw	5'-TGGTGTAAGATGCCGAAG
copA_ Rv	5'-TGGAGTAGTGGTCTCTGGATTG
rps2P_ Fw	5'-GGTAGCAAGTAGACCCTATGC
rps2P_ Rv	5'-GGTATCAGCAAAAGCGACAA

Anexo 2

Cuantificación de los niveles de transcritos relativos al gen *rps2P* mediante PCR en tiempo real.

Las curvas de calibración para los genes estudiados se generaron a partir de diluciones seriadas de DNA genómico (10 ng/ul - 0,001ng/ul) amplificado en las mismas condiciones en que se hicieron los experimentos con cDNA. La eficiencia de las reacciones fue calculada en base a la pendiente de las curvas de calibración, según la fórmula:

$$E = 10^{(-1/m)} - 1$$

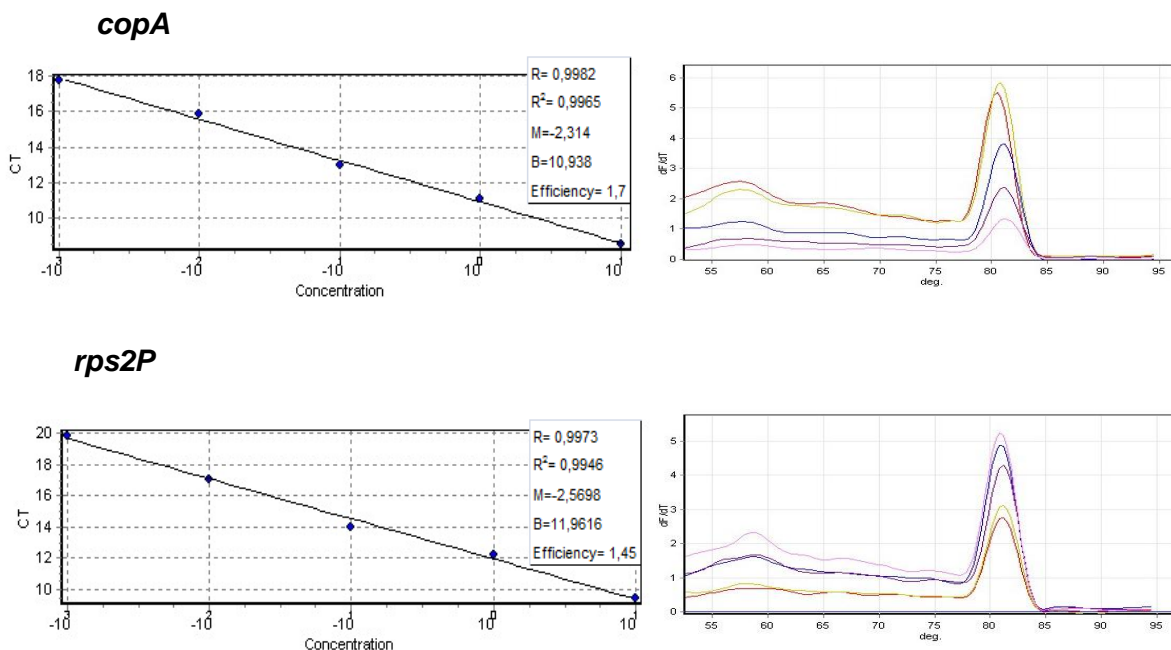


Figura A2. Curvas de calibración para los genes estudiados por PCR en tiempo real. Se muestran las curvas de calibración obtenidas mediante las diluciones seriadas de DNA genómico. Se indica también la pendiente (M) para cada curva y la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real (Efficiency). Además se muestra la curva de fusión para cada caso.

Ejemplo de los cálculos realizados en la determinación de la expresión relativa de *copA*.

Primero debemos calcular los CT tanto de *copA*, como de *rpsP2*. En nuestros experimentos la condición control es aquella en ausencia de cobre y la condición experimental, aquella en presencia de cobre.

Por ejemplo, para la cepa *S.solfataricus* M16-PPX (poliP-) los CT calculados cuando las células se expusieron a cobre durante 1 hr son:

CT *copA* (gen de estudio) control= 14,51

CT *copA* (gen de estudio) experimental= 10,24

CT *rps2P* (gen de referencia) control= 10,22

CT *rps2P* (gen de referencia) experimental= 10,47

Además, debemos calcular la eficiencia (E) para cada pareja de partidores. En el caso de los partidores utilizados para cuantificar *copA* y *rps2P* la eficiencia es 1,7 y 1,45 respectivamente.

Los valores mencionados anteriormente, deben reemplazarse en la siguiente ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{E^{\Delta\text{CT gen de estudio (condición control- condición experimental)}}}{E^{\Delta\text{CT gen referencia (condición control- condición experimental)}}$$

Reemplazo:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{1,7^{(14,51-10,24)}}{1,45^{(10,22-10,47)}}$$

$$\text{Expresión relativa} = \frac{9,63}{0,91}$$

$$\text{Expresión relativa} = 10,57$$

Este resultado quiere decir que luego de 1 hr de exposición a cobre, los niveles de transcrito del gen *copA* en las células de *S. solfataricus* carentes de poliP, son 10,57 veces mayores que en la condición control (sin cobre).