

CH-FC
Biotecnología

146
c.1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“ESTUDIOS DE PROTEOMICA CUANTITATIVA EN
MUTANTES DE *Escherichia coli* DEFICIENTES EN LAS
ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DE
LOS POLIFOSFATOS INORGÁNICOS”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al
Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

CAMILO ANDRÉS VALDIVIESO GUERRERO

Santiago de Chile, Junio de 2011

Director de Seminario de Título Dr. Francisco P. Chávez



**“ESTUDIOS DE PROTEOMICA CUANTITATIVA EN
MUTANTES DE *Escherichia coli* DEFICIENTES EN LAS
ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DE
LOS POLIFOSFATOS INORGÁNICOS”**

**Seminario de Título entregado a la Universidad de
Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para
optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.**

CAMILO ANDRÉS VALDIVIESO GUERRERO

Dr. Francisco Chávez
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Francisco Chávez in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Miguel Allende
Presidente Comisión

Handwritten signature of Miguel Allende in blue ink, written over a horizontal line.

Dra. Claudia Stange
Correctora

Handwritten signature of Claudia Stange in blue ink, written over a horizontal line.





Nací el primer día del mes de Octubre y fui el primer hijo en una familia que años después alcanzaría los 5 integrantes. Había toque de queda, por lo que mis familiares hicieron hasta lo imposible por ir a conocerme.

Crecí corriendo y jugando en el barrio, siempre intentando chutear la pelota de fútbol (aún sigo intentándolo) y con el afán de descubrir y aprender nuevas cosas.

Poco después del nacimiento de mi primera hermana, mi familia emprendió rumbo hacia Talca en busca de nuevas oportunidades laborales. Allí empecé mi vida escolar en el colegio de La Salle hasta segundo básico. Luego, surgieron oportunidades laborales un poco más al sur y a la costa, por lo que tras el nacimiento de mi segunda hermana partimos a vivir a la ciudad de Constitución. En esta ciudad continué mis estudios en el colegio Constitución, en donde cursé hasta cuarto básico.

Durante estos años alejado de la capital crecí con el apoyo de mi familia, nos consolidamos como un núcleo familiar muy cohesionado y valorábamos inmensamente las visitas que mis abuelos y tías nos hacían periódicamente. Lo que más rescato de este tiempo de mi vida es la vida familiar, la vida de barrio, la sencillez y por sobre todo, el contacto con la naturaleza.

Ya a finales del año 1996 volvimos a Santiago y terminé mi educación escolar en el colegio Notre Dame, donde aprendí a ser una persona de principios y valores, fortalecí mi lazo con la naturaleza y lo que creo más importante: conocí a mis amigos que mantengo como los mejores hasta el día de hoy.

Todo el tiempo que invertí viviendo de cerca con la naturaleza dio sus frutos. Despertó en mí la curiosidad, la capacidad de observar y descubrir que en la "Pacha mama" no hay puntada sin hilo. Es por eso que decidí dedicarme a la ciencia, que es una de las cosas que me apasiona junto al fútbol y a la música.

Ingresé a la Universidad de Chile el año 2005 y durante mi vida universitaria desarrollé completamente mis pasiones de vida: Me encanté con el mundo de la Microbiología, agarré mi guitarra para rockear por lo menos una vez al día, sigo semana a semana el actuar de mi gran pasión, Colo Colo e integro junto a mis amigos "la otra pasión" AJOTA F.C., institución que formamos y que ya ha logrado tres campeonatos y muchas más celebraciones. Me considero un hombre pasional y creo que mis pasiones me describen a la perfección. Agradezco a la vida por haberme enseñado a creer y luchar por mis ideales.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.-	Índice de tablas	iv
2.-	Índice de figuras	v
3.-	Lista de abreviaturas	vii
4.-	Resumen	1
5.-	Abstract	3
6.-	Introducción	5
6.1	El polifosfato inorgánico	5
6.2	Funciones de los poliP	6
6.3	Biosíntesis y degradación de los poliP	8
6.4	Estudios transcriptómicos del metabolismo de los poliP en <i>E. coli</i>	11
6.5	La proteómica como herramienta para el estudio de los poliP	12
7.-	Objetivos	15
7.1	General	15
7.2	Específicos	15
8.-	Materiales y métodos	16
8.1	Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo	16
8.1.1	Cepas bacterianas	16
8.1.2	Medios de cultivo	17
8.1.3	Condiciones de cultivo	17



8.2	Métodos de proteómica	18
8.2.1	Preparación de los extractos totales de las proteínas	18
8.2.2	Preparación de las muestras de las proteínas extracelulares	19
8.2.3	Análisis de proteómica cuantitativa mediante el marcaje isotópico de proteínas (ICPL)	20
8.2.4	Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)	21
8.2.5	Selección de proteínas desde los geles de poliacrilamida	23
8.3	Análisis de enriquecimiento molecular mediante GO Term Finder	23
8.4	Análisis bioinformático de los datos de proteómica y microarreglos	24
9.-	Resultados	26
9.1	Análisis de proteómica cuantitativa en las cepas de <i>E. coli K12</i> mutantes en el metabolismo de los poliP.	26
9.2	Comparación de la abundancia de las proteínas con los niveles de mRNA	44
9.3	Análisis bioinformáticos	47
9.4	Optimización de un protocolo de precipitación de las proteínas extracelulares	50
9.5	Estudio proteómico de las proteínas extracelulares de	

	las cepas mutantes de <i>E. coli</i>	53
10.-	Discusión	57
10.1	Estudios de proteómica cuantitativa en las cepas de <i>E. coli</i> con alteraciones en el metabolismo de los poliP	57
10.2	Proteínas que aumentan sus niveles en los mutantes del metabolismo de los poliP en <i>E. coli</i> .	58
	10.2.1 Cepa mutante <i>Appk1</i>	59
	10.2.2 Cepa mutante <i>Appx</i>	61
	10.2.3 Cepa mutante <i>ApoliP</i>	62
10.3	Proteínas con niveles disminuidos en los mutantes de <i>E. coli</i> relacionados con el metabolismo de los poliP	66
	10.3.1 Cepa mutante <i>Appk1</i>	66
	10.3.2 Cepa mutante <i>Appx</i>	71
	10.3.3 Cepa mutante <i>ApoliP</i>	74
10.4	Proteínas hipotéticas o de función desconocida	76
10.5	Análisis bioinformático de las proteínas	77
10.6	Análisis de las proteínas extracelulares	86
11.-	Conclusiones	89
12.-	Bibliografía	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo y sus principales características relacionadas con el metabolismo de los poliP.	17
Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de proteómica cuantitativa por ICPL.	27
Tabla 3. Detalle de las proteínas que aumentaron su expresión respecto a la condición control en los análisis de proteómica cuantitativa.	29
Tabla 4. Listado de las proteínas que disminuyeron su expresión con respecto a la condición control.	37
Tabla 5. Listado de productos génicos que coincidieron en las dos distintas metodologías de medición de cambios a gran escala.	45
Tabla 6. Análisis del enriquecimiento génico realizado con el 10% mayor de las proteínas que aumentaron y disminuyeron su expresión en la comparación realizada de cada cepa mutante con la cepa control.	48
Tabla 7. Ensayos de precipitación de las proteínas extracelulares.	51
Tabla 8. Spots seleccionados en el análisis de proteómica diferencial de las proteínas extracelulares de las cepas de <i>Escherichia coli</i> .	55





2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El polifosfato inorgánico	5
Figura 2. Metodología utilizada para el marcaje isotópico de las proteínas pertenecientes a las muestras estudiadas.	21
Figura 3. Dispersión de los datos obtenidos mediante proteómica cuantitativa para la comparación de las cepas mutantes con la cepa control.	28
Figura 4. Comparación realizada mediante <i>Pathway Tools</i> de la vía de la glicólisis y el ciclo de Krebs.	50
Figura 5. Gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) con las proteínas obtenidas a partir de los distintos métodos de precipitación descritos.	52
Figura 6. Gel 2D-PAGE de las proteínas extracelulares de la cepa wt.	54
Figura 7. Geles 2D-PAGE de las proteínas extracelulares de las cepas mutantes de <i>Escherichia coli</i> .	56
Figura 8. Degradación de las proteínas dependiente de la acumulación intracelular de poliP durante la carencia de nutrientes.	64
Figura 9. Representación de la vía de la glicólisis y el ciclo de Krebs mediante <i>Pathway Tools</i> para el caso de las tres cepas mutantes de este estudio.	78
Figura 10. Representación de la ruta metabólica de la fermentación mediante <i>Pathway Tools</i> para las tres cepas mutantes utilizadas en este seminario de título.	79

Figura 11. Representación de la vía metabólica de la respiración anaeróbica con los datos obtenidos por proteómica cuantitativa mediante <i>Pathway Tools</i> para las tres mutantes utilizadas en este estudio.	80
Figura 12. Mecanismo de acción para la activación de ArcA a través de ArcB.	81
Figura 13. Niveles de abundancia de las proteínas codificadas en los genes que se encuentran bajo la regulación de ArcA.	84
Figura 14. Perfil de abundancia de las proteínas que aumentaron sus niveles en la cepa mutante $\Delta ppk1$ y que a su vez disminuyeron sus niveles en la cepa mutante Δppx .	85



3 LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en dos dimensiones

ACP: Proteína portadora de acil

AMP: Adenosín monofosfato

ATP: Adenosín trifosfato

DNA: Ácido desoxirribonucleico

GDP: Guanosín difosfato

GTP: Guanosín trifosfato

ICPL: Marcaje isotópico de las proteínas

IEF: Isoelectroenfoque

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NTP: Nucleótido trifosfato

pI: Punto isoeléctrico

Pi: Fosfato inorgánico

PMSF: Fenilmetanosulfonilfluoruro

poliP: Polifosfato inorgánico

(p)ppGpp: Guanosina (penta)tetrafosfato

PPK1: Polifosfato quinasa 1

PPK2: Polifosfato quinasa 2

PPX: Exopolifosfatasa

RNA: Ácido ribonucleico

RND: Resistencia-Nodulación- División

tmRNA: Ácido ribonucleico de transferencia



4 RESUMEN

Los polifosfatos (poliP), son un biopolímero lineal que se encuentra en todos los seres vivos. En *Escherichia coli*, al igual que en otras bacterias, son sintetizados por la enzima polifosfato quinasa (PPK1), mientras que su degradación es mediada por la exopolifosfatasa (PPX). Al eliminar los polifosfatos se produce una alteración en funciones celulares importantes como la motilidad, el quórum sensing, la formación de biopelículas y la virulencia, entre otras. Sin embargo, poco se conoce tanto de las causas responsables de estas alteraciones como de los ajustes celulares que le permiten a la célula enfrentar dicha carencia. Estudios previos realizados en el laboratorio analizaron los cambios a nivel del transcriptoma total de los mutantes de *Escherichia coli* deficientes en las enzimas responsables del metabolismo de los polifosfatos (PPK1 y PPX). Con el objetivo de complementar estos estudios a gran escala, se realizaron estudios de proteómica cuantitativa con las mismas mutantes para establecer una comparación de los niveles de transcripción de una proteína con la abundancia de la proteína en el microorganismo. Se encontraron 328 proteínas con una variación significativa en su abundancia relativa respecto de la cepa control, de las cuales aproximadamente un 15% de ellas coincidieron con los datos de los microarreglos. Entre las categorías de ontología (GO) más representadas entre los genes que aumentaron su expresión estuvieron el Ciclo de Krebs (GO:6099) y la respiración oxidativa (GO:6119), así como también se ven afectados procesos metabólicos como la fermentación y la respiración anaeróbica, indicando una alteración del metabolismo energético cuando los niveles de polifosfatos se encuentran modificados en la célula. A su vez, análisis bioinformáticos de los resultados sugieren que estos cambios del metabolismo central en *E. coli* pudieran

estar relacionados con el regulador transcripcional ArcA. Los resultados sugieren que en las células deficientes en la síntesis de los poliP ($\Delta ppkI$), ArcA disminuye y por ende aumentan los niveles de numerosas proteínas de las vías energéticas para la síntesis de ATP y de poder reductor. Por el contrario, en las células deficientes en la degradación de los poliP (Δppx), ArcA aumenta y como consecuencia disminuyen los niveles de las proteínas de dichas vías. Finalmente, y para complementar el análisis de los proteomas totales celulares, se optimizó un protocolo para la precipitación de las proteínas extracelulares y su posterior separación mediante proteómica convencional en geles bidimensionales (2D-PAGE).

5 ABSTRACT

Polyphosphate (polyP), are a linear polymer found in all living organism. In *Escherichia coli*, are synthesized by the Poliphosphate Kinase (PPK1) and degraded by the Exopolyphosphatase (PPX). When PolyP levels are depleted a modification in many important cellular functions such as motility, biofilm formation, quorum sensing and virulence occurred. However, there is few knowledge about which are the causes of this alterations and which are the cellular adjustments that allow the bacteria to survive in those conditions.

Previous results from our laboratory, analysed the changes of the global transcriptome in knockout mutants strains of *Escherichia coli* for the main enzymes related to polyP metabolism. To complement these results, we used quantitative proteomic to study the same mutants strains and compared between the transcriptions levels and the relative abundance of the proteins in the microorganism. We found 328 proteins with altered abundance levels and near 15% of them matched with the microarrays data. The Gene Ontology (GO) categories more represented between the genes that changed its expression were Krebs Cycle (GO:6099) and the Oxidative Respiration (GO:6119). Also, several energetic pathways like fermentation and anaerobic respiration were affected, indicating an alteration in energetic metabolism when the polyP levels were modified in the cell. Furthermore, bioinformatics analysis shows that these adjustments in the central metabolism of *E. coli* may be related with the transcriptional regulator ArcA. The results suggest that in a mutant strain lacking the PPK1, wich synthesizes polyP, the levels of ArcA were decreased and all the energetic pathways were increased to produce ATP. Curiously, in a

mutant strain lacking the PPX, ArcA levels were increased and the energetic pathways were decreased.

Finally, this study also goals a precise protocol to precipitate extracellular proteins and its separation by conventional proteomic (2D-PAGE) to complement the total proteome study.

6 INTRODUCCIÓN

6.1 El Polifosfato inorgánico

El Polifosfato inorgánico (poliP) es un biopolímero lineal compuesto por residuos ortofosfato (Pi), los cuales están unidos mediante enlaces fosfoanhídrido (Figura 1). Se le considera un fósil molecular, probablemente remanente de la evolución prebiótica, dado que carece de una función concreta en la célula. Se ha encontrado poliP en todos los dominios de la vida y sus funciones en los seres vivos varían considerablemente según la naturaleza del organismo [Kulaev y col., 1999; Brown y Kornberg, 2004].

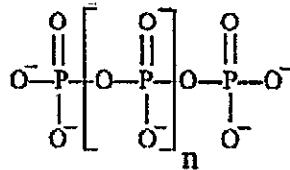


Figura 1. El polifosfato Inorgánico. [Brown y Kornberg, 2004].

En los organismos procariontes, los poliP están distribuidos tanto en el citoplasma como asociados a la membrana plasmática y al periplasma. Algunas bacterias, como *Pseudomonas sp.* B4 son capaces de acumular grandes cantidades de poliP en formas de gránulos [Chávez y col., 2006], visibles mediante microscopía electrónica, ya que al igual que otros polianiones, los poliP cambian la absorción de la tinción básica del azul de toluidina a una longitud de onda menor (630nm a 530nm) [Ohtomo y col., 2004].

Los niveles de poliP están sujetos a variaciones importantes y dependen de las condiciones fisiológicas y/o ambientales a las que esté expuesta la bacteria [Kornberg y col., 1999]. Es así como se observa un aumento en los niveles de los poliP en condiciones de estrés y por otro lado, las bacterias que poseen niveles disminuidos de este biopolímero son incapaces de sobrevivir a la fase estacionaria de crecimiento y son más sensibles al estrés térmico, oxidativo y osmótico [Sureka y col., 2007].

En cuanto al metabolismo de los poliP, las enzimas más importantes involucradas en su biosíntesis y degradación son las polifosfato quinasas (PPK), las cuales catalizan la polimerización reversible de la cadena de poliP preferentemente a partir de ATP (PPK1) o GTP (PPK2) [Ahn y Kornberg, 1990] y la exopolifosfatasa (PPX) que cataliza la degradación de los poliP a fosfato inorgánico (Pi) [Akiyama y col., 1993]. Si bien, a pesar de que se ha demostrado la existencia de los poliP en muchos organismos, en muchas ocasiones no se conoce la enzima encargada de su síntesis o degradación [Rao y col., 2009].

6.2 Funciones de los poliP

Entre las numerosas funciones que se le atribuyen a los poliP en los microorganismos se encuentran: 1) fuente energética para la síntesis de ATP; 2) sustituto del ATP en las reacciones de fosforilación; 3) reserva de Pi; 4) control osmótico; 5) quelante de cationes bivalentes; 6) amortiguador intracelular de iones alcalinos; 7) elemento estructural junto con el poli- β -hidroxibutirato y el Ca^{2+} en la membrana de células competentes para la transformación bacteriana; 8) regulador del desarrollo celular; 9)

componente de la cápsula bacteriana y 10) regulador de procesos relacionados con el estrés y la sobrevivencia [Kornberg y col., 1999].

El PoliP es sustituto del ATP en las reacciones de fosforilación, posee variados grupos aceptores de Pi como los azúcares y los ácidos grasos, entre otros. Algunas glucoquinasas utilizan ATP o poliP como donante de grupos Pi, mientras que las especies más antiguas filogenéticamente hablando poseen una estricta preferencia por los poliP, como en el caso de la glucoquinasa de *Microlunatus phosphovorius* [Hsieh y col., 1993; Kornberg, 1995; Tanaka y col., 2003].

El fosfato es un elemento esencial para la célula. El poliP es capaz de mantener la homeostasis del fosfato [Kornberg, 1995]. En *E. coli*, los niveles intracelulares de PoliP se mantienen en un rango pequeño cercano a 10 mM, mientras que en los medios extracelulares pueden variar su concentración hasta en seis órdenes de magnitud [Rao y col., 2009]. Se ha demostrado también en diversos organismos que ante la carencia de fosfato en el medio los niveles de poliP disminuyen [Vera y col., 2008].

Dadas las características de polianión del poliP, este puede actuar como quelante de metales y participa en la detoxificación de algunos metales pesados (Zn, Fe, Cu y Cd) mediante la unión a éstos, reduciendo su toxicidad como cationes libres. Además, la entrada de los metales catiónicos a la célula estimula la actividad exopolifosfatasa [Keasling y Hupf, 1996]. En la bacteria *Acinetobacter johnsonii* los iones de los metales bivalentes y el Pi son excretados como un quelato mediante el sistema simporte $\text{MeHPO}_4/\text{H}^+$ [Van Veen y col., 1994]. En *Acidithiobacillus ferrooxidans*, el ion cúprico estimula la degradación de los poliP y además produce un incremento en el flujo de salida de fosfato [Alvarez y Jerez, 2004].

El poliP interactúa además con las proteínas básicas (e.g. histonas) y con dominios básicos de proteínas como las polimerasas y las proteínas nucleares no-histonas [Offenbacher y Kline, 1984], interacción que relaciona a los poliP con la regulación de la expresión génica.

Dado que los niveles de los poliP varían en respuesta a las condiciones nutricionales, existe la posibilidad de que éstos formen parte de una red de respuestas que regulan las etapas del ciclo celular y el desarrollo. En *Escherichia coli* existe otra enzima con actividad exopolifosfatasa, la guanosina pentafofato hidrolasa, que produce guanosina tetrafofato (ppGpp), un segundo mensajero en la respuesta bacteriana ante el estrés. Durante la carencia de aminoácidos, la enzima RelA genera guanosina pentafofato (pppGpp) a partir de ppGpp, que inhibe la hidrólisis de poliP por la exopolifosfatasa (PPX), lo que permite su acumulación [Rap y col., 1998].

Otro factor importante para la regulación génica durante la fase estacionaria de crecimiento es el factor RpoS (σ^S), cuya transcripción se estimula por los altos niveles de ppGpp y que controla la respuesta transcripcional de más de 50 genes en cascadas que contribuyen al ajuste metabólico necesario para la dormancia y la respuesta frente a situaciones de estrés. El factor RpoS también se encuentra involucrado en la patogenicidad bacteriana en animales y protozoos [Hengge-Aronis, 2002].

6.3 Biosíntesis y degradación de los poliP

En *Escherichia coli* los principales genes relacionados con el metabolismo de los poliP se encuentran ubicados en un operón *poliP*, el cual se compone del gen *ppk1* y siete bases río abajo el gen *ppx*. Ambos genes codifican las enzimas responsables de

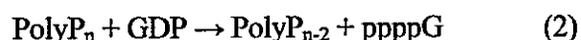
la síntesis y degradación de los poliP [Akiyama y col., 1993]. En cuanto a la regulación del operón *poliP*, se postula que sería regulado por el sistema de dos componentes *PhoBR*, aunque evidencias posteriores sugieren lo contrario [Lee y col., 2006].

Polifosfato quinasa 1 (PPK1). En bacterias, la síntesis de poliP se realiza principalmente mediante la polimerización reversible del fosfato terminal proveniente del ATP, por acción de la enzima polifosfato quinasa (PPK1) (ecuación 1) [Ahn y Kornberg, 1990]. Esta enzima se identificó por primera vez en *Escherichia coli*, asociada a la membrana interna. Está presente en una gran variedad de genomas bacterianos, incluyendo diversos patógenos humanos, en donde se ha demostrado que la PPK1 juega un papel esencial en los procesos relacionados con la infección y la virulencia (e.g., *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella Dublín* y *Vibrio Cholera*). Esta característica hace de la PPK1 un interesante blanco para el diseño de fármacos antimicrobianos [Zhu y col., 2003; Zhu y col., 2005]. Se ha descrito también, que la PPK1 está relacionada en procesos como la formación de biopelículas, la predación, la motilidad y el quorum sensing [Shi y col., 2004].

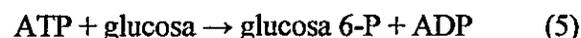
Pese a que la PPK1 está ampliamente distribuida en las bacterias, sólo un gen ortólogo ha sido reportado en eucariontes, específicamente en el organismo *Dictyostelium discoideum* (DdPPK1) [Zhang y col., 2005]. Los eucariontes superiores carecen de PPKs [Brown y Kornberg, 2004]. Estudios recientes sugieren que la producción mitocondrial de los poliP en células de mamíferos estaría

relacionada con el metabolismo energético y el consumo de energía [Pavlov y cols., 2010].

Otra actividad de la PPK1 es transferir un grupo pirofosfato desde el poliP al GDP, para formar ppppG lineal (ecuación 2) [Kuroda y Kornberg, 1997].



Utilización y degradación de los poliP. El poliP puede ser utilizado como sustrato por las fosfotransferasas y las hidrolasas, las cuales permiten generar ATP y fosfato inorgánico a partir de poliP. Mediante la acción combinada de la AMP-fosfotransferasa (ecuación 3) y la PPK1 (ecuación 4), el AMP es convertido a ATP, el cual puede ser utilizado por las glucoquinasas para formar glucosa 6-fosfato (ecuación 5) [Bonting y col., 1991; Ahn y Kornberg, 1990; Hsieh y col., 1993].



En algunas bacterias existe un ortólogo de la PPK1 denominado PPK2. Esta enzima, si bien es capaz de sintetizar poliP a partir de GTP y/o ATP, su función celular fundamental es la reacción reversa, es decir, la síntesis de GTP a partir de poliP y GDP [Zhang y col., 2002; Ishige y col., 2002; Nocek y col., 2008].

Por otra parte, las hidrolasas o *Exopolifosfatasas* son enzimas que hidrolizan los enlaces de los fosfatos terminales de las cadenas de poliP para liberar Pi y se encuentran en una gran variedad de organismos. En *Escherichia coli*, la PPX es altamente procesiva e hidroliza por completo las cadenas de hasta 1.000 residuos fosfato sin liberar intermediarios. Posee múltiples sitios de unión a los poliP en distintos dominios de la enzima, los que son responsables del reconocimiento del tamaño del biopolímero [Bolesch y Keasling, 2000].

6.4 Estudios transcriptómicos del metabolismo de los PoliP en *E. coli*

Escherichia coli posee las enzimas PPK1 y PPX codificadas en el operón *poliP*, pero carece de la enzima PPK2, responsable de sintetizar poliP reversiblemente a partir de GTP. Esta bacteria no es capaz de acumular grandes cantidades de poliP (0.1- 50 mM), pero la carencia de este biopolímero afecta su sobrevivencia en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano [Kornberg y col., 1999].

Las ventajas de *Escherichia coli* como bacteria modelo se deben al desarrollo de métodos eficientes de biología molecular, la facilidad de su manipulación genética y a la completa secuenciación de su genoma. Esto nos ha permitido obtener las cepas mutantes de los genes *ppk1* y *ppx*, así como también del doble mutante que carece del operón *poliP*.

Los estudios de microarreglos de DNA hechos previamente en nuestro laboratorio compararon a nivel transcriptómico las mutantes de *E. coli* relacionadas con el metabolismo de los poliP, revelando alteraciones en distintas vías del metabolismo central, incluyendo al ciclo de Krebs, la fermentación, la respiración aeróbica y la respiración anaeróbica. Estos mismos estudios también mostraron alteraciones en la

máquina flagelar de la bacteria y relacionan a los poliP con la síntesis de segundos mensajeros y la transcripción de factores sigma. A su vez, los análisis bioinformáticos en *E. coli* se ven favorecidos debido a la cantidad de datos que se han generado tanto de genómica funcional, de proteómica así como otros estudios a gran escala. Esto ha permitido la creación de bases de datos que integran todas las aproximaciones a gran escala, como el caso de EcoCyc, que reúne información tanto a nivel transcripcional como a nivel post-transcripcional y a nivel de las proteínas [Keseler y col., 2011].

Los antecedentes a nivel transcriptómico presentados involucran a los poliP en la regulación de la expresión de los genes relacionados con los procesos celulares que le permiten a las bacterias sobrevivir y adaptarse a condiciones de estrés y carencias nutricionales [Mauriaca y col., 2011]. Sin embargo, los ajustes metabólicos realizados ante la alteración del metabolismo de los poliP no se han estudiado en profundidad.

6.5 La proteómica como herramienta para el estudio de los poliP

Debido a que los poliP están relacionados con varios procesos celulares, se requiere de un estudio a escala global para determinar los procesos celulares y las proteínas involucradas en las condiciones en las que el metabolismo de los poliP es alterado.

Complementar los estudios a escala global realizados a nivel transcriptómico con estudios a nivel proteómico nos permitirá obtener una visión integrada de la respuesta celular. Así, es posible obtener información acerca de la transcripción, la regulación genética y la expresión, localización e interacción de las proteínas. Un

análisis bioinformático de esto permitirá generar hipótesis biológicas que expliquen lo que sucede cuando se altera el metabolismo de los poliP.

Los proteomas o subproteomas pueden separarse y visualizarse según el punto isoelectrónico (isoelectroenfoque, IEF) y la masa molecular mediante la técnica denominada 2D-PAGE (electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida), una de las pioneras y más eficientes metodologías para este objetivo [O'Farrel y col., 1977]. El patrón de expresión de las proteínas de un organismo sometido a diferentes condiciones puede compararse de manera cualitativa y cuantitativa. El aumento o la disminución de una proteína entrega información acerca de su expresión diferencial, mientras que la intensidad del cambio informa, de forma cuantitativa, sobre el nivel de expresión de la proteína [Graves y Haystead, 2002].

La visualización de las proteínas en los geles permite analizarlas por espectrometría de masas y buscar los péptidos obtenidos en las bases de datos disponibles para su identificación [Monteoliva y Albar, 2004].

Con los avances tecnológicos ha sido posible perfeccionar estas técnicas, al punto de hacer de la proteómica un estudio 100% cuantitativo, lo que se ha denominado proteómica cuantitativa o Q-Proteómica. Estas nuevas metodologías se basan en el marcaje de las proteínas de un proteoma con reactivos que presentan diferencias isotópicas en sus pesos moleculares, de manera que al comparar dos muestras provenientes de condiciones distintas, la identificación de una proteína se remita a la diferencia de peso existente entre las dos versiones del marcador isotópico [Paradela y col., 2010]. La proteómica puede usarse como metodología complementaria a la transcriptómica (microarreglos de DNA), entregando información sobre los niveles

de transcripción de un gen y de la abundancia relativa de la proteína codificada por ese gen.

Conocer los ajustes experimentados por las bacterias ante la alteración del metabolismo de los poliP, permitiría disponer de información sobre el efecto pleiotrópico de esta molécula, con lo que podrían diseñarse estrategias que contemplen a las enzimas relacionadas con el metabolismo de los poliP como posibles blancos de drogas o de posibles estudios de mejoramiento de algunos procesos metabólicos como la biorremediación de fosfato. Con este objetivo, se utilizará la proteómica diferencial, a nivel cualitativo (2D-PAGE) y cuantitativo (ICPL), como metodologías para estudiar los efectos de la alteración del metabolismo de los polifosfatos inorgánicos en la bacteria *E. coli*.

7 OBJETIVOS

7.1 General

Estudios mediante proteómica cuantitativa de la expresión diferencial del proteoma de *Escherichia coli* K12 (extracto total y extracelular) en diferentes cepas mutantes en el metabolismo de los poliP.

7.2 Específicos

- Determinar los cambios en el proteoma de los mutantes de *Escherichia coli* K12 deficientes en las enzimas relacionadas con el metabolismo de los polifosfatos inorgánicos con respecto a una cepa control mediante análisis de proteómica cuantitativa (Q-Proteómica) mediante la técnica de marcaje isotópico de las proteínas (ICPL).
- Análisis bioinformático de las categorías funcionales y de las redes regulatorias relacionadas con los cambios a nivel proteómico del metabolismo de los poliP.
- Análisis del subproteoma extracelular de las mismas cepas mutantes de *Escherichia coli* optimizando un protocolo mediante la metodología de los geles bidimensionales (2D-PAGE).

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

8.1.1 Cepas bacterianas

Como modelo de estudio para este trabajo se utilizó la bacteria heterótrofa y neutrófila *Escherichia coli* K12. Los estudios de proteómica diferencial se realizaron con tres cepas mutantes provenientes de la cepa K12 de *Escherichia coli*. Estas cepas mutantes presentan deleciones para los genes que codifican para las enzimas relacionadas con el metabolismo de los polifosfatos inorgánicos. La primera cepa recombinante carece de la enzima polifosfato kinasa 1 (PPK1) lo que la inahibilita para sintetizar poliP ($\Delta ppk1$). La segunda, carece de la enzima exopolifosfatasa (PPX) lo que no permite la degradación del poliP para la liberación de fosfato inorgánico (P_i) (Δppx), mientras que la tercera cepa es una doble mutante que carece del operón *poliP* completo, es decir $\Delta ppk1$ y Δppx , por lo que es incapaz de metabolizar (sintetizar y degradar) los poliP ($\Delta poliP$). Todas las cepas mutantes fueron generadas en trabajos previos de nuestro laboratorio realizados por Cecilia Mauriaca. Las cepas utilizadas para este trabajo se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas utilizadas en este trabajo y sus principales características relacionadas con el metabolismo de los poliP. A cada cepa se le asigna la abreviación con la que será referida a lo largo de este trabajo.

Cepa bacteriana	Característica
Wt	Cepa control
$\Delta ppk1$	Cepa mutante en el gen <i>ppk1</i> , enzima encargada de la síntesis de los poliP.
Δppx	Cepa mutante en el gen <i>ppx</i> , enzima que degrada los poliP para liberar Pi.
$\Delta poliP$	Cepa carente del operón poliP (<i>ppk1</i> y <i>ppx</i>) por lo que no es capaz de metabolizar los poliP

8.1.2 Medios de cultivo

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio Luria-Bertani sólido y líquido (LB: Triptona 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L) [Sambrook y Russell, 2001]. Para el medio líquido se utilizaron matraces de 1 L en los cuales se agregaron 200 mL de medio de cultivo. En el caso del medio sólido (placas) el medio líquido fue suplementado con concentración de agar de 1,5% (p/v).

Para los cultivos en matraces se realizaron precultivos en tubos de ensayo con 5 mL de medio líquido los cuales fueron inoculados con colonias aisladas seleccionadas a partir de un cultivo en placa. En el caso del cultivo en matraces se inoculó con una razón 1/200. Para el caso de los cultivos en placas se realizaron aislamientos a partir de precultivos de cada cepa. Las cepas se mantuvieron en glicerol al 50% (v/v) a -80 °C.

8.1.3 Condiciones de cultivo

Todos los cultivos bacterianos se crecieron en condiciones aeróbicas y fueron incubados a 37 °C con agitación de 150 rpm. En el caso de los cultivos líquidos se incubó hasta alcanzar una DO de 1,5 medidos a 600 nm correspondiente a la fase

exponencial de crecimiento. En el caso de los cultivos en placas, estos fueron incubados a 35 °C durante 24 h.

8.2 Métodos de proteómica

Se utilizó la técnica de marcaje isotópico de proteínas (ICPL) para analizar los proteomas totales mientras que los proteomas extracelulares se analizaron mediante geles bidimensionales (2D-PAGE).

8.2.1 Preparación de los extractos totales de las proteínas

Los cultivos en matraces con medio líquido fueron centrifugados durante 15 min a 6.000 rpm a 25 °C. Luego se descartó el sobrenadante. El precipitado de células se resuspendió con 2000 µL de tampón de sonicación (Tris 40 mM pH 8,15) y se trasladó a tubos de 1500 µL donde se lavó el pellet tres veces con 1000 µL de tampón de sonicación y se centrifugó a 13.200 rpm a 4 °C por 10 min entre cada lavado. El precipitado se resuspendió en 800 µL de tampón de sonicación y se le agregó 9 µL de PMSF 1 mM (inhibidor de proteasas) y 10 µL de RNAsa 10 mg/mL. Luego se completó la lisis celular mediante sonicación en hielo con ciclos de 15 segundos con intervalos de detención de 35 segundos hasta eliminar la turbidez del concentrado de células. Posteriormente se agregaron 10 µL de DNAsa 10 mg/mL y se incubó en hielo por 10 min. La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el reactivo Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad, USA) con BSA como estándar de calibración. Luego, se precipitaron 800 µg de proteínas mediante el sistema Ready-

Prep 2D Cleanup Bio-Rad® (Bio-Rad, USA). El precipitado de proteínas fue guardado a -20 °C y fue enviado al Centro Nacional de Biotecnología en Madrid (España) para su análisis mediante el marcaje con ICPL.

8.2.2 Preparación de las muestras de las proteínas extracelulares

Los cultivos líquidos se centrifugaron a 6.000 rpm por 15 min a 25 °C y el sobredante se filtró con filtros Millipore de 0,22 µm (Millex-GV Filter, 0,22 µm, PVDF). Luego se le agregó Ácido Tricloroacético a una concentración final de 10% (p/v) y se mantuvo a -20 °C por 1 h. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 50 min a 6.000 rpm y 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 2000 µL de Etanol Frío al 96%. La muestra resuspendida se traspasó a un tubo de 1,5 mL y se centrifugó 10 min a 13.200 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó tres veces con Etanol Frío al 96% con centrifugaciones de 13.200 rpm por 10 min a 4 °C entre cada lavado. Tras el último lavado, se descartó el sobrenadante y el precipitado de proteínas fue secado mediante Speedvac a 35 °C por 15 min. Posteriormente las proteínas fueron disueltas en 250 µL de tampón de isoelectroenfoque (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 4%, Azul de Bromofenol 0,0002%) para ser corridas en la primera dimensión.

8.2.3 Análisis de proteómica cuantitativa mediante el marcaje isotópico de proteínas (ICPL)

Este análisis fue realizado en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid (España) de acuerdo al protocolo detallado por los investigadores de dicho instituto [Paradela y cols., 2010]. Brevemente, el procedimiento de esta técnica se describe a continuación. Se tomaron 100 µg de cada muestra a comparar y se redujeron y alquilaron con reactivo de Cleland (DTT) y Iodoacetamida, respectivamente. Luego, las muestras fueron marcadas con el reactivo ICPL (en su forma liviana para la muestra wt y en su forma pesada para la mutante) y se mezclaron las muestras a comparar en una razón 1:1. Posteriormente se realizó una electroforesis monodimensional en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) y se cortaron las bandas obtenidas para ser sometidas a una digestión proteolítica con Tripsina. Los péptidos obtenidos fueron identificados mediante un análisis de cromatografía líquida acoplada a una ionización electrónica en forma de “spray” y cuantificados mediante espectrometría de masas en tándem (LC ESI-MS/MS). La información de los péptidos adquirida fue evaluada mediante Mascot y para procesar los datos se utilizó el programa WARP-LC (Bruker Daltonics). Para la identificación de las proteínas el espectro LC ESI-MS/MS fue enfrentado con la base de datos de proteínas SwissProt de *E. coli*. Un resumen de la metodología se observa en la Figura 2. Los resultados de la cuantificación y comparación de las proteínas fueron expresados en Log₂ para visualizar la variación experimentada por cada proteína con respecto a la situación control. Se consideró como significativa la variación de una proteína cuando su tasa de cambio, expresada en Log₂, era superior a +0,6 o inferior a -0,6 [Paradela y cols., 2010]. Se realizaron tres experimentos con

esta metodología en los cuales se comparó la cepa wt con $\Delta ppk1$, con Δppx y con $\Delta poliP$.

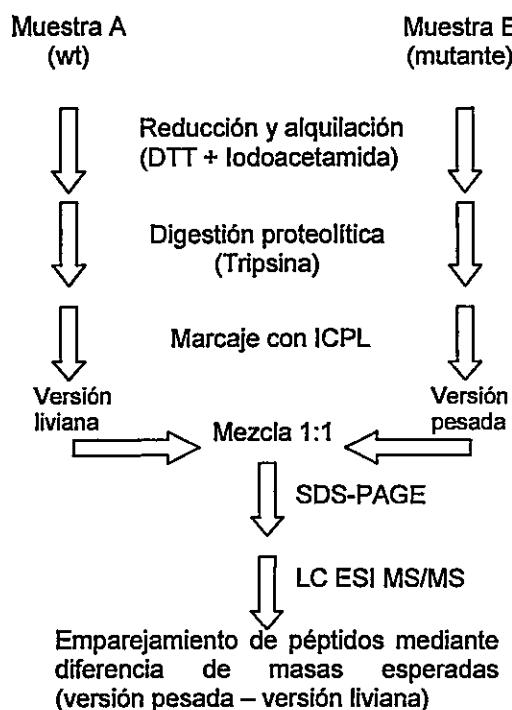


Figura 2. Metodología utilizada para el marcaje isotópico de las proteínas pertenecientes a las muestras estudiadas. El marcaje se realiza a nivel de péptidos para favorecer la cantidad de fragmentos de proteína marcados.

8.2.4 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

-*Primera dimensión (IEF)*: A la muestra resuspendida en tampón IEF se agregó 50 μL de agua nanopura, DTT a una concentración de 100 mM y anfolitos de rango 3-10 ó 5-8 al 0,2%. Luego se incubó la muestra durante 1 h a 25 °C, se centrifugó 10 min a 13.200 rpm y 4 °C y se procedió como se detalla a continuación.

La muestra preparada se agregó a lo largo del canal de la cubeta de focalización del equipo PROTEAN® IEF (Bio-Rad, USA) con una tira de 17 cm de largo con gradientes de pH 5-8 y 3-10 NL (ReadyStrip™ IPG, Bio-Rad, USA) durante 1 h a 20

°C, luego se agregaron 2500 µL de aceite mineral (Bio-Rad, USA) y se programó el paso de rehidratación activa durante 12 h a 50 V a 20 °C, seguido del programa de focalización de 15 min a 250 V; 2 h a 2.000 V; 4 h a 8.000 V y 11 h a 10.000 V, para completar un total de 121.000 Vh a 20 °C.

-Segunda dimensión (SDS-PAGE): Una vez focalizada la muestra, la tira se introdujo en 5 mL de tampón de equilibrio (Urea 6 M, SDS 2%, Tris/HCl 0,05 M pH 8,8, Glicerol 20%) + DTT 1% por 30 min a temperatura ambiente con agitación de 100 rpm y luego en 5 mL de tampón de equilibrio + Iodoacetamida 2,5% durante 30 min a temperatura ambiente con agitación de 100 rpm. Posteriormente, la tira fue corrida en un gel de poliacrilamida al 12,5% montado en el sistema Protean® II xi Cell (Bio-Rad, USA) y sometido a 70 V durante 20 h a temperatura ambiente.

Para la tinción de los geles con plata se fijaron durante 20 min en 150 mL de solución de fijación (Ácido acético 5%, Metanol 50%) y luego los geles se lavaron durante 10 min con 150 mL de Metanol 50% y posteriormente se lavaron dos veces con agua bidestilada durante 15 min por vez. La sensibilización se realizó durante 1 min con 150 mL de solución de Ditionito de sodio 0,025% (p/v) y luego un lavado de 1 min con agua bidestilada. Para la tinción se agregaron 150 mL de solución de tinción (Nitrato de plata 0,012 M, Formaldehído 3%) durante 30 min y un lavado de 1 min con agua bidestilada. Luego, se realizó un revelado por aproximadamente 5 min con 150 mL de solución de revelado (Carbonato de sodio 6%, Tiosulfato de sodio 20 µM, Formaldehído 6 mM). El revelado se detuvo con una solución de ácido acético 3%.

Para las tinciones con Azul de Coomasie la fijación se realizó durante 1 h con 150 mL de solución de fijación (Etanol 50%, Ácido fosfórico 2%), la tinción se llevó a

cabo durante 3 h con 150 mL de solución “Blue Silver” (CBB G-250 0,12%, Ácido fosfórico 10%, Sulfato de amonio 10%, Metanol 20%) y se destiñó con agua bidestilada.

8.2.5 Selección de proteínas desde los geles de poliacrilamida

Las imágenes digitales obtenidas de los geles de poliacrilamida fueron analizadas *in silico* mediante el software PDQuest 8.0 (Bio-Rad, USA). Debido a la baja reproducibilidad de los geles bidimensionales, lo que dificulta el análisis comparativo entre las muestras, el umbral para considerar la variación de una proteína como significativa fue de un factor de 2,0 veces (95%, $p < 0,05$) [Marengo y cols., 2005] considerando el promedio de tres réplicas biológicas. También se consideró aquellas proteínas que, teniendo una tasa de cambio menor a 2,0, en la inspección visual de los geles su expresión diferencial fue evidente.

8.3 Análisis de enriquecimiento molecular mediante GO Term Finder

La lista de proteínas obtenidas mediante el análisis de proteómica cuantitativa fueron sometidas a un análisis de enriquecimiento mediante la versión disponible online de Gene Ontology (GO) Term Finder (<http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder>), que se desarrolló con la finalidad de establecer un lenguaje común para describir los aspectos de la biología de un producto génico. El análisis consiste en detectar, entre las tres clasificaciones con las cuales se describe un producto génico (Proceso biológico, Función molecular y Componente celular), qué categorías (GO terms) se ven sobre-representadas en los análisis de proteómica cuantitativa. En los estudios a escala global se obtiene un gran número de datos, correspondientes a listas de

proteínas o genes que cambian sus niveles de expresión. La finalidad de este análisis es ver qué pueden tener en común las proteínas obtenidas en los estudios de proteómica [Boyle y cols., 2004] y compararlos con aquellos resultados obtenidos en los microarreglos de DNA. Se utilizó el 10% que presentó mayor variación (Log_2) de las proteínas que aumentaron y disminuyeron su expresión en cada experimento. Los resultados de este análisis se compararon con los realizados a partir de los resultados obtenidos previamente mediante estudios de microarreglos de DNA.

8.4 Análisis bioinformático de los datos de proteómica y microarreglos

Los datos de proteómica cuantitativa y de microarreglos de DNA fueron analizados con el programa *Pathway Tools* versión 14.5, disponible online en el sitio <http://bioinformatics.ai.sri.com/ptools/> y que cuenta con la base de datos de *Escherichia coli* K12 MG1655. El programa permite visualizar los datos en una vista celular, en el que se observa el mapa metabólico completo de la bacteria y es posible destacar las vías que se encuentran representadas por los datos colectados. También posee una visión genómica, en la que se destacan aquellos genes que se encuentran diferencialmente expresados. Por último, el programa también posee una visualización centrada en las rutas regulatorias, permitiendo ver qué reguladores transcripcionales se encuentran diferencialmente expresados en los datos a analizar. Además, el programa cuenta con herramientas que permiten realizar estudios de enriquecimiento de los datos en cuanto a las categorías de ontología (GO terms), a los reguladores transcripcionales y a las vías metabólicas de *E. coli*.

Para realizar una comparación entre los comportamientos de las proteínas de los distintos mutantes utilizados en este seminario de título se empleó el programa

Multiexperiment Viewer (MeV) v 4.6.1 del grupo TM4, disponible en la red (www.tm4.org), el cual permite hacer clusters de datos y visualizarlos según el nivel de abundancia.

9 RESULTADOS

9.1 Análisis de proteómica cuantitativa en las cepas de *E. coli* K12 mutantes en el metabolismo de los poliP.

La proteómica cuantitativa permite, mediante el marcaje isotópico de los péptidos de un proteoma, comparar dos muestras proteínicas obtenidas en distintas condiciones. Para esto, es necesario extraer las proteínas pertenecientes a la fracción celular deseada para el análisis. En el caso de este estudio, se analizaron las proteínas correspondientes al proteoma total, obtenido según lo descrito en Materiales y Métodos.

Para conocer cuales son los ajustes metabólicos experimentados por las bacterias ante la alteración del metabolismo de los poliP, se complementaron los experimentos de microarreglos previos con estudios a nivel de proteomas con el fin de identificar aquellas proteínas que son expresadas diferencialmente en las distintas mutantes para las enzimas responsables de metabolizar a los poliP en la bacteria *E. coli*. La proteómica cuantitativa presenta como ventaja por sobre la proteómica convencional el hecho de que es posible cuantificar la expresión diferencial de las muestras proteínicas en un solo experimento. Esto, mediante la abundancia de los péptidos que conforman una proteína presente en ambas muestras.

Se hicieron tres experimentos comparativos entre las tres cepas mutantes ($\Delta ppk1$, Δppx y $\Delta poliP$) todos comparativamente con la cepa silvestre (wt). Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 2. De la lista de proteínas identificadas, se consideró como aumento significativo aquellas cuya expresión ($\text{Log}_2[\text{Promedio} - \text{mediana}]$) fuese igual o mayor a 0,6 y se consideró como una disminución

significativa de la expresión a aquellas proteínas cuyo $\text{Log}_2(\text{Promedio} - \text{mediana})$ fuese igual o menor a $-0,6$. La expresión de los datos en esta forma permite visualizar el número de veces en las que una proteína varía su expresión respecto de la condición control, mientras que la diferencia entre el promedio y la mediana permite hacer una corrección estadística del valor obtenido en el promedio. Es necesario señalar que aquellas proteínas cuya variación es infinita, es decir, que solo aparecen en una de las condiciones, no son consideradas en este análisis.

Se considera como significativa una variación de 0,6 veces la expresión, debido a que ese es el punto en el que cambia la pendiente al graficar el Log_2 versus el número de proteínas (Figura 3) [Paradela y cols., 2010]. También es importante señalar que para efectos de tener una mayor precisión y validez en los datos, sólo se consideraron aquellas proteínas que presentaron a lo menos 2 péptidos para su cuantificación.

Tabla 2. Resumen de los resultados obtenidos en el análisis de proteómica cuantitativa por ICPL.

Experimento	Péptidos totales	Péptidos cuantificados	Proteínas identificadas	Proteínas con variación significativa
Wt v/s $\Delta ppk1$	3.183	2.025	325	151
Wt v/s Δppx	2.457	1.558	270	122
Wt v/s $\Delta poliP$	3.113	1.794	313	55

En resumen y aplicando estos criterios de selección, se identificaron un total de 328 proteínas expresadas diferencialmente en todas las cepas mutantes del metabolismo de los poliP. En la cepa mutante $\Delta ppk1$, 151 proteínas fueron expresadas diferencialmente con respecto a la cepa control (aproximadamente un 47% de las identificadas), 121 (45%) proteínas para el caso de la cepa mutante Δppx y 53 (18%) en el caso de la cepa doble mutante $\Delta poliP$.

La Tabla 3 presenta en detalle aquellas proteínas que aumentaron su expresión con respecto a la cepa control, mientras que la Tabla 4 muestra las proteínas que disminuyeron su expresión comparadas con la cepa control (wt).

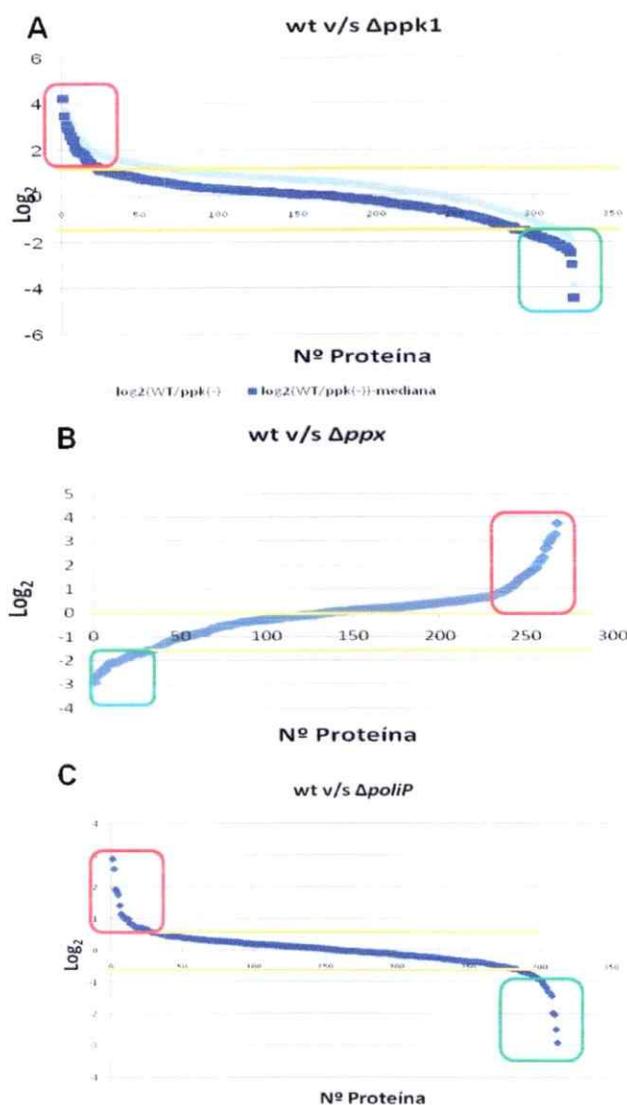


Figura 3. Dispersión de los datos obtenidos mediante proteómica cuantitativa para la comparación de las cepas mutantes con la cepa control. A) wt versus $\Delta ppk1$, B) wt versus Δppx , C) wt versus $\Delta poliP$. Se observa en A) la corrección de los valores realizada al restar la mediana al promedio, como también los puntos de inflexión de la curva de dispersión situados a 0,6 y -0,6 (línea amarilla) correspondientes a los puntos de corte para considerar una variación significativa en la expresión diferencial de una proteína. En recuadro rojo se agrupan las proteínas que aumentan y en recuadro verde aquellas que disminuyen sus niveles respecto al control.

Tabla 3. Detalle de las proteínas que aumentaron su expresión respecto a la condición control en los análisis de proteómica cuantitativa. #Pept.correponde a los péptidos identificados y #(L/H) a los péptidos empleados para la cuantificación.

Proteína	Puntuación	% cobertura	# Pept.	# (L/H)	Prom.	log ₂ (Prom. - mediana)	Cepa mutante
Proteína HU-alfa de unión a DNA	506,86	61,11	15	10	1,01	0,6085	<i>Δppk1</i>
Proteína ribosomal 50S L29	58,38	22,22	4	3	1,01	0,6085	<i>Δppk1</i>
NADH-quinona oxidorreductasa, subunidad C/D	48,58	9,56	6	4	1	0,6229	<i>Δppk1</i>
Formato deshidrogenasa O, subunidad mayor	82,12	2,36	4	3	0,96	0,6818	<i>Δppk1</i>
2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa	45,33	9,43	3	2	0,96	0,6818	<i>Δppk1</i>
Proteína de membrana externa N	123,77	6,1	13	5	0,95	0,6969	<i>Δppk1</i>
Proteasa Clp dependiente de ATP	51,2	6,46	6	5	0,95	0,6969	<i>Δppk1</i>
Proteína periplásmica de unión a cistina	113,64	28,19	8	4	0,95	0,6969	<i>Δppk1</i>
Proteína A de respuesta a carencia estricta de nutrientes	68,77	8,96	2	2	0,94	0,7121	<i>Δppk1</i>
Proteína UPF0076	285,34	39,06	14	7	0,92	0,7432	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	39,39	8,82	3	3	0,9	0,7749	<i>Δppk1</i>
Alquil hidroxiperóxido reductasa, subunidad C	293,09	39,89	13	8	0,89	0,7910	<i>Δppk1</i>
Tiol peroxidasa	165,98	39,28	5	5	0,89	0,7910	<i>Δppk1</i>
D-tagatosa-1,6-bifosfato aldolasa, subunidad gatZ	417,35	21,19	24	12	0,87	0,8238	<i>Δppk1</i>
Chaperonina de 10kDa	293,20	52,57	11	7	0,87	0,8238	<i>Δppk1</i>
Superóxido dismutasa [Fe]	744,55	30,56	24	10	0,86	0,8405	<i>Δppk1</i>
NADH-quinona oxidorreductasa, subunidad B	43,05	9,54	5	4	0,86	0,8405	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	92,74	9,37	2	2	0,86	0,8405	<i>Δppk1</i>
Proteína ribosomal 50S L25	211,05	35,1	8	4	0,85	0,8573	<i>Δppk1</i>
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa tipo FKPB	157,17	17,47	5	3	0,84	0,8744	<i>Δppk1</i>
Ribosa-5-fosfato isomerasa A	79,23	10,5	2	2	0,84	0,8744	<i>Δppk1</i>

Triptofanasa	1384,11	45,64	118	58	0,81	0,9269	<i>Δppk1</i>
Factor A de unión a ribosoma	43,58	13,53	2	2	0,81	0,9269	<i>Δppk1</i>
ATP sintasa, subunidad beta	187,78	18,04	10	8	0,8	0,9448	<i>Δppk1</i>
Proteína F de estrés universal	122,75	22,22	11	5	0,79	0,9630	<i>Δppk1</i>
Proteína G de estrés universal	65,49	7,04	3	2	0,78	0,9810	<i>Δppk1</i>
Proteína de membrana externa F	585,26	25,41	40	18	0,78	0,9813	<i>Δppk1</i>
Fosfotransferasa componente IIA, específico de galactitol	210,70	44	14	4	0,77	1	<i>Δppk1</i>
Glicerol quinasa	104,25	16,13	7	7	0,76	1,0188	<i>Δppk1</i>
Proteína periplásmica de unión a lisina-arginina-ornitina	94,45	14,61	3	2	0,75	1,0379	<i>Δppk1</i>
Proteína HU-beta de unión a DNA	82,83	31,11	4	4	0,74	1,0573	<i>Δppk1</i>
Fumarato hidratasa clase II	104,26	10,27	7	4	0,73	1,0769	<i>Δppk1</i>
Proteína A de shock por fago	88,63	20,27	10	8	0,71	1,1170	<i>Δppk1</i>
Proteína periplásmica de unión a maltosa	116,24	15,40	6	4	0,71	1,1170	<i>Δppk1</i>
Proteína CsiD	107,1	14,46	4	4	0,71	1,1170	<i>Δppk1</i>
Nucleósido bifosfato quinasa	193,65	51,04	11	6	0,69	1,1582	<i>Δppk1</i>
Dihidrolipoil deshidrogenasa	329,36	16,24	18	8	0,67	1,2006	<i>Δppk1</i>
Proteína CspC tipo shock frío	134,46	26,08	6	3	0,66	1,2223	<i>Δppk1</i>
Superóxido dismutasa [Mn]	69,88	9,22	2	2	0,66	1,2223	<i>Δppk1</i>
Aminometiltransferasa	57,26	4,67	2	2	0,64	1,2667	<i>Δppk1</i>
Fosfotransferasa componente IIB, específico de galactitol	112,92	51,06	10	7	0,63	1,2895	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	69,75	6,1	9	7	0,62	1,3125	<i>Δppk1</i>
Serina hidroximetiltransferasa	42,84	7,43	3	3	0,62	1,3125	<i>Δppk1</i>
Aspartoquinasa/homoserina deshidrogenasa 1 bifuncional	79,63	4,39	5	3	0,61	1,3360	<i>Δppk1</i>
Succinil coA ligasa, subunidad beta	767,27	34,53	36	21	0,6	1,3598	<i>Δppk1</i>
Isocitrato deshidrogenasa	391,26	24,51	30	19	0,6	1,3598	<i>Δppk1</i>
Galactitol-1-fosfato-5-deshidrogenasa	352,37	21,09	17	10	0,6	1,3598	<i>Δppk1</i>
Catalasa-peroxidasa	403,88	11,01	20	14	0,59	1,3841	<i>Δppk1</i>
Succinato-semialdehído deshidrogenasa	156,21	9,12	6	5	0,58	1,4088	<i>Δppk1</i>
Proteína bifuncional PutA	1008,12	25,37	51	33	0,55	1,4854	<i>Δppk1</i>
D-tagatosa-1,6-bifosfato aldolasa, subunidad gatY	195,19	28,52	25	15	0,54	1,5118	<i>Δppk1</i>

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa A	201,95	16,66	11	9	0,54	1,5118	<i>Δppk1</i>
2-oxoglutarato deshidrogenasa, componente E1	205,69	7,71	11	8	0,54	1,5118	<i>Δppk1</i>
4-aminobutirato aminotransferasa	346,29	16,9	13	7	0,54	1,5118	<i>Δppk1</i>
Succinato deshidrogenasa, flavoproteína	211,73	14,62	14	9	0,53	1,5388	<i>Δppk1</i>
Proteína CII de unión a factor sigma	46,36	15,03	3	2	0,53	1,5388	<i>Δppk1</i>
Enzima málica dependiente de NADP	121,95	15,81	17	11	0,51	1,5943	<i>Δppk1</i>
Probable hipoxantina oxidasa	86,21	4,18	5	4	0,5	1,6229	<i>Δppk1</i>
Glucosa-1-fosfatasa	149,89	15,73	8	4	0,49	1,6520	<i>Δppk1</i>
D-aminoácido deshidrogenasa, subunidad chica	106,21	7,4	3	3	0,49	1,6520	<i>Δppk1</i>
Fumarato hidratasa clase I, anaeróbica	84,8	4,37	3	2	0,47	1,7121	<i>Δppk1</i>
Dihidrolipoilisina-residuo succiniltransferasa							<i>Δppk1</i>
componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa	324,46	24,44	26	16	0,46	1,7432	
Proteína periplásmica de unión a L-arabinosa	39,73	5,77	3	2	0,46	1,7432	<i>Δppk1</i>
Proteína periplásmica de unión a D-ribosa	267,29	34,79	11	7	0,44	1,8073	<i>Δppk1</i>
Succinato deshidrogenasa, subunidad Fe-S	301,89	36,13	10	8	0,43	1,8405	<i>Δppk1</i>
Proteína periplásmica de unión a glutamina	137,38	29,43	8	6	0,43	1,8405	<i>Δppk1</i>
Xantina deshidrogenasa, subunidad de unión a FAD	63,09	8,56	2	2	0,43	1,8405	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	270,23	18,93	12	10	0,41	1,9092	<i>Δppk1</i>
Proteína de membrana externa W	247,88	17,92	8	4	0,41	1,9092	<i>Δppk1</i>
Malato sintasa A	113,78	8,81	5	3	0,41	1,9092	<i>Δppk1</i>
Aconitato hidratasa 2	1076,15	31,67	62	30	0,4	1,9448	<i>Δppk1</i>
Malato deshidrogenasa	784,33	33,97	34	17	0,39	1,9813	<i>Δppk1</i>
Galactitol permeasa, componente IIC	79,15	6,2	9	5	0,39	1,9813	<i>Δppk1</i>
Succinil coA ligasa, subunidad alfa	423,97	33,21	21	12	0,38	2,0188	<i>Δppk1</i>
Proteína periplásmica de unión a D-galactosa	402,17	32,53	16	10	0,37	2,0573	<i>Δppk1</i>
Citrato sintasa	336,53	23,88	22	13	0,36	2,0968	<i>Δppk1</i>
Lactaldehído deshidrogenasa	627,41	38,83	28	18	0,35	2,1375	<i>Δppk1</i>
Fumarato hidratasa clase I, aeróbica	122,33	9,48	6	6	0,35	2,1375	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	235,27	25,8	14	11	0,32	2,2667	<i>Δppk1</i>
L-lactato deshidrogenasa	176,07	7,82	5	3	0,32	2,2667	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	79,31	8,25	5	3	0,32	2,2667	<i>Δppk1</i>

Activador transcripcional del operón Mhp	60,63	8,3	3	3	0,32	2,2667	<i>Δppk1</i>
Probable repetido de anquirina B	42,56	8,54	5	2	0,3	2,3598	<i>Δppk1</i>
Malato sintasa G	464,32	19,91	25	20	0,29	2,4088	<i>Δppk1</i>
Ácido graso de cadena larga-coA ligasa	102,55	6,23	4	3	0,27	2,5118	<i>Δppk1</i>
Acetil coenzima A sintetasa	683,37	32,2	26	19	0,19	3,0188	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	42,46	7,73	2	2	0,07	4,4594	<i>Δppk1</i>
Proteína ribosomal 30S S10	103,63	50,49	5	3	2,49	0,6026	<i>Δppx</i>
Proteína triada de histidina (HIT)	95,38	25,21	2	2	2,49	0,6026	<i>Δppx</i>
Transportador de eflujo, tipo RND, subunidad MFP	64,98	16,10	4	2	2,51	0,6141	<i>Δppx</i>
Exportador de proteínas SecB	76,20	9,68	2	2	2,55	0,6369	<i>Δppx</i>
Proteína HflC	51,71	7,19	2	2	2,57	0,6482	<i>Δppx</i>
Canal mecanosensible de larga conductancia	80,96	20,59	3	2	2,57	0,6482	<i>Δppx</i>
Corismato mutasa	48,63	4,02	3	2	2,58	0,6538	<i>Δppx</i>
Fosfoenolpiruvato-proteína fosfotransferasa	95,25	11,48	11	7	2,6	0,6649	<i>Δppx</i>
Dominio de proteína ThiJ/Pfpl	70,18	10,25	2	2	2,6	0,6649	<i>Δppx</i>
Acetato quinasa	162,05	18,00	4	3	2,63	0,6815	<i>Δppx</i>
Expresión A dependiente de HNS	73,38	31,82	2	2	2,63	0,6815	<i>Δppx</i>
Fructosa-bifosfato aldolasa	309,00	24,86	8	6	2,71	0,7247	<i>Δppx</i>
Proteína hipotética no caracterizada	81,25	11,34	3	3	2,71	0,7247	<i>Δppx</i>
Proteína ribosomal 50S L7/L12	171,11	33,88	6	3	2,85	0,7974	<i>Δppx</i>
Regulador transcripcional de dos componentes, familia de hélice alada	46,47	13,87	3	2	2,9	0,8225	<i>Δppx</i>
Bacterioferritina	142,67	25,95	5	3	2,96	0,8520	<i>Δppx</i>
Fosfopentomutasa	422,84	17,69	9	7	2,99	0,8666	<i>Δppx</i>
Isocorismatasa hidrolasa	143,16	5,29	2	2	3	0,8714	<i>Δppx</i>
Proteína ferritina familia Dps	655,86	53,89	23	13	3,06	0,8999	<i>Δppx</i>
Transaldolasa	122,20	18,99	5	5	3,34	1,0263	<i>Δppx</i>
1-pirrolina deshidrogenasa	78,54	6,33	3	2	3,36	1,0349	<i>Δppx</i>
Proteína de membrana externa relacionada con la virulencia	140,24	25,73	3	3	3,38	1,0434	<i>Δppx</i>
Proteína hipotética no caracterizada	126,09	10,89	2	2	3,59	1,1304	<i>Δppx</i>
Proteína familia OsmC	110,08	41,26	6	4	3,77	1,2010	<i>Δppx</i>
Proteína de shock térmico HslVU, ATPasa subunidad HslU	39,62	9,93	4	2	3,77	1,2010	<i>Δppx</i>
Asociado a transporte	110,00	31,84	4	3	4,06	1,3079	<i>Δppx</i>
Fosforilasa	106,36	6,27	5	4	4,39	1,4206	<i>Δppx</i>

Factor de integración subunidad alfa	86,55	38,38	5	3	4,54	1,4691	<i>Δppx</i>
Proteína SsnA del metabolismo del selenio	51,39	3,62	2	2	4,63	1,4974	<i>Δppx</i>
Endorribonucleasa L-PSP	111,02	17,05	2	2	4,758	1,5368	<i>Δppx</i>
Lipoproteína de membrana externa, familia Slp	179,00	30,32	8	6	4,83	1,5584	<i>Δppx</i>
GMP sintasa, subunidad grande	80,56	4,19	2	2	5,23	1,6732	<i>Δppx</i>
Catalasa	107,94	7,57	6	5	5,36	1,7086	<i>Δppx</i>
Proteína ribosomal 50S L32	56,20	33,33	2	2	5,38	1,7140	<i>Δppx</i>
Unión a Peptidoglicano LysM	351,00	73,83	15	7	5,88	1,8422	<i>Δppx</i>
Proteína familia CsbD	123,23	56,52	8	4	5,91	1,8496	<i>Δppx</i>
Exodeoxirribonucleasa 7 subunidad grande	40,82	3,73	3	2	6,01	1,8738	<i>Δppx</i>
Piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa región de dimerización	43,90	6,01	2	2	6,94	2,0813	<i>Δppx</i>
Proteína hipotética estructural	84,10	16,41	2	2	7,08	2,1102	<i>Δppx</i>
Transportador ABC de aminoácidos cationicos, proteína de unión periplásmica	72,86	13,08	3	2	8	2,2864	<i>Δppx</i>
Proteína hipotética no caracterizada	107,55	21,98	2	2	8,09	2,3026	<i>Δppx</i>
Alanil-tRNA sintetasa	53,76	3,65	4	2	10,46	2,6732	<i>Δppx</i>
Lipoproteína, familia YaeC	50,38	7,01	2	2	10,69	2,7046	<i>Δppx</i>
Glutamato descarboxilasa	757,19	23,61	28	17	12,34	2,9117	<i>Δppx</i>
Glutamato descarboxilasa	783,33	24,89	29	18	13,34	3,0241	<i>Δppx</i>
Transcetolasa	51,19	4,50	3	3	14,85	3,1788	<i>Δppx</i>
Glutamato/ g-aminobutirato antiportador	158,32	8,81	6	5	15,36	3,2275	<i>Δppx</i>
ATP sintasa	59,38	9,04	3	2	15,87	3,2746	<i>Δppx</i>
Glicil-tRNA sintetasa, subunidad beta	38,55	4,50	3	2	21,91	3,7399	<i>Δppx</i>
Glucósido hidrolasa familia 38	52,42	4,33	3	2	6,62	2,8788	<i>ΔpoliP</i>
Peptidasa M48 Ste24p	85,22	12,30	3	2	5,33	2,5661	<i>ΔpoliP</i>
(P)ppGpp sintetasa I, SpoT/RelA	42,80	2,42	4	3	3,39	1,9133	<i>ΔpoliP</i>
Porina tipo Gram-negativo	196,40	16,85	9	7	3,25	1,8524	<i>ΔpoliP</i>
Ferroxidasa	113,03	16,36	4	2	3,02	1,7466	<i>ΔpoliP</i>
RNA metilasa hipotética	43,38	6,41	4	3	2,4	1,4150	<i>ΔpoliP</i>

Activador plasminógeno Pla	50,56	8,52	3	3	1,99	1,1448	<i>ΔpoliP</i>
Exportador de proteínas, proteína de membrana SecD	41,70	2,98	4	3	1,92	1,0931	<i>ΔpoliP</i>
Proteasa La dependiente de ATP	120,56	8,16	6	4	1,83	1,0238	<i>ΔpoliP</i>
Proteína ribosomal 30S S18	198,58	40,00	5	4	1,8	1,0000	<i>ΔpoliP</i>
Reductasa dependiente de NADPH FMN	41,18	7,98	3	3	1,79	0,9920	<i>ΔpoliP</i>
Fosfoenolpiruvato sintasa	133,15	8,46	6	4	1,78	0,9839	<i>ΔpoliP</i>
Regulador transcripcional de dos componentes, familia de hélice alada	46,11	7,56	2	2	1,62	0,8480	<i>ΔpoliP</i>
Fumarato hidratasa, clase II	55,90	7,49	5	5	1,6	0,8301	<i>ΔpoliP</i>
ADP-L-glicero-D-mano-heptosa-6-epimerasa	122,20	10,32	3	3	1,58	0,8119	<i>ΔpoliP</i>
Proteína de shock térmico Hsp90	102,42	11,22	7	3	1,55	0,7843	<i>ΔpoliP</i>
Proteína relacionada a transportador ABC	50,18	5,41	3	3	1,49	0,7273	<i>ΔpoliP</i>
ATP sintasa subunidad alfa	334,22	23,59	19	12	1,48	0,7176	<i>ΔpoliP</i>
Difosfatasa inorgánica	156,95	25,57	7	5	1,48	0,7176	<i>ΔpoliP</i>
3-oxoacil-(ACP) reductasa	73,76	26,23	4	3	1,48	0,7176	<i>ΔpoliP</i>
Factor de modulación del ribosoma	69,54	14,55	2	2	1,4701	0,7079	<i>ΔpoliP</i>
D-tagatosa-bisfosfato aldolasa clase II, subunidad no catalítica	159,49	9,39	8	4	1,47	0,7078	<i>ΔpoliP</i>
Proteína ribosomal 50S L7/L12	109,99	19,83	5	3	1,44	0,6781	<i>ΔpoliP</i>
Treonil-tRNA sintetasa	87,35	4,83	6	3	1,43	0,6680	<i>ΔpoliP</i>
L-asparaginasa, tipo II	120,80	14,94	4	3	1,43	0,6680	<i>ΔpoliP</i>
Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	65,39	10,59	5	3	1,4	0,6374	<i>ΔpoliP</i>

Se identificaron un total de 139 productos génicos que experimentaron un incremento en sus niveles con respecto a la cepa wt. De las proteínas que aumentan su expresión, la mutante *Δppk1* presenta diferencias principalmente a nivel de 6 proteínas relacionadas con el metabolismo energético y de 4 proteínas de membrana

relacionadas con el transporte de nutrientes. Por otra parte, en el caso de la mutante Δppx , si bien no existe un grupo de proteínas predominantes, sí se incrementa la expresión de 11 canales, transportadores y proteínas asociadas a la membrana. Para el caso de la doble mutante ($\Delta poliP$) el patrón es aún menos claro, pero se observa un aumento en la expresión de 4 proteínas relacionadas con el transporte a través de membrana, como también de 3 productos génicos relacionados con la degradación de las proteínas, lo que podría dar cuenta de un aumento en los mecanismos relacionados con los niveles intracelulares de los aminoácidos biodisponibles.

Se observa aumento en los niveles de proteínas que resultan interesantes desde el punto de vista del metabolismo de los poliP, como la (p)ppGpp sintetasa (mutantes $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$), involucrada en la síntesis de este alarmón celular que gatilla las respuestas relacionadas con diferentes tipos de estrés [Traxler y col., 2008]. Otra proteína interesante que aumenta sus niveles es la bacterioferritina (mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx), responsable de la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} y del almacenaje de este metal en la célula [Bou-Abdallah y col., 2002]. También es importante mencionar a la subunidad delta de la DNA polimerasa (mutante $\Delta ppk1$), importante para el inicio de la replicación del cromosoma de *E. coli* [Jeruzalmi y col., 2001]. Otra proteína relacionada con la respuesta a estrés es la denominada Lon proteasa (mutante $\Delta ppk1$ y $\Delta poliP$), involucrada en la regulación de los niveles de traducción como respuesta a estrés por carencia de los aminoácidos, entre otras funciones [Tsilibaris y col., 2006]. Con respecto al metabolismo energético, es interesante el aumento de los niveles de la piruvato quinasa I (mutante $\Delta ppk1$) y la subunidad alfa de la ATP sintasa (mutante $\Delta poliP$).

A nivel proteómico, se repite un patrón en el aumento en la expresión diferencial de las proteínas en la cepa mutante $\Delta ppk1$ y la doble mutante en proteínas relacionadas con el transporte a través de la membrana.

Los datos que se muestran en la Tabla 3 permiten sugerir ciertos ajustes celulares relacionados con el aumento en la expresión de algunas proteínas debido a la alteración del metabolismo de los poliP, sin embargo, como se trata de un estudio a gran escala, es necesario favorecer la robustez de los datos mediante un análisis complementario de los cambios experimentados por las cepas mutantes de *E. coli*.

Tabla 4. Listado de las proteínas que disminuyeron su expresión con respecto a la condición control. #Pept. corresponde al número de péptidos identificados y #(L/H) a los péptidos empleados para la cuantificación.

Proteína	Puntuación	% Cobertura	# Pept.	# (L/H)	Prom.	log ₂ (Prom. - mediana)	Cepa mutante
Malato sintasa G	475,16	19,23	18	13	0,2	-2,3219	<i>Δppx</i>
Alfa-hidroxiácido deshidrogenasa dependiente de FMN	135,54	12,37	4	2	0,21	-2,2515	<i>Δppx</i>
Acetato/CoA ligasa	600,52	24,54	20	14	0,22	-2,1844	<i>Δppx</i>
Carbamoiltransferasa YgeW	132,36	15,70	7	3	0,26	-1,9434	<i>Δppx</i>
Sintetasa y ligasa dependiente de AMP	65,12	3,95	2	2	0,27	-1,8890	<i>Δppx</i>
Proteína serina quinasa hipotética, PrkA	64,80	6,06	5	2	0,29	-1,7859	<i>Δppx</i>
Citrato sintasa	671,76	36,30	36	19	0,31	-1,6897	<i>Δppx</i>
Sistema PTS, subunidad IIC específica a galactitol	73,26	8,43	17	8	0,31	-1,6897	<i>Δppx</i>
Selenato reductasa, subunidad de unión a molibdeno	92,39	4,71	4	3	0,31	-1,6897	<i>Δppx</i>
Cisteína S-metiltransferasa-DNA-metilado	151,63	12,73	6	5	0,35	-1,5146	<i>Δppx</i>
Aldehído Deshidrogenasa	431,84	26,10	16	10	0,38	-1,3959	<i>Δppx</i>
Selenato reductasa YgfK	143,11	10,17	10	5	0,38	-1,3959	<i>Δppx</i>
Succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa Fe-S	285,95	42,02	16	8	0,39	-1,3585	<i>Δppx</i>
Proteína de la familia M20/DapE YgeY	88,20	7,69	5	4	0,39	-1,3585	<i>Δppx</i>
Oxidoreductasa dependiente de FAD	39,00	9,98	4	2	0,39	-1,3585	<i>Δppx</i>
Aconitato hidratasa 2	1013,54	30,87	44	24	0,4	-1,3219	<i>Δppx</i>
Succinil-CoA ligasa [formadora de ADP] subunidad alfa	268,12	19,72	10	5	0,4	-1,3219	<i>Δppx</i>
Malato deshidrogenasa	591,14	31,73	29	13	0,42	-1,2515	<i>Δppx</i>
Hidro-liase, tipo Fe-S, subfamilia tartrato/fumarato, subunidad beta	209,07	17,88	10	7	0,43	-1,2176	<i>Δppx</i>
Acetilornitina y succinilornitina aminotransferasa	90,82	10,84	2	2	0,44	-1,1844	<i>Δppx</i>
Malato deshidrogenasa (descarboxiladora de oxaloacetato (NADP(+)), fosfato acetiltransferasa	56,77	8,56	7	6	0,45	-1,1520	<i>Δppx</i>
Delta-1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa	770,25	20,00	37	27	0,47	-1,0893	<i>Δppx</i>
Isocitrato deshidrogenasa [NADP]	552,96	28,37	29	13	0,47	-1,0893	<i>Δppx</i>

2-oxoglutarato deshidrogenasa, subunidad E1	315,69	10,29	15	9	0,47	-1,0893	ΔppX
Alcohol deshidrogenasa dominio GroES	306,90	24,28	13	11	0,48	-1,0589	ΔppX
Succinato deshidrogenasa, subunidad flavoproteína	271,09	15,14	11	8	0,5	-1,0000	ΔppX
Succinil-CoA sintetasa, subunidad beta	680,80	30,93	27	15	0,51	-0,9714	ΔppX
4-aminobutirato aminotransferasa	346,89	18,31	9	7	0,51	-0,9714	ΔppX
Proteína familia OmpW	309,61	17,92	9	5	0,51	-0,9714	ΔppX
Succinato semialdehído deshidrogenasa	73,35	7,05	4	3	0,51	-0,9714	ΔppX
Triptofanasa	1549,95	46,71	110	54	0,52	-0,9434	ΔppX
2-oxoglutarato deshidrogenasa, subunidad E2, dihidrolipoamida succiniltransferasa	151,39	24,69	12	8	0,54	-0,8890	ΔppX
Alanina racemasa	105,45	18,54	6	4	0,54	-0,8890	ΔppX
Glucosa-1-fosfatasa	154,47	8,96	4	3	0,55	-0,8625	ΔppX
Succinato deshidrogenasa, subunidad citocromo b556	56,61	8,96	3	3	0,55	-0,8625	ΔppX
Factor de antiterminación NusA	58,32	9,09	4	2	0,55	-0,8625	ΔppX
Isomerasa tipo PpiC peptidil-prolil cis-trans	60,01	11,56	10	5	0,56	-0,8365	ΔppX
Aldolasa clase II, familia tagatosa bifosfato	181,46	27,82	17	11	0,58	-0,7859	ΔppX
D-tagatosa-bifosfato aldolasa, clase II, subunidad no catalítica	446,47	25,00	26	15	0,61	-0,7131	ΔppX
Catalasa-peroxidasa	387,38	14,05	14	11	0,61	-0,7131	ΔppX
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP)	207,72	15,37	8	5	0,62	-0,6897	ΔppX
Helicasa de RNA dependiente de ATP	62,91	2,62	2	2	28,68	-4,2190	$\Delta ppk1$
2,5-diceto-D-ácido glucónico reductasa	154,26	20	9	5	16,99	-3,4636	$\Delta ppk1$
Probable transportador antiporte glutamato/?-aminobutirato	124,75	3,32	6	4	13,01	-3,0786	$\Delta ppk1$
Glutamato descarboxilasa alfa	494,6	24,67	19	16	11,76	-2,9328	$\Delta ppk1$
Glutamato descarboxilasa beta	489,45	24,67	19	15	11,06	-2,8443	$\Delta ppk1$
Proteína de unión a GTP lepA	81,71	3,5	2	2	9,36	-2,6035	$\Delta ppk1$
Probable diaminopropionato amonio liasa	49,49	5,77	7	2	8,23	-2,4179	$\Delta ppk1$
(p)ppGpp sintetasa	47,16	4,7	8	4	8,16	-2,4056	$\Delta ppk1$
Catalasa HP11	92,75	5,57	7	5	6,54	-2,0863	$\Delta ppk1$

Proteína no caracterizada	41,92	5	5	2	6,09	-1,9835	<i>Δppk1</i>
Hidrogenasa 1 cadena larga	115,01	11,39	6	4	5,81	-1,9156	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	173,16	28,36	7	5	5,69	-1,8854	<i>Δppk1</i>
Proteína periplásmica AppA	56,45	4,62	3	2	5,49	-1,8338	<i>Δppk1</i>
Proteína controladora de la respiración aeróbica	47,65	9,66	3	2	5,44	-1,8206	<i>Δppk1</i>
Proteína UPF0337	178,49	52,17	8	7	5,12	-1,7332	<i>Δppk1</i>
Arginina N-succiniltransferasa	45,15	5,23	4	3	4,65	-1,5943	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	332,75	73,82	18	13	4,43	-1,5243	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	122,18	10,55	8	5	4,2	-1,4474	<i>Δppk1</i>
Transcetolasa 2	67,46	8,39	6	3	4,04	-1,3914	<i>Δppk1</i>
Transaldolasa A	72,1	12,02	5	5	3,74	-1,2801	<i>Δppk1</i>
Proteína de membrana UPF0092	125,49	20	4	3	3,72	-1,2723	<i>Δppk1</i>
Proteína de membrana externa	108,76	30,31	7	6	3,71	-1,2684	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	66,68	16,81	3	3	3,63	-1,2370	<i>Δppk1</i>
Dihidrodipicolinato sintasa	51,19	12,32	3	2	3,45	-1,1636	<i>Δppk1</i>
Proteína osmóticamente inducible Y	85,14	16,91	6	3	3,3	-1,0995	<i>Δppk1</i>
Chaperona	158,41	8,83	4	3	3,29	-1,0951	<i>Δppk1</i>
Citocromo d ubiquinol oxidasa	159,02	9,96	8	6	3,26	-1,0819	<i>Δppk1</i>
Fosfopentomutasa	187,75	13,26	6	5	3,25	-1,0775	<i>Δppk1</i>
Proteína TdcF	155,76	27,9	7	5	3,25	-1,0775	<i>Δppk1</i>
β-aminobutiraldehído deshidrogenasa	101,25	3,79	3	2	3,22	-1,0641	<i>Δppk1</i>
Bacterioferritina	113,06	21,51	4	3	3,12	-1,0186	<i>Δppk1</i>
Sistema PTS, componente EIICBA específico de manitol	93,55	8,32	10	4	3,1	-1,0093	<i>Δppk1</i>
Glicil-tRNA sintetasa, subunidad beta	109,51	13,2	9	7	3,04	-0,9811	<i>Δppk1</i>
Proteína de membrana externa X	114,14	21,63	4	2	3,04	-0,9811	<i>Δppk1</i>
Proteína no caracterizada	106,46	25,74	3	3	3	-0,9620	<i>Δppk1</i>
Lipoproteína osmóticamente inducible E	45,36	9,82	2	2	2,99	-0,9572	<i>Δppk1</i>
Aminoacil histidina dipeptidasa	127,07	11,95	6	5	2,91	-0,9180	<i>Δppk1</i>
Proteína YgiW	85,52	15,38	3	3	2,91	-0,9180	<i>Δppk1</i>
2-deshidro-3-deoxyfosfooctonato	45,84	7,39	3	3	2,86	-0,8930	<i>Δppk1</i>

aldolasa								
Ceto-formato acetiltransferasa	60,86	11,91	8	5	2,85	-0,8880	<i>Δppk1</i>	
Fructosa bifosfato aldolasa clase 1	176,81	19,42	8	6	2,84	-0,8829	<i>Δppk1</i>	
Glutarredoxina 2	68,75	15,34	4	4	2,8	-0,8624	<i>Δppk1</i>	
Complemento de resistencia TraT	150,76	13,11	7	5	2,79	-0,8573	<i>Δppk1</i>	
Fosforilasa de nucleósido purina tipo deoD	334,95	18,41	7	5	2,75	-0,8365	<i>Δppk1</i>	
DNA polimerasa III, subunidad delta	47,34	6,41	5	3	2,73	-0,8259	<i>Δppk1</i>	
RNA polimerasa dirigida por DNA, subunidad beta	133,79	7	9	7	2,72	-0,8206	<i>Δppk1</i>	
Piruvato quinasa I	200,62	13,82	9	8	2,67	-0,7939	<i>Δppk1</i>	
Proteasa La dependiente de ATP	118,77	7,52	6	4	2,64	-0,7776	<i>Δppk1</i>	
Uridina fosforilasa	67,22	24,9	4	4	2,64	-0,7776	<i>Δppk1</i>	
Xaa-Pro dipeptidasa	52,65	6,99	4	3	2,58	-0,7444	<i>Δppk1</i>	
Proteína TraB	42,63	3,57	5	5	2,55	-0,7275	<i>Δppk1</i>	
Glutaminil-tRNA sintetasa	144,34	5,05	3	2	2,53	-0,7162	<i>Δppk1</i>	
6-fosfogluconato deshidrogenasa	256,22	19,87	11	8	2,51	-0,7047	<i>Δppk1</i>	
Factor de elongación G	536,24	20,73	20	14	2,49	-0,6932	<i>Δppk1</i>	
Proteína A de resistencia a Acriflavina	94,06	11,08	7	4	2,47	-0,6815	<i>Δppk1</i>	
Fosfoenolpiruvato-proteína fosfotransferasa	157,71	14,95	8	7	2,46	-0,6757	<i>Δppk1</i>	
Proteína HdeB	46,74	21,29	3	3	2,46	-0,6757	<i>Δppk1</i>	
Proteína no caracterizada	55,06	14,78	4	3	2,44	-0,6639	<i>Δppk1</i>	
D-lactato deshidrogenasa	67,26	9,45	5	3	2,42	-0,6520	<i>Δppk1</i>	
Adenilato quinasa	88,23	9,81	3	3	2,38	-0,6280	<i>Δppk1</i>	
Pirofosfatasa inorgánica	225,44	33,52	8	6	2,36	-0,6158	<i>Δppk1</i>	
Proteína ribosomal 50S L7/L12	198,77	19,83	9	6	2,36	-0,6158	<i>Δppk1</i>	
Aldehído-alcohol deshidrogenasa	327,81	17,62	19	12	2,34	-0,6035	<i>Δppk1</i>	
Chaperona ClpB	208,8	8,98	8	5	2,34	-0,6035	<i>Δppk1</i>	
Helicasa de RNA dependiente de ATP	62,91	2,62	2	2	28,68	-4,2190	<i>Δppk1</i>	
2,5-diceto-D-ácido glucónico reductasa	154,26	20	9	5	16,99	-3,4636	<i>Δppk1</i>	
Probable transportador antiporte glutamato/?-aminobutirato	124,75	3,32	6	4	13,01	-3,0786	<i>Δppk1</i>	
Glutamato descarboxilasa alfa	494,6	24,67	19	16	11,76	-2,9328	<i>Δppk1</i>	
Glutamato descarboxilasa beta	489,45	24,67	19	15	11,06	-2,8443	<i>Δppk1</i>	
Proteína de unión a GTP lepA	81,71	3,5	2	2	9,36	-2,6035	<i>Δppk1</i>	
Probable	49,49	5,77	7	2	8,23	-2,4179	<i>Δppk1</i>	

diaminopropionato amonio liasa								
(p)ppGpp sintetasa	47,16	4,7	8	4	8,16	-2,4056	<i>Δppk1</i>	
Catalasa HPII	92,75	5,57	7	5	6,54	-2,0863	<i>Δppk1</i>	
Proteína no caracterizada	41,92	5	5	2	6,09	-1,9835	<i>Δppk1</i>	
Hidrogenasa 1 cadena larga	115,01	11,39	6	4	5,81	-1,9156	<i>Δppk1</i>	
Proteína no caracterizada	173,16	28,36	7	5	5,69	-1,8854	<i>Δppk1</i>	
Proteína periplásmica AppA	56,45	4,62	3	2	5,49	-1,8338	<i>Δppk1</i>	
Proteína controladora de la respiración aeróbica	47,65	9,66	3	2	5,44	-1,8206	<i>Δppk1</i>	
Proteína UPF0337	178,49	52,17	8	7	5,12	-1,7332	<i>Δppk1</i>	
Arginina N- succiniltransferasa	45,15	5,23	4	3	4,65	-1,5943	<i>Δppk1</i>	
Proteína no caracterizada	332,75	73,82	18	13	4,43	-1,5243	<i>Δppk1</i>	
Proteína no caracterizada	122,18	10,55	8	5	4,2	-1,4474	<i>Δppk1</i>	
Transcetolasa 2	67,46	8,39	6	3	4,04	-1,3914	<i>Δppk1</i>	
Transaldolasa A	72,1	12,02	5	5	3,74	-1,2801	<i>Δppk1</i>	
Proteína de membrana UPF0092	125,49	20	4	3	3,72	-1,2723	<i>Δppk1</i>	
Proteína de membrana externa	108,76	30,31	7	6	3,71	-1,2684	<i>Δppk1</i>	
Proteína no caracterizada	66,68	16,81	3	3	3,63	-1,2370	<i>Δppk1</i>	
Proteína extracelular de unión a soluto familia 1	140,76	15,66	8	6	0,59	-0,6092	<i>ΔpoliP</i>	
Acetato/CoA ligasa	139,47	5,98	4	3	0,58	-0,6339	<i>ΔpoliP</i>	
Proteína extracelular de unión a soluto familia 1	58,19	11,49	3	2	0,57	-0,6590	<i>ΔpoliP</i>	
Regulador transcripcional, proteína de unión periplásmica tipo LacI	131,39	19,28	5	5	0,56	-0,6845	<i>ΔpoliP</i>	
Carbamoyltransferasa YgeW	148,48	14,18	7	5	0,56	-0,6845	<i>ΔpoliP</i>	
Proteína hipotética no caracterizada	112,19	11,11	2	2	0,56	-0,6845	<i>ΔpoliP</i>	
Proteína hipotética no caracterizada	110,99	29,70	10	6	0,55	-0,7105	<i>ΔpoliP</i>	
Proteína de familia M20/DapE YgeY	118,36	7,69	4	4	0,55	-0,7105	<i>ΔpoliP</i>	
4-aminobutirato aminotransferasa	472,96	23,71	14	9	0,54	-0,7370	<i>ΔpoliP</i>	
Nucleósido difosfato quinasa	202,94	33,57	7	4	0,53	-0,7639	<i>ΔpoliP</i>	
Arginina descarboxilasa	94,08	6,38	6	5	0,52	-0,7914	<i>ΔpoliP</i>	
Malato deshidrogenasa (descarboxiladora de oxaloacetato) (NADP(+)), fosfato acetiltransferasa	57,84	3,56	4	3	0,52	-0,7914	<i>ΔpoliP</i>	
Proteína ribosomal 30S S11	371,64	33,33	10	6	0,51	-0,8194	<i>ΔpoliP</i>	
Serina hidroximetiltransferasa	46,28	8,15	6	5	0,49	-0,8771	<i>ΔpoliP</i>	

Factor de terminación de la transcripción Rho	52,23	9,31	5	2	0,49	-0,8771	<i>ΔpoliP</i>
Proteína familia Ferritina Dps	1257,36	53,89	47	19	0,48	-0,9069	<i>ΔpoliP</i>
LysM unión a peptidoglicano	474,15	78,52	28	14	0,47	-0,9373	<i>ΔpoliP</i>
Proteína hipotética no caracterizada	212,15	14,46	6	5	0,46	-0,9683	<i>ΔpoliP</i>
Proteína hipotética no caracterizada	223,99	38,61	7	5	0,43	-1,0656	<i>ΔpoliP</i>
Transportador de eflujo, familia RND, subunidad MFP	48,24	8,06	5	3	0,41	-1,1343	<i>ΔpoliP</i>
NADH deshidrogenasa (Quinona)	96,06	2,77	4	3	0,40	-1,1699	<i>ΔpoliP</i>
Proteína de shock térmico HslVU, ATPasa subunidad HslU	50,42	6,32	3	2	0,37	-1,2824	<i>ΔpoliP</i>
Proteína con dominio de helicasa caja DEAD/DEAH	86,98	7,66	3	3	0,36	-1,3219	<i>ΔpoliP</i>
Proteína hipotética no caracterizada	53,73	11,93	3	2	0,35	-1,3626	<i>ΔpoliP</i>
Proteína de membrana externa, sistema de secreción tipo I, familia TolC	73,96	4,26	3	2	0,33	-1,4366	<i>ΔpoliP</i>
Utilización de etanolamina EutA	45,89	5,14	3	2	0,23	-1,9683	<i>ΔpoliP</i>
6-fosfogluconolactonasa	49,41	11,48	5	4	0,22	-2,0324	<i>ΔpoliP</i>
Hidrogenasa dependiente de níquel, subunidad grande	57,60	6,88	5	3	0,16	-2,4919	<i>ΔpoliP</i>
Sulfatasa	46,95	3,91	4	3	0,12	-2,9069	<i>ΔpoliP</i>

En las tres distintas comparaciones realizadas por proteómica cuantitativa, se identificaron un total de 189 proteínas que disminuyeron su expresión respecto a la cepa control (wt). En el caso de la mutante *Δppk1*, aumenta la expresión de varias proteínas relacionadas con el metabolismo energético (22), principalmente relacionadas con el ciclo de Krebs y la síntesis de Acetil-CoA, como también disminuyen otras relacionadas con la respuesta a distintos tipos de estrés (8) y proteínas periplasmáticas (6), lo que sugiere una posible regulación por parte de los niveles de polifosfatos en procesos de metabolismo energético y en la capacidad celular para afrontar situaciones de estrés. Esto concuerda con lo observado en los

experimentos de microarreglos de DNA y será abordado con mayor detalle en los análisis bioinformáticos de los resultados.

Para el mutante Δppx también se observa una disminución en la expresión de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético, principalmente las enzimas del ciclo de Krebs, pero también existe una regulación negativa de las proteínas relacionadas con la respiración anaeróbica, lo que es contrario a lo observado en el mutante $\Delta ppk1$.

En el caso de la doble mutante, no se observa un patrón definido de proteínas que disminuyen su expresión respecto de la cepa wt, pero aún así se identificaron proteínas relacionadas con el metabolismo primario, como también algunos reguladores transcripcionales y proteínas de membrana relacionadas con el transporte de nutrientes.

Algunas proteínas interesantes encontradas son las relacionadas con el ciclo de Krebs y los complejos respiratorios (Malato sintasa, acetato/coA ligasa, citrato sintasa, succinato deshidrogenasa, aconitato hidratasa 1 y 2, succinil-coA ligasa, malato deshidrogenasa, isocitrato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, succinil-coA sintetasa, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, piruvato quinasa, fumarato hidratasa clase I y II), que producen y regulan los niveles energéticos celulares, así como también algunas ATPasas y proteínas relacionadas con la respuesta al estrés por metales y las especies reactivas de oxígeno (Superóxido dismutasa para Fe y Mn, ATP sintetasa, catalasa).

Como tendencia general a nivel proteómico se observa una alteración de las proteínas relacionadas con el metabolismo energético en las tres cepas mutantes, lo que permite sugerir que tanto los niveles de polifosfato como las enzimas

responsables de metabolizar este biopolímero están niveladas y podrían regular las rutas metabólicas encargadas de la producción y conversión de energía en la bacteria *Escherichia coli*. Estos resultados están en concordancia con lo observado previamente mediante microarreglos de DNA, en donde también se observó un aumento en la expresión de genes relacionados con la respiración aeróbica y curiosamente también de la fermentación y la respiración anaeróbica.

9.2 Comparación de la abundancia de las proteínas con los niveles de mRNA

Mediante los estudios de proteómica es posible determinar los cambios experimentados por la célula a nivel de las proteínas frente a determinadas condiciones. Teniendo en cuenta que las regulaciones post transcripcionales pueden alterar los niveles de expresión de las proteínas con respecto de los niveles observados a nivel transcripcional, resulta útil corroborar los datos obtenidos mediante microarreglos de DNA con una estrategia simultánea y complementaria a nivel de las proteínas como la proteómica cuantitativa.

Con el objetivo de obtener datos más robustos sobre las proteínas que se expresan diferencialmente en las cepas mutantes con respecto a la cepa control es que se realizó una comparación entre los resultados obtenidos por proteómica cuantitativa con aquellos obtenidos mediante microarreglos de DNA. La Tabla 5 muestra aquellos genes y proteínas que coincidieron en su expresión tanto en los estudios de proteómica como en los de transcriptómica.

Se detectaron un total de 35 proteínas que presentaron el mismo comportamiento entre ambas metodologías, de las cuales 14 presentaron una regulación positiva mientras que 21 experimentaron una disminución en sus niveles de abundancia. De

estas proteínas, 5 se encuentran relacionadas con el metabolismo energético y 5 están relacionadas con la respuesta a distintos tipos de estrés.

Es importante señalar que estos experimentos (microarreglos de DNA y proteómica cuantitativa) fueron realizados en momentos diferentes y a partir de distintas muestras biológicas. De haber usado la misma muestra, la comparación seguramente hubiese arrojado un mayor número de coincidencias.

Tabla 5. Listado de productos génicos que coincidieron en las dos distintas metodologías de medición de cambios a gran escala. Z score corresponde a la puntuación obtenida en los microarreglos, mientras que Log₂-mediana corresponde al valor calculado mediante proteómica cuantitativa.

Proteína	Gen	Z score	Log ₂ -mediana	Cepa mutante
Citrato sintasa	<i>gltA</i>	5,4784	2,0968	$\Delta ppk1$
Aconitato hidratasa 2	<i>acnB</i>	2,2045	1,9448	$\Delta ppk1$
Proteína periplasmática de unión a D-ribosa	<i>rbsB</i>	2,5764	1,8073	$\Delta ppk1$
Fumarato hidratasa clase I, aeróbica	<i>fumB</i>	1,6674	1,7121	$\Delta ppk1$
Proteína tipo shock frío	<i>cspC</i>	2,9832	1,2223	$\Delta ppk1$
Tiol peroxidasa	<i>tpx</i>	2,5034	0,7919	$\Delta ppk1$
Proteína A de respuesta a hambruna	<i>sspA</i>	1,8149	0,7121	$\Delta ppk1$
Proteína ribosomal L32	<i>rpmF</i>	1,9144	1,7140	Δppk
Endorribonucleasa L-PSP	<i>yhaR</i>	5,1588	1,5367	Δppk
Fosfoenolpiruvato-proteína fosfotransferasa	<i>ptsI</i>	1,7107	0,6649	Δppk
(P)ppGpp sintetasa I, SpoT/RelA	<i>relA</i>	1,6312	1,91329	$\Delta poliP$
Proteasa La dependiente de ATP	<i>lon</i>	2,4264	1,02385	$\Delta poliP$
3-oxoacil-(ACP) reductasa	<i>fabG</i>	2,2773	0,71760	$\Delta poliP$
L-asparaginasa, type II	<i>ansB</i>	2,4242	0,66802	$\Delta poliP$

Proteína no caracterizada	<i>ycbW</i>	-1,5305	-1,9835	$\Delta ppk1$
Citocromo bd ubiquinol oxidasa, subunidad 1	<i>cydA</i>	-1,9089	-1,0819	$\Delta ppk1$
3-desoxi-D-mano-octulosonato 8-fosfato sintasa	<i>kdsA</i>	-1,6475	-0,8930	$\Delta ppk1$
RNA polimerasa, subunidad β	<i>rpoB</i>	-1,9790	-0,8206	$\Delta ppk1$
Chaperona de estrés ácido	<i>hdeB</i>	-5,5672	-0,6757	$\Delta ppk1$
Pirofosfatasa inorgánica	<i>ppa</i>	-1,5514	-0,6158	$\Delta ppk1$
Aldehído-álcohol deshidrogenasa	<i>adhE</i>	-1,9326	-0,6035	$\Delta ppk1$
Malato sintasa G	<i>glcB</i>	-1,7924	-2,3074	Δppx
Citrato sintasa	<i>gltA</i>	-2,2799	-2,4032	Δppx
Sistema PTS, específico de galactitol, subunidad IIC	<i>treB</i>	-3,8902	-2,4032	Δppx
Succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa Fe-S	<i>frdB</i>	-1,9870	-2,0720	Δppx
Óxidorreductasa dependiente de FAD	<i>ydiS</i>	-1,6561	-2,0720	Δppx
Aldehído-álcohol deshidrogenasa	<i>adhE</i>	-2,2089	-1,9311	Δppx
2-oxoglutarato deshidrogenasa, subunidad E2, dihidrolipoamida succiniltransferasa	<i>aceF</i>	-2,7541	-1,6025	Δppx
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ATP)	<i>pckA</i>	-1,5890	-1,4032	Δppx
Regulador transcripcional de unión periplásmica tipo LacI	<i>ycjW</i>	-1,8885	-0,9998	Δppx
Formato deshidrogenasa, subunidad alfa	<i>hyfD</i>	-1,7359	-0,8182	Δppx
Arginina descarboxilasa	<i>adiA</i>	-1,5921	-0,7914	$\Delta poliP$
Malato deshidrogenasa (descarboxiladora de oxaloacetato) (NADP(+)), Fosfato acetiltransferasa	<i>mdh</i>	-2,3732	-0,7914	$\Delta poliP$
Transportador de eflujo tipo RND, subunidad MFP	<i>yhil</i>	-2,4036	-1,1343	$\Delta poliP$
6-fosfogluconolactonasa	<i>yieK</i>	-3,2983	-2,0324	$\Delta poliP$

9.3 Análisis bioinformáticos

Los análisis bioinformáticos permiten observar los datos de una forma más global, particularmente, los análisis de enriquecimiento permiten conocer los procesos biológicos, compartimientos celulares y funciones moleculares que se ven afectadas, y así estimar qué categorías de ontología (GO) se encuentran representadas por sobre el azar en una lista de proteínas comparadas con el total de los productos génicos codificados en el genoma de un organismo. Esto se realizó con el objetivo de determinar qué rutas metabólicas o procesos biológicos están afectados cuando alteramos el metabolismo de los poliP.

Para esto, se utilizó el programa GEO term finder, disponible en línea (ver sección de Materiales y Métodos), en el cual se consideró para el análisis el 10% mayor de las proteínas que aumentaron su expresión significativamente en cada experimento, al igual que el 10% mayor de las que disminuyeron, considerando como válida la representación de una categoría cuando su probabilidad (p) $< 0,05$. De forma complementaria, se utilizó el programa *Pathway Tools* v15.0, para corroborar los análisis de enriquecimientos y para compararlos con los datos obtenidos mediante microarreglos de DNA. La Tabla 6 resume los resultados del análisis del enriquecimiento molecular para la comparación realizada con las tres cepas mutantes.

Del total de categorías representadas se conservó principalmente aquellas en las que figuraban los genes que coincidieron en la comparación entre proteómica y transcriptómica (Tabla 6), seleccionando aquellas categorías granulares, es decir, la categoría que describe de forma más precisa al producto génico y que no presenta alguna subcategoría.

Tabla 6. Análisis del enriquecimiento génico realizado con el 10% mayor de las proteínas que aumentaron y disminuyeron su expresión en la comparación realizada de cada cepa mutante con la cepa control. Se consideró una categoría ontológica como representada por sobre el azar si $P < 0,05$. Los genes que coincidieron en la comparación realizada entre proteómica y transcriptómica se encuentran subrayados.

Categoría ontológica(GO)	P-Value	Productos génicos	Cepa mutante
Ciclo de Krebs	2,41E-13	sucC, fumA, sdhA, icd, sdhB, acnB, <u>glcB</u> , <u>gltA</u> , sucD	<i>Δppx</i>
Procesos catabólicos de Acetil-coA	2,41E-13	%*	<i>Δppx</i>
Ciclo del Glioxilato	4,39E-02	%*	<i>Δppx</i>
Respiración anaeróbica	2,19E-12	%* + lldD	<i>Δppx</i>
Actividad transferasa (grupos acilos convertidos a grupos alquilos)	2,03E-04	%*	<i>Δppx</i>
Actividad quinasa	3,73E-02	<u>relA</u> , yeaG, ppsR, pykA, ppsA, mtlA	<i>ΔpoliP</i>
Ciclo de Krebs	2,05E-16	fumA, sdhA, sucB, sdhB, acnB, <u>glcB</u> , <u>gltA</u> , fumB, aceB, sucD	<i>Δppk1</i>
Respiración anaeróbica	5,01E-15	%** + lldD	<i>Δppk1</i>
Atividad malato sintasa	5,39E-05	<u>glcB</u> , aceB	<i>Δppk1</i>
Actividad fumarato hidratasa	1,61E-04	fumA, fumB	<i>Δppk1</i>
Actividad succinato deshidrogenasa	5,31E-04	sdhB, sdhA	<i>Δppk1</i>
Elevación de pH	3,73E-06	gadA, gadC, gadB	<i>Δppk1</i>
Homeostasis de cationes celulares	4,36E-06	gadA, gadC, gadB, <u>bfr</u>	<i>Δppk1</i>
Procesos metabólicos del glutamato	8,69E-03	gadA, gadB, astA	<i>Δppk1</i>

* Grupo de genes detallados en el recuadro correspondiente al ciclo de Krebs de la mutante *Δppx*

**Grupo de genes detallados en el recuadro correspondiente al ciclo de Krebs de la mutante *Δppk1*

De las categorías representadas en la Tabla 6, se observa representado por sobre el azar al ciclo de Krebs tanto para la cepa *Δppk1* como para *Δppx*, al igual que los procesos como la respiración anaeróbica. Esto es posible visualizarlo mediante el programa *Pathway Tools v15.0* (ver materiales y métodos), como se muestra en la

Figura 4 para el caso de la vía metabólica correspondiente al ciclo de Krebs. Al igual que lo observado en microarreglos de DNA, se observó una alteración en las enzimas involucradas en el ciclo de Krebs. Particularmente, como podemos observar en la Figura 4, hay un comportamiento contrario entre el mutante $\Delta ppk1$ y el Δppx . Mientras que en el mutante $\Delta ppk1$ aumentan los niveles de las enzimas del ciclo de Krebs, en el caso del mutante Δppx disminuyen. Estos resultados concuerdan con lo observado en los microarreglos de DNA. Esto se ve reforzado por el hecho de que tanto en los resultados de los microarreglos de DNA como de Q-proteómica las categorías de ontología relacionadas con el ciclo de Krebs y la respiración anaeróbica están coincidentemente alteradas.

La cepa mutante $\Delta poliP$ sólo presenta disminución en la función molecular actividad quinasa.

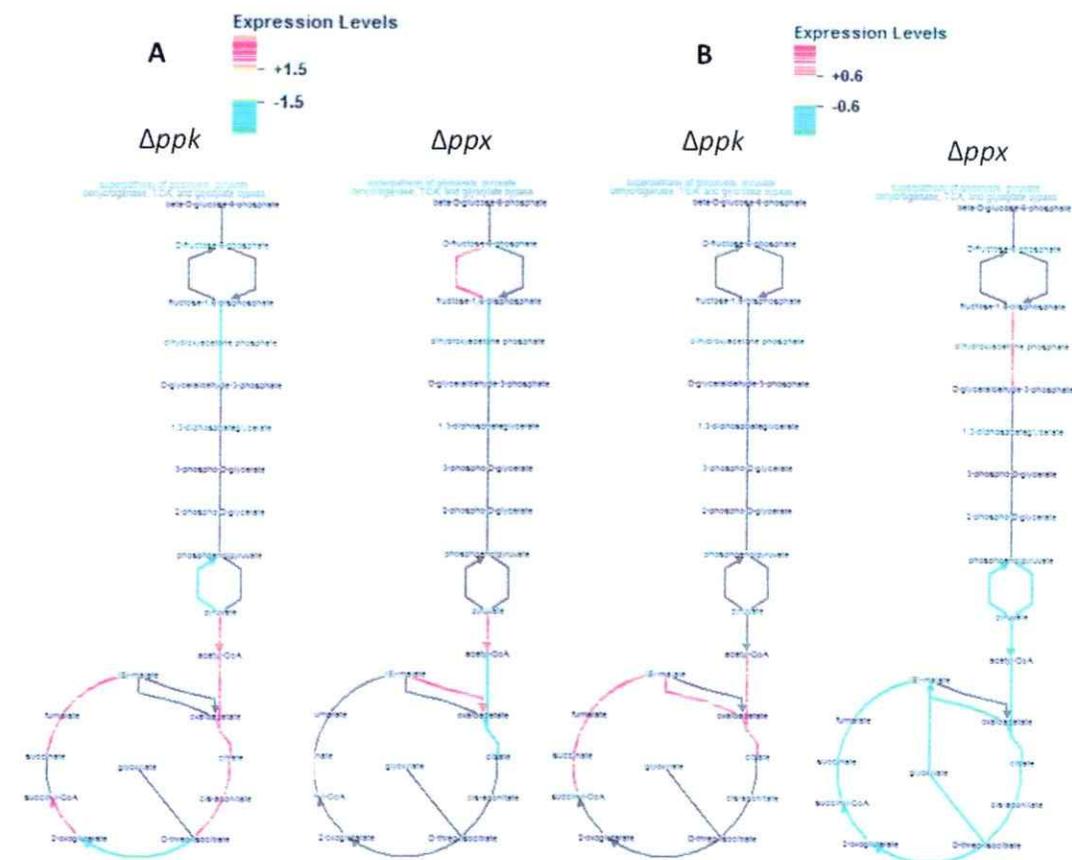


Figura 4. Comparación realizada mediante *Pathway Tools* de la vía de la glicólisis y el ciclo de Krebs. Se muestran las comparaciones tanto para las mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx como para los experimentos de microarreglos de DNA (A) y los de proteómica cuantitativa (B).

9.4 Optimización de un protocolo de precipitación de las proteínas extracelulares

Con el objetivo de complementar los estudios proteómicos celulares con aquellas proteínas extracelulares ante la alteración del metabolismo de los polifosfatos se ajustó un protocolo capaz de precipitar las proteínas extracelulares para ser resueltas en un gel bidimensional de poliacrilamida (2D-PAGE). Como agente precipitante se utilizó el Ácido Tricloroacético (TCA). Para determinar qué protocolo permite una mejor precipitación y resolución del proteoma extracelular de las cepas de *E. coli* se

pusieron a prueba los procedimientos descritos en la Tabla 7 y cada muestra fue sometida a una electroforesis desnaturalante en gel de poliacrilamida (Figura 5) con el fin de determinar qué procedimiento obtiene la cantidad de proteína necesaria para una correcta visualización en este tipo de geles, es decir, que se visualicen bandas nítidas, sin distorsión y con la mayor intensidad posible.

Tabla 7. Ensayos de precipitación de las proteínas extracelulares. TCA corresponde al agente precipitante, mientras que Acetona y Etanol actúan como solventes para eliminar las trazas del TCA en la muestra. La cantidad de proteína calculada se obtuvo a partir de 100 mL de cultivo en medio LB. La calidad de la precipitación se evaluó en un gel de poliacrilamida.

Procedimiento	Cantidad total de proteína precipitada (µg)	Calidad de precipitación
TCA 20% (v/v) en Acetona; Acetona 96%	557	++
TCA 20% (v/v) en Acetona; Etanol 96%	390	+
TCA 10% (p/v); Acetona 96%	1.012	+
TCA 10% (p/v); Etanol 96%	1.000	+++

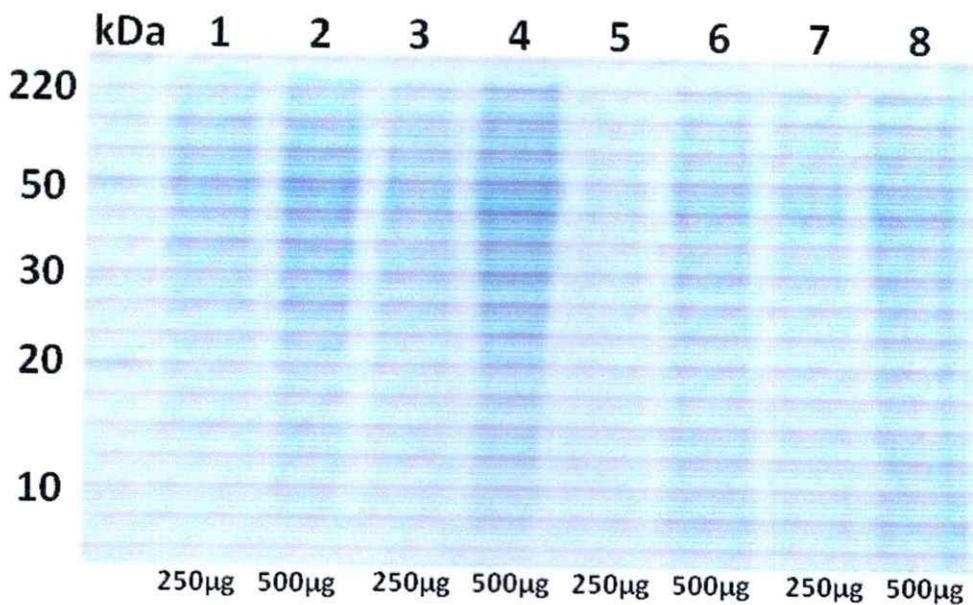


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalantes (SDS-PAGE) con las proteínas obtenidas a partir de los distintos métodos de precipitación descritos. Los carriles 1 y 2 corresponden a la precipitación con TCA 20% (v/v) lavado con Acetona 96%; los carriles 3 y 4 corresponden al procedimiento con TCA 20% (v/v) lavado con Etanol 96%; carriles 5 y 6 corresponden a la precipitación con TCA 10% (p/v), lavado con Acetona 96%; carriles 7 y 8 TCA 10% (p/v), lavado con Etanol 96%.

El ensayo se realizó a partir de dos cultivos de la cepa wt en 200 mL de medio LB crecidos durante la noche hasta alcanzar una DO_{600} de 1,5. Una vez detenido el crecimiento, los cultivos se separaron en alícuotas de 100 mL y que fueron sometidas a los diferentes procedimientos de precipitación descritos.

Debido a la cantidad de proteínas precipitadas obtenidas y a la buena resolución observada en la electroforesis en condiciones desnaturalantes, se adoptó como protocolo de precipitación de proteínas extracelulares el que utiliza TCA 10% (p/v) y lavados con Etanol al 96%.

9.5 Estudio proteómico de las proteínas extracelulares de las cepas mutantes de *E. coli*

En los estudios previos de microarreglos de DNA se observaron alteraciones en los genes de algunas de las proteínas flagelares, por lo que sería interesante ratificar los resultados con los estudios de las proteínas extracelulares.

Con el protocolo de precipitación optimizado, se procedió a realizar los estudios de proteómica en geles bidimensionales con el fin de determinar los cambios a nivel extracelular por las cepas mutantes con respecto a la condición control. Para esto, se utilizó la técnica de electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) y se empleó un rango de pH de 3-10 no lineal (NL) y un gel de acrilamida al 12,5%. La Figura 6 muestra el gel obtenido para la condición control con las manchas seleccionadas visualmente o mediante el programa PDQuest 8.0 Advanced (Bio-Rad, USA), considerando como significativa una variación de 2 veces en la abundancia de una proteína (100%, $P < 0,05$) en las cepas mutantes del metabolismo de los poliP. El resumen de las manchas se detalla en la Tabla 8, mientras que en la Figura 7 se muestran los geles obtenidos para las cepas mutantes. Las manchas seleccionadas serán enviadas al Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid (España) para su identificación mediante espectrometría de masas.

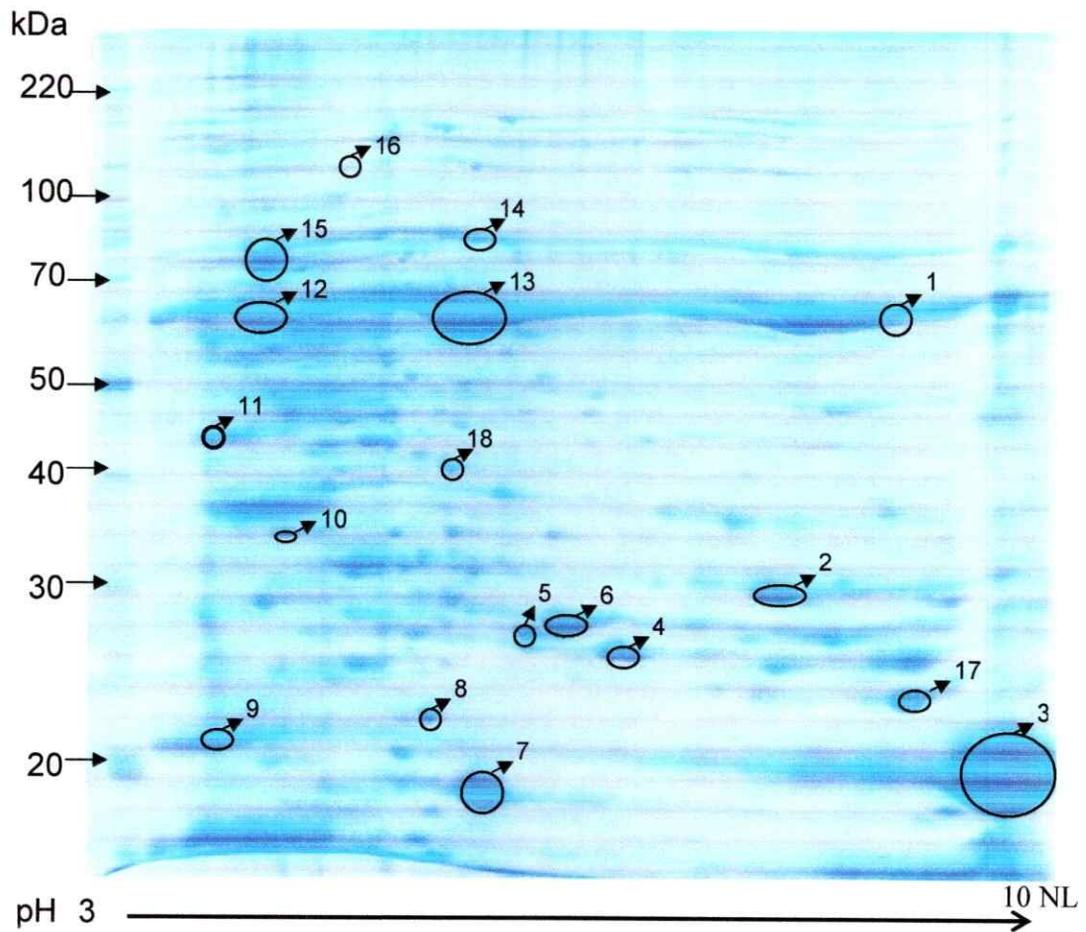


Figura 6. Gel 2D-PAGE de las proteínas extracelulares de la cepa wt. Se observa el rango de pH utilizado, el rango de peso molecular y las manchas seleccionadas para la secuenciación. La Tabla 8 indica en detalle en qué cepa mutante se experimenta la expresión diferencial de la proteína seleccionada. El gel de poliacrilamida se hizo al 12,5% y la tinción se realizó con Azul de Coomassie G-250.

Tabla 8. Spots seleccionados en el análisis de proteómica diferencial de las proteínas extracelulares de las cepas de *Escherichia coli*. Se especifica el tipo de regulación observado como también la cepa mutante en la que se observa la expresión diferencial de la mancha. Las manchas serán escindidas del gel para su secuenciación.

Spot	Cambio	Cepa mutante
1	+	$\Delta ppk1$
2	-	Δppx
3	-	Δppx
4	-	$\Delta poliP$
5	-	$\Delta ppk1 / \Delta poliP$
6	-	$\Delta ppx / \Delta poliP$
7	-	$\Delta ppk1 / \Delta poliP$
8	-	$\Delta ppk1$
9	-	Δppx
10	-	Δppx
11	+	Δppx
12	-	Δppx
13	-	$\Delta ppk1 / \Delta poliP$
14	+	Δppx
15	-	Δppx
16	+	$\Delta ppk1$
17	-	$\Delta ppk1$
18	-	$\Delta ppk1$

De un total de 18 proteínas seleccionadas, 4 presentaron un aumento en la expresión con respecto a la condición control (spots 1, 11, 14 y 16), pertenecientes a las cepas $\Delta ppk1$ o Δppx . No se observó aumento en la expresión de ninguna proteína en la doble mutante. De las proteínas que disminuyeron su expresión respecto a la cepa wt (14), 3 disminuyen tanto en la mutante $\Delta ppk1$ como en $\Delta poliP$ (spots 5, 7 y 13), mientras que 1 lo hace en la mutante Δppx y en la doble mutante (spot 6). La mutante que presentó un mayor número de proteínas expresadas diferencialmente fue la Δppx , con 9 manchas seleccionadas. En la doble mutante se seleccionaron 5 spots, de los cuales solamente 1 presenta expresión diferencial no compartida con otra mutante (spot 4).

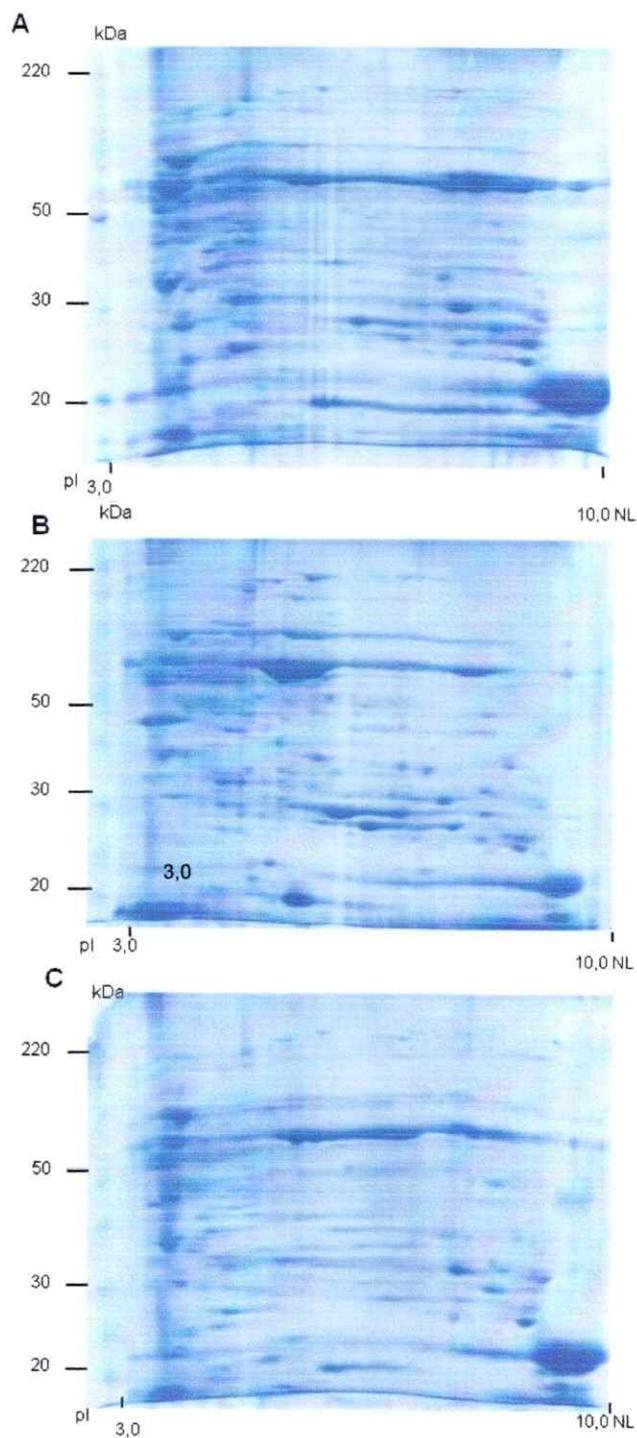


Figura 7. Geles 2D-PAGE de las proteínas extracelulares de las cepas mutantes de *Escherichia coli*. A) secretoma $\Delta ppkI$; B) secretoma Δppx ; C) secretoma $\Delta poliP$. Todos los geles fueron hechos al 12,5% y la tinción se realizó con Azul de Coomasie G-250. Se muestra en cada gel la escala correspondiente al peso molecular y al punto isoeléctrico (pI).

10 DISCUSIÓN

10.1 Estudios de proteómica cuantitativa en las cepas de *E. coli* con alteraciones en el metabolismo de los poliP

En este trabajo se utilizó por primera vez en el laboratorio la técnica de marcaje isotópico de proteínas (ICPL) para los análisis de proteómica cuantitativa. Los trabajos anteriores del laboratorio [Varela y col., 2010] se remiten solamente a las técnicas convencionales de proteómica (2D-PAGE), por lo que es importante evaluar la técnica para conocer las ventajas que podría presentar por sobre la proteómica convencional. Se compararon los resultados obtenidos mediante la metodología de ICPL con los datos generados previamente mediante técnicas de transcriptómica (Microarreglos de DNA). El número de proteínas identificadas por esta técnica corresponde sólo a las proteínas de mayor abundancia en la bacteria, excluyendo aquellas proteínas que no están presentes en alguna de las dos muestras a comparar, ya que no son cuantificables por esta metodología debido a que no es posible realizar un emparejamiento de péptidos que presenten ambas versiones del reactivo ICPL (liviana y pesada). El número total de proteínas que cambian su abundancia es de 328, lo que es un indicativo de cuan eficaz y precisa es esta nueva metodología adoptada. Sin embargo, teniendo en cuenta las coincidencias no solo de los genes y las proteínas particulares, si no de los procesos o vías metabólicas, nos avalan los resultados obtenidos tanto mediante microarreglos de DNA como de Q-proteómica. El nivel de sensibilidad de esta técnica es ampliamente superior a la proteómica convencional, ya que permite cuantificar de manera precisa proteínas que presenten al menos dos péptidos marcados e identificados. El número de proteínas identificadas

(908) y que tienen niveles alterados (328) es muy superior a los análisis de proteómica convencional [Paradela y col., 2010].

Las desventajas aparentes de esta técnica con respecto a la proteómica convencional son que se pierde el efecto visual de la separación de las proteínas (aspecto cualitativo) y que no es posible identificar aquellas proteínas cuya variación tiende a infinito, es decir, aquellas proteínas que se expresan sólo en una de las dos condiciones comparadas.

Hasta la fecha, pocos han sido los trabajos que se han publicado utilizando esta metodología y son menos aún, aquellos que combinan y comparan estas dos técnicas a gran escala [Paradela y col., 2010].

10.2 Proteínas que aumentan sus niveles en los mutantes del metabolismo de los poliP en *E. coli*.

Mediante la metodología de marcaje isotópico de proteínas (ICPL) se lograron identificar un total de 160 proteínas que aumentaron su abundancia con respecto a la cepa control (Tabla 3). Como en todo estudio a escala global, de estas 160 proteínas hay algunas de mayor interés para el objetivo de este seminario de título, como también hay otras que no son de gran importancia. Se tratará en mayor detalle algunas de estas proteínas respecto a la condición en la que se observó dicho aumento y aquellas involucradas con procesos biológicos que podemos relacionar con el metabolismo de los poliP.

10.2.1 Cepa mutante *Δppk1*

Para esta cepa mutante se observó un aumento en la abundancia de 86 proteínas con respecto a la cepa control. Las categorías de ontología (GO) representadas por sobre el azar para esta cepa mutante fueron el ciclo de Krebs (GO:06099) y la respiración anaeróbica (GO:09061). Algunas proteínas fueron la nucleósido difosfato quinasa (NDK), distintas subunidades del complejo respiratorio NADH ubiquinona oxidoreductasa y proteínas del ciclo de Krebs, debido a la posible relación que pudiesen tener con los poliP. La NDK es la encargada de reciclar el GDP producido por la degradación del ppGpp durante la respuesta a estrés o hambruna a GTP [Almaula y cols., 1995]. Se ha vinculado a los poliP con la respuesta y la capacidad de sobrevivir frente a distintas situaciones de estrés. Es por esto que una enzima involucrada en el reciclaje de nucleótidos durante el estrés puede estar vinculada a los poliP, más aún si esta enzima incrementa sus niveles ante la incapacidad de sintetizar poliP por parte de la bacteria. Es importante recordar que la enzima PPK1 en su actividad reversa es una NDK que utiliza poliP, es decir, tiene la capacidad de sintetizar nucleósidos trifosfato (NTP) a expensas del poliP. Cobra sentido entonces que ante la ausencia de la PPK1 esta actividad se vea incrementada.

Esta cepa, que carece de la enzima PPK1 y que por lo tanto es incapaz de sintetizar poliP, debería presentar el mismo comportamiento energético observado mediante los microarreglos de DNA. Efectivamente en esta mutante se observan niveles aumentados de varias de las enzimas del ciclo de Krebs, como la Citrato sintasa, la Isocitrato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa entre otras, así como también se observó el aumento de varias proteínas pertenecientes a complejos

respiratorios, como subunidades del complejo de la NADH ubiquinona oxidorreductasa o del complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa.

Así, ante la incapacidad de producir poliP, se observó que la bacteria incrementó las vías metabólicas que le permiten generar energía como la respiración anaeróbica.

Al comparar las proteínas obtenidas mediante proteómica cuantitativa con los genes expresados diferencialmente en los microarreglos de DNA se encontró proteínas como la Cítrato sintasa y la Aconitato hidratasa 2, ambas pertenecientes al ciclo de Krebs y responsables del metabolismo energético. También coincide el aumento del producto del gen *sspA*, que codifica una proteína esencial para la sobrevivencia en estrés ácido inducido, inhibiendo la acumulación del regulador global HN-S (capaz de condensar o superenrollar el DNA) durante la fase estacionaria de crecimiento [Hansen y cols., 2005]. Esta proteína es inducida en carencia de glucosa, nitrógeno, fosfato o aminoácidos e incrementa con la disminución de la tasa de crecimiento [Williams y cols., 1994].

Otra proteína que coincide con los datos de microarreglos de DNA es la TPX, que es una tiol peroxidasa dependiente de tiorredoxina 1. Tiene función de peroxidasa de lípidos hidroxiperóxidos y actúa como el principal antioxidante bajo condiciones anaeróbicas [Cha y cols., 2004]. Los poliP se han vinculado a la respuesta al estrés oxidativo, ya que en la bacteria acumuladora de poliP *Pseudomonas sp.* B4 se ha detectado un aumento simultáneo de la proteína de respuesta a estrés GroE1 y de los niveles de poliP en dicha bacteria cuando es crecida en presencia de agentes químicos estresantes [Chávez y col., 2004].

También coincide el producto del gen *cspC*, que corresponde a una proteína de estrés que posee actividad antiterminadora y que es capaz de unirse a RNA o ssDNA [Bae

y cols., 2000]. Algunas de las proteínas reguladas por RpoS (σ^S) son reguladas positivamente con la sobreexpresión de *cspC*, lo que sugiere que esta proteína estabilizaría el mRNA de *rpoS* [Phadtare e Inouye, 2001].

Se ha reportado que las bacterias que no acumulan poliP producto de la carencia de la enzima PPK1 no son capaces de adaptarse a condiciones de estrés debido a que los poliP activan la expresión del factor σ^S (*rpoS*), actuando como segundo mensajero celular [Kornberg y col., 1999]. Un aumento en los mecanismos de estabilidad de los mRNA que codifican factores que regulan la entrada a la fase estacionaria y la respuesta a estrés podrían dar cuenta de algunos de los ajustes experimentados por *E. coli* para sobrevivir sin acumular poliP.

Otra coincidencia reside en la Fumarato hidratasa de clase I, producto del gen *fumB*. Se relaciona a esta proteína con la formación de biopelículas, ya que mutantes para este gen disminuyen su capacidad para formar biopelículas [Herzberg y cols., 2006].

10.2.2 Cepa mutante *Δppx*

En esta mutante, carente de la enzima que degrada los poliP (PPX), se observaron un total de 48 proteínas que aumentaron sus niveles. De estas, hay dos que son de gran interés para este trabajo. La bacterioferritina y la subunidad grande de la GMP sintetasa. La primera participa en la detoxificación y almacenaje de hierro, ya que cataliza la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} utilizando H_2O como agente oxidante. Es capaz de formar un homodímero en condiciones de bajo pH [Bou-Abdallah y cols., 2002]. La segunda, da cuenta de un aumento en la síntesis de GMP. La ausencia de la enzima PPX supone una acumulación de poliP y una imposibilidad por parte de la bacteria para degradar y utilizar este biopolímero. Desde este punto de vista es difícil

explicar el aumento en los mecanismos de detoxificación de metales y el aumento de la ruta biosintética de nucleótidos, aunque como se ha reportado, son funciones que han sido vinculadas a los poliP.

Por otra parte, para la cepa mutante deficiente en la enzima PPX se registraron dos coincidencias de proteínas que aumentaron sus niveles tanto en los experimentos de proteómica como en los de microarreglos de DNA. El análisis de enriquecimiento génico no reveló ninguna categoría representada por sobre el azar, por lo que podría sugerirse que la PPX tiene un menor impacto a nivel celular que la ausencia de la PPK1. En otras palabras, esto sugiere que a *E. coli* le afecta más el hecho de no poder sintetizar poliP más que utilizarlos. De estas dos proteínas que coinciden, una es una probable endorribonucleasa L-PSP a la que se le atribuye una posible vinculación con procesos de reparación de DNA, debido a que reconoce y se une a sondas que presentan un espacio vacío en el lugar de una Guanina [Chen y col., 2008]. Esta proteína no aumenta sus niveles en la doble mutante, por lo que el aumento experimentado posiblemente se deba a la incapacidad para liberar P_i a partir del poliP.

10.2.3 Cepa mutante Δ poliP

Se encontraron un total de 26 proteínas que aumentaron sus niveles con respecto a la cepa control (wt). En este bajo número de proteínas, se detectó sólo una categoría de ontología (GO) representada por sobre el azar, la actividad quinasa (GO16301). Esta categoría sugiere un aumento en la actividad fosforiladora por parte de esta cepa mutante.

Del listado de las 26 proteínas aumentadas, es posible resaltar la (p)ppGpp sintetasa, la Lon proteasa y la subunidad alfa de la ATP sintetasa. Esta última, da cuenta de un aumento en la maquinaria generadora de ATP producto quizás de la incapacidad de metabolizar los poliP, por lo que existiría una mayor disponibilidad de P_i en el citoplasma.

Para el caso de la cepa doble mutante, que carece del operón *poliP* en su totalidad, se observa el aumento de cuatro proteínas que coinciden tanto en proteómica cuantitativa como en microarreglos de DNA. La primera de ellas es el producto génico del gen *relA*, que codifica la enzima (p)ppGpp sintetasa. Esta enzima es la encargada de sintetizar Guanidina pentafosfato y AMP a partir de ATP y GTP o GDP, que es luego hidrolizado a Guanidina tetrafosfato [Wendrich y col., 2002]. Esta molécula actúa como segundo mensajero, gatillando la expresión de los genes relacionados con el estrés y la fase estacionaria [Merrih y col., 2009]. También se ha reportado que, producto de la carencia de los nutrientes, (p)ppGpp estimula la acumulación de los poliP, inhibiendo la acción de la PPX [Kornberg y col., 1999]. Así, un aumento en la expresión de *relA* causaría un aumento de esta alarma celular (ppGpp) al eliminar el metabolismo de los poliP, generando una respuesta semejante a una condición de estrés y carencia.

Otra de las proteínas que aumentaron sus niveles fue la Proteasa La dependiente de ATP, codificada en el gen *lon* (también llamada Lon proteasa). Esta proteasa es activada por la unión a los poliP y degrada las proteínas liberadas principalmente de los ribosomas inactivados producto de la carencia de aminoácidos [Kuroda y col., 2001]. Otros estudios también han vinculado a Lon proteasa con la degradación de las proteínas marcadas con RNA, derivadas de una traducción en trans (se activa

cuando los ribosomas son capaces de elongar y terminar correctamente la traducción). La traducción en trans se activa por los productos de los genes *smpB* y *ssrA* (RNA que actúa como mensajero y de transferencia, tmRNA). Estos tmRNA activan a los ribosomas inactivados y marcan los péptidos incompletos. La Lon proteasa es capaz de reconocer este marcaje y degradar las proteínas deficientes [Choy y col., 2007].

Así, los productos de los genes *relA* y *lon* estarían vinculados al mismo proceso metabólico, responsable de generar aminoácidos a partir de las proteínas, producto de la carencia de este tipo de monómeros biológicos. La Figura 8 muestra la relación metabólica existente entre estos dos productos génicos.

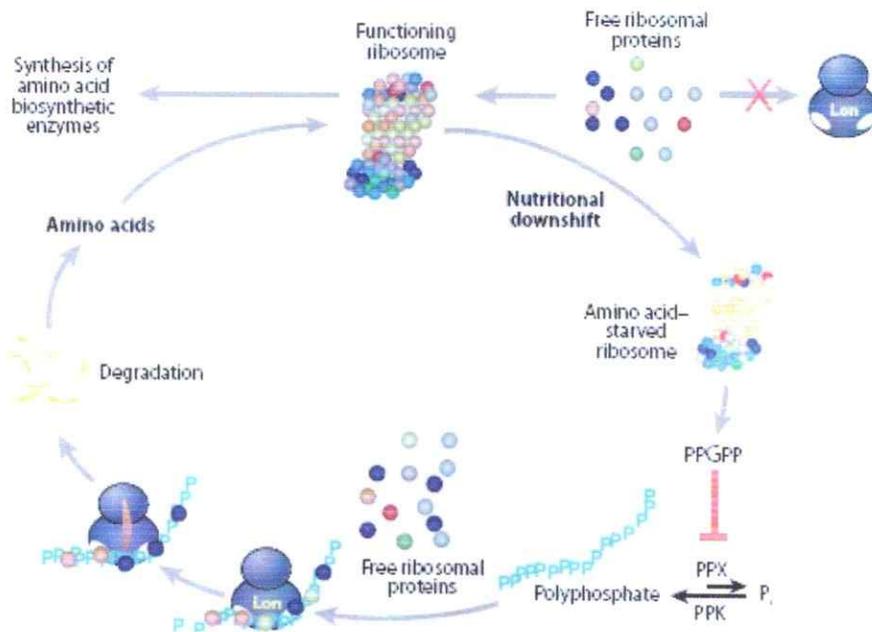


Figura 8. Degradación de las proteínas dependiente de la acumulación intracelular de poliP durante la carencia de nutrientes. Se observa la participación del ppGpp (producido por la enzima codificada en el gen *relA*) y la Lon proteasa en la degradación de las proteínas incompletas para generar aminoácidos biodisponibles [Rao y col., 2009].

De esta manera, la (p)ppGpp sintetasa y la Lon proteasa, que son proteínas relacionadas con la carencia de aminoácidos, aumentan sus niveles de abundancia relativa al no estar presente el operón *poliP*. Curiosamente este fenómeno no se observa en los datos obtenidos para la mutante $\Delta ppk1$ ni tampoco para la mutante Δppx . Esto podría sugerir que sólo la ausencia del metabolismo de los poliP (síntesis y degradación) activan el alarmón ppGpp, lo que activaría a la Lon proteasa y por ende la producción de aminoácidos a partir de las proteínas ribosomales libres.

Las otras dos proteínas que aumentan su abundancia relativa en la cepa $\Delta poliP$ son la 3-oxoacil(ACP) reductasa y la L-asparaginasa tipo II. La primera es una enzima clave para el sistema tipo II de síntesis de los ácidos grasos. Es la responsable de reducir, mediante una reacción dependiente de NADH, un grupo β -ceto de los intermediarios metabólicos que permiten producir acil-ACP con una cadena elongada de carbonos [Price y col., 2004]. Esta alteración aislada en enzimas involucradas con el metabolismo energético sugiere que el efecto observado del metabolismo de los poliP sobre el metabolismo energético sólo ocurre cuando se elimina uno de los dos componentes del operón *poliP* ($\Delta ppk1$ o Δppx) y no ambos ($\Delta poliP$).

En el caso de la L-asparaginasa tipo II, se trata de una proteína de alta afinidad, codificada en el gen *ansB* y que es exportada al periplasma [Jennings y Beacham, 1989]. Existe una versión citoplásmica de esta enzima, con baja afinidad, la L-asparaginasa tipo I. Se ha reportado una regulación positiva de esta enzima, la que depende del AMP cíclico y de los receptores para este segundo mensajero [Russell y Yamazaki, 1978]. Esta enzima es otro ejemplo de los ajustes celulares mencionados anteriormente con respecto a la captación y generación de aminoácidos biodisponibles. Nuevamente, ante la eliminación del operón *poliP* se produce un

aumento en las proteínas relacionadas con la carencia de aminoácidos, pero este fenómeno no ocurre en ninguna de las cepas mutantes para la PPK1 y la PPX. Estudios realizados en medios de cultivo limitantes en aminoácidos permitirían observar mejor las características en estas cepas y sería una estrategia útil para dilucidar la relación existente entre los poliP y la respuesta de la bacteria frente este tipo de carencia.

10.3 Proteínas con niveles disminuidos en los mutantes de *E. coli* relacionados con el metabolismo de los poliP

Mediante la técnica de marcaje isotópico de proteínas (ICPL) fue posible identificar un total de 166 proteínas que disminuyeron sus niveles de abundancia con respecto a la cepa control (wt). De estas proteínas, se tratará en mayor detalle aquellas que resultaron ser de interés para los fines de este seminario de título como también aquellas que presentaron coincidencias con los datos previos de microarreglos de DNA.

10.3.1 Cepa mutante *Appk1*

Para el caso de esta cepa mutante se identificaron un total de 64 proteínas con niveles disminuidos respecto a la condición control (wt). Las categorías de ontología (GO) representadas por sobre el azar para este caso fueron la elevación de pH (GO:45852), la homeostasis de cationes celulares (GO:30003) y los procesos metabólicos del glutamato (GO:06536), lo que refleja un ajuste celular importante en cuanto a la homeostasis de algunos iones y metabolitos. Entre las funciones que se le atribuyen a los poliP se destaca el ser un quelante de cationes celulares y de que, dada su

característica de polianión, constituye una especie de búfer contra las alteraciones de pH. En cuanto a los cationes celulares, se ha descrito que los poliP son capaces de quelar cationes bivalentes como el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , entre otros [Kornberg y col., 1999], lo que respalda en esta mutante la alteración en la categoría de ontología que se refiere a la homeostasis de cationes. También se ha descrito que en algunas algas verdes como *Dunaliella* los poliP son hidrolizados como respuesta a una elevación de pH intracelular, contrarrestando esta alza en el pH citoplasmático [Pick y Weiss, 1991].

De las proteínas que se muestran en la Tabla 4, resultan interesantes para este trabajo la proteína (p)ppGpp sintetasa, codificada en el gen *relA*, responsable de la acumulación de poliP producto de una situación de estrés lo que gatilla la entrada a la fase estacionaria de crecimiento. Como se detalló en una sección anterior, un aumento en esta enzima produciría la acumulación de poliP en la célula. A diferencia de lo observado para la mutante ΔpoliP , en este caso el producto génico de *relA* se encuentra disminuido respecto de la condición control, lo que no induciría a la acumulación de poliP, lo que es lógico debido a que esta mutante carece de la enzima PPK1. Dada esta condición se podría explicar la dificultad que presenta esta mutante para sobrevivir a situaciones de estrés y a la fase estacionaria de crecimiento. Por otra parte, el comportamiento observado en esta enzima le da sentido al hecho de que algunas proteínas presenten un comportamiento contrario en el mutante que no sintetiza poliP respecto del mutante que es incapaz de degradar poliP a Pi.

Otra proteína interesante para este seminario de título es la bacterioferritina, que como se detalló en secciones anteriores, participa en el almacenaje y detoxificación del hierro. Una disminución en los niveles de esta enzima podría dar cuenta de una

mayor sensibilidad frente al hierro debido a la menor capacidad de almacenaje y detoxificación.

Dentro de la lista de las proteínas de la Tabla 4 está también la proteína deoD, que es una de las dos fosforilasas de nucleósidos purínicos o PNP-I existentes en *E. coli*. Este tipo de enzimas utiliza el ortofosfato para romper el enlace N-glicosídico de los β -(desoxi)ribonucleósidos para producir un α -(desoxi)-ribosil-fosfato y una base purínica libre. Así, genera una base nucleotídica que puede ser utilizada como precursora en la síntesis de nucleótidos o como fuente de nitrógeno y una pentosa-1-fosfato que sirve como fuente de carbono [Jensen y Nygaard, 1975]. La disminución en los niveles de esta enzima afectaría la tasa de renovación de los nucleósidos purínicos, lo que posiblemente esté relacionado con la incapacidad de esta mutante para acumular los poliP.

Entre las proteínas interesantes también se encuentra la proteasa Lon, descrita en las secciones anteriores. Esta proteasa puede unirse a los poliP para degradar proteínas ribosomales y reactivar la síntesis de proteínas. Con la ausencia de la PPK1 la proteasa Lon no puede unirse a los poliP para cumplir la función de reactivar la traducción, por lo que una disminución de esta proteasa podría vincularse con algún tipo de regulación proveniente de la PPK1. Esta proteína es otro ejemplo del comportamiento contrario observado en los mutantes *$\Delta ppk1$* y *Δppk* .

Otra proteína interesante que disminuyó sus niveles respecto a la condición control es el factor de elongación G, codificado en el gen *fusA*. Este factor facilita la translocación del ribosoma en un codón a través de la molécula de mRNA. Este proceso requiere de la hidrólisis de GTP [Wintermeyer y cols., 2001]. Una disminución en esta proteína implicaría una disminución en la síntesis de proteínas.

Esto podría estar relacionado con la disminución de la (p)ppGpp sintetasa y de la proteasa Lon, debido quizás a la carencia de la PPK1 o a la no acumulación de los poliP.

Entre los ajustes homeostáticos experimentados por *E. coli* frente a la carencia de la PPK1, se encuentra la disminución de los niveles de una chaperona periplasmática de estrés ácido, codificada en el gen *hdeB* [Kern y cols., 2007]. Este efecto debería hacer a esta mutante carente de la enzima PPK1 más sensible al estrés ácido.

Otra chaperona que disminuye sus niveles en esta cepa mutante es la chaperona ClpB, cuya función, junto con la de la DnaK es la de resolubilizar proteínas agregadas. Conforman una triada de chaperonas junto a DnaK y a IbpA/IbpB [Mogk y cols., 2003]. La disminución en los niveles de algunas de las proteínas relacionadas con la carencia de aminoácidos y con la sobrevivencia a distintos tipos de estrés podría sugerir una disminución en estas vías metabólicas como consecuencia del aumento observado para las rutas del metabolismo energético, como efecto quizás de la ausencia de los poliP.

Junto con las proteínas interesantes que disminuyeron sus niveles en esta cepa mutante también resulta de gran interés detallar aquellas proteínas que presentaron el mismo comportamiento que el observado mediante los microarreglos de DNA. Entre estas proteínas se encuentra la chaperona periplasmática HdeB, descrita recientemente. Otra coincidencia reside en la proteína YcbW, que es una proteína hipotética. Una coincidencia a nivel de transcriptómica y proteómica de una proteína con función desconocida resulta de gran interés para establecer la relación existente entre la expresión de este gen o la función de esta proteína con los niveles de poliP celulares.

También, entre las coincidencias se encuentra el producto del gen *cydA*, que es la subunidad I del citocromo bd-I. En esta subunidad ocurre la oxidación del quinol [Matsumoto y cols., 2006].

Otra coincidencia la presenta la proteína 3-desoxi-D-manno-octulosonato 8-fosfato sintasa, codificada en el gen *kdsA*. Esta enzima es clave en la síntesis de lipopolisacáridos y cataliza la condensación de la arabinosa-5-fosfato y el fosfoenolpiruvato [Li y cols., 2005]. Se ha reportado que la expresión de este gen decae a niveles bajos en la fase exponencial tardía y en la fase estacionaria de crecimiento [Strohmaier y cols., 1995].

También coincide con lo observado en los microarreglos de DNA la disminución de la subunidad β de la RNA polimerasa, que se encuentra codificada en el gen *rpoB*. Esta subunidad, junto con la subunidad β' interactúan con el DNA y probablemente contribuyan al sitio activo de la RNA polimerasa [Simpson, 1979]. Tiene un elemento flexible que hace contacto con factores sigmas y puede estar involucrado con varios complejos holoenzimáticos de la RNA polimerasa [Wigneshweraraj y cols., 2003]. Una disminución en los niveles de esta enzima daría cuenta de una disminución en la maquinaria de transcripción.

Otra de las proteínas que coincide con los microarreglos de DNA es la pirofosfatasa inorgánica, codificada en el gen *ppa*. Esta enzima cataliza la disociación del difosfato a 2 fosfatos inorgánicos, utilizando agua y liberando un protón [Harutyunya y cols., 1997]. En una mutante carente de la PPK1 resulta lógico que una enzima que es de cierta forma análoga a la PPX se encuentre disminuida debido al desbalance en el consumo de poliP.

También se encuentra entre las coincidencias con lo observado en los microarreglos de DNA el producto del gen *adhE*, que codifica una proteína con tres funciones dependientes de hierro: alcohol deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y piruvato-fomato liasa desactivasa [Kessler y cols., 1991].

La última coincidencia entre proteómica cuantitativa y microarreglos de DNA para las proteínas que disminuyen en esta mutante es la fructosa bifosfato aldolasa clase II, codificada en el gen *fbpA*. Mutantes para este gen exhiben defectos, como por ejemplo ser sensibles al calor o en la transcripción de rRNA, que podrían ser provocados por los alterados niveles de ppGpp y de cebadores de NTPs [Schneider y Gourse, 2003].

Algunas de las proteínas con niveles disminuidos que coinciden en los experimentos de proteómica cuantitativa con los de microarreglos de DNA concuerdan con los fenotipos observados para esta mutante, como la dificultad para sobrevivir en condiciones de estrés y en la fase estacionaria del crecimiento [Kornberg y col., 199]. Esta correlación en las proteínas relacionadas con estos procesos aportan evidencia de los efectos pleiotrópicos de los poliP.

10.3.2 Cepa mutante *Appx*

Para el caso de esta cepa mutante se identificaron un total de 73 proteínas con niveles disminuidos. De las proteínas identificadas mediante proteómica cuantitativa (ICPL), resulta de gran interés para destacar proteínas como la malato sintasa G, la acetato/coA ligasa, la citrato sintasa, la succinato deshidrogenasa y fumarato reductasa, la aconitato hidratasa (1 y 2), la malato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa, la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (subunidad E1 y E2), la succinil-

coA sintetasa, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la superóxido dismutasa, la piruvato quinasa, la malato sintasa, la formato deshidrogenasa, la fosfoenolpiruvato sintasa y la ATP sintasa (subunidad alfa y beta). Todas estas enzimas pertenecen a vías metabólicas relacionadas con la formación de ATP y de poder reductor en la célula.

Las categorías de ontología (GO) representadas por sobre el azar para el caso de esta cepa mutante fueron el ciclo de Krebs (GO:06099), los procesos catabólicos de la acetil-coA (GO:46356), el ciclo del glioxilato (GO:06097), la respiración aeróbica (GO:09060) y la actividad transferasa (GO:46912), dando cuenta de un ajuste del metabolismo energético experimentado por la bacteria ante la imposibilidad de utilizar y degradar los poliP. Nuevamente, es importante destacar que lo observado en las proteínas para esta mutante es contrario a lo observado en el mutante *Δppk1*.

Esta cepa mutante es la que presenta un mayor número de proteínas que disminuyeron su abundancia relativa en comparación con los datos de microarreglos de DNA (10), entre las que destacan dos enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs y algunas proteínas relacionadas con procesos respiratorios y oxidativos.

Entre las enzimas relacionadas con el ciclo de Krebs está la malato sintasa G. Junto a esta enzima, también disminuye la citrato sintasa, enzima clave para este ciclo pues es la que incorpora el acetil-coA en el ciclo para formar citrato. Una disminución en el ciclo responsable de la generación del poder oxidativo necesario para la generación de ATP podría dar cuenta de un ahorro energético por parte de la célula producto de la acumulación de poliP o por la imposibilidad de utilizarlos debido a la carencia de la PPX.

Normalmente, los niveles de poliP intracelulares en *E. coli* fluctúan entre 5-20 mM [Rao y col., 1998]. En una condición de estrés, se estimula la acumulación de poliP inhibiendo la PPX. En estas condiciones se ha reportado que los niveles de poliP en *E. coli* pueden alcanzar los 50 mM [Ault-Riché y col., 1998]. Al acumular poliP disminuye la cantidad biodisponible de fosfato inorgánico (P_i) en la célula, lo que dificulta la síntesis de ATP. Así, ante la ausencia de la PPX la bacteria realiza los ajustes inhibiendo la PPX, lo que permite la acumulación de poliP y por consecuencia se produce esta disminución en algunas de las enzimas relacionadas con el metabolismo energético. Dada la acumulación de los poliP y la incapacidad de la célula para utilizarlos, podría favorecerse la reacción reversa de la PPK, es decir la síntesis de ATP a partir de los poliP. Esto sucede en exceso de ADP y poliP. Se ha reportado para *E. coli* que en fase estacionaria los poliP son el 1% (0,1mM) de ATP, por lo que no es posible que sean utilizados como fuente de energía [Kornberg y col., 1999]. Sin embargo, en fase exponencial no se sabe con detalle que ocurre.

Otra enzima relevante que disminuye sus niveles en esta cepa es la succinato deshidrogenasa/fumarato reductasa, producto del gen *frdB*. Ésta es una proteína de membrana interna involucrada con el proceso respiratorio de la célula. En condiciones anaeróbicas, la cadena transportadora de electrones fluye hasta esta enzima, que permite la reducción del fumarato para producir succinato, que es el último aceptor de electrones [Maklashina y col., 1998]. Esta enzima muestra un comportamiento contrario a lo observado en la mutante $\Delta ppk1$, donde la categoría de ontología correspondiente a la respiración aneróbica se ve aumentada y no disminuida.

Otro producto génico que ve disminuida su expresión en esta cepa es el de un probable regulador transcripcional tipo LacI, de unión periplásmica. Este tipo de reguladores reprime la expresión de un grupo de genes (posiblemente un operón) impidiendo la unión de la RNA polimerasa. Una disminución en este tipo de reguladores permitiría entonces la expresión de dichos genes reprimidos. De ser así, se debería observar el aumento de estos genes en la mutante carente de la PPX. Caracterizar este regulador sería útil para conocer qué genes regula y por qué depende de los niveles de poliP o de la presencia de la enzima PPX.

Otra enzima importante que disminuye sus niveles en esta cepa mutante es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, encargada de convertir el fosfoenolpiruvato (PEP) en oxaloacetato, ingresando al ciclo de Krebs para producir succinato. Esta reacción es muy favorable energéticamente y libera fosfato inorgánico [Zhang y col., 2009]. La disminución en los niveles de esta proteína concuerda con lo observado para la categoría de ontología del ciclo de Krebs.

10.3.3 Cepa mutante Δ *poliP*

En el caso de esta cepa mutante se lograron identificar un total de 29 proteínas con los niveles disminuidos con respecto a la condición control (wt). Esto se contradice con la idea de que esta cepa mutante debería ser la sumatoria de los fenotipos de las mutantes simples. Es más, al parecer a la bacteria *E. coli* le afecta más la ausencia de una de las dos enzimas encargadas del metabolismo de los poliP (PPK1 y PPX) que la carencia del operón *poliP* completo. Esto resulta curioso, ya que pese a que los poliP están presentes en todas las células, no todas poseen PPK1 y PPX. Sin embargo, de la lista de las proteínas que se detalla en la Tabla 4, son interesantes

proteínas como la acetato/coA ligasa, la malato deshidrogenasa, una ferritina de la familia Dps y una NADH deshidrogenasa.

El bajo número de proteínas identificadas para esta cepa mutante no permite obtener un buen resultado de un análisis bioinformático de enriquecimiento molecular, ya que ninguna de las categorías de ontología (GO) se ven representadas por sobre el azar.

En la doble mutante, se observaron cuatro coincidencias de proteínas que disminuyeron su abundancia relativa. De ellas, la malato deshidrogenasa disminuye en dos de las tres las cepas mutantes. Esta enzima es responsable de producir oxaloacetato a partir de malato, en el ciclo de Krebs. Una disminución de esta enzima da cuenta del rol de los poliP en el metabolismo energético y del efecto pleiotrópico que este biopolímero presenta al afectar distintos puntos de una ruta metabólica.

Otra proteína relevante que disminuye sus niveles es la arginina descarboxilasa, responsable de la transformación de arginina en agmatina. Esta enzima forma parte de un mecanismo de resistencia de la bacteria frente a una disminución en el pH intracelular. La descarboxilación de la Arginina permite consumir un protón y aumentar la carga positiva interna. Esto estaría compensado con la inclusión de una carga negativa, posiblemente cloruro [Richard y Foster, 2004].

Otra proteína que disminuye sus niveles en la doble mutante es un probable transportador de eflujo tipo RND, codificado en el gen *YhiI*. Esta proteína correspondería a una proteína de fusión de membrana. El gen se encuentra situado entre proteínas anotadas como probables. La disminución en la expresión de un transportador da cuenta de un ajuste homeostático experimentado por la bacteria. En

este caso, este ajuste estaría relacionado con los niveles de poliP o con las enzimas responsables de su metabolismo. Una caracterización de este transportador de nutrientes permitiría tener una idea más acertada y precisa sobre la relación que tendría esta proteína con los poliP.

La cuarta proteína que presenta disminución de sus niveles es una probable 6-fosfogluconolactonasa, codificada en el gen *gieK*. Esta enzima forma parte de la vía de las pentosas fosfato y cataliza la transformación de 6-fosfogluconolactona en 6-fosfogluconato [Collard y col., 1999]. Una disminución en esta enzima afectaría el metabolismo de los carbohidratos, pero se requiere caracterizar esta enzima para determinar el peso que podría presentar en la vía de las pentosas y el efecto relacionado con los poliP.

10.4 Proteínas hipotéticas o de función desconocida

Si bien, se destacaron las proteínas de cierta importancia para el metabolismo de los poliP, también encontramos proteínas que coincidieron con los resultados previos obtenidos mediante microarreglos de DNA. Sin embargo, un dato no menor es el número de proteínas hipotéticas obtenidas en los experimentos de proteómica cuantitativa (ICPL). Se identificaron un total de 33 proteínas hipotéticas, aproximadamente un 10% del total de proteínas identificadas. De estas 33 proteínas, 15 aumentaron sus niveles con respecto a la cepa control (wt) y 18 disminuyeron. De las que aumentaron, 11 lo hicieron en la cepa mutante *Appk1*, mientras que 4 lo hicieron en la cepa mutante *Appx*. La doble mutante (*ΔpoliP*) no presentó proteínas hipotéticas con niveles aumentados. Con respecto a las 18 proteínas hipotéticas que

disminuyeron sus niveles, 9 disminuyeron en la cepa mutante $\Delta ppk1$, 4 en la cepa mutante Δppx y 5 lo hicieron en la doble mutante $\Delta poliP$.

Dilucidar la identidad de estas proteínas hipotéticas identificadas permitiría establecer su relación con los poliP y sus efectos celulares podrían aportar a determinar la función de estas proteínas hipotéticas.

10.5 Análisis bioinformático de las proteínas

El uso de programas especializados en analizar datos obtenidos mediante técnicas a gran escala permite explotar aún más los datos obtenidos y ayuda a establecer una red de interacción de diferentes tipos. Esto nos permite ver nodos importantes de la red que puedan explicar e hipotetizar lo que sucede en la célula cuando alteramos el metabolismo de los poliP. Es por esto, que utilizando el programa *Pathway Tools* v14.5 se analizaron los datos obtenidos mediante el marcaje isotópico de proteínas (ICPL) para las tres mutantes con las que se realizó este trabajo. Este programa, permite ingresar la lista completa de proteínas con variación significativa en sus niveles de abundancia y visualizarlas en un mapa metabólico para identificar qué rutas metabólicas se encuentran afectadas en una condición dada. De esta manera, se identificaron cambios en tres vías metabólicas: La glicólisis y el ciclo de Krebs, la respiración anaeróbica y la fermentación. Para el caso de la primera super vía, se observó un aumento en las enzimas del ciclo de Krebs para la mutante $\Delta ppk1$ y una disminución en la mutante Δppx , como se observa en la Figura 9.



Vía de la Glicólisis y el ciclo de Krebs

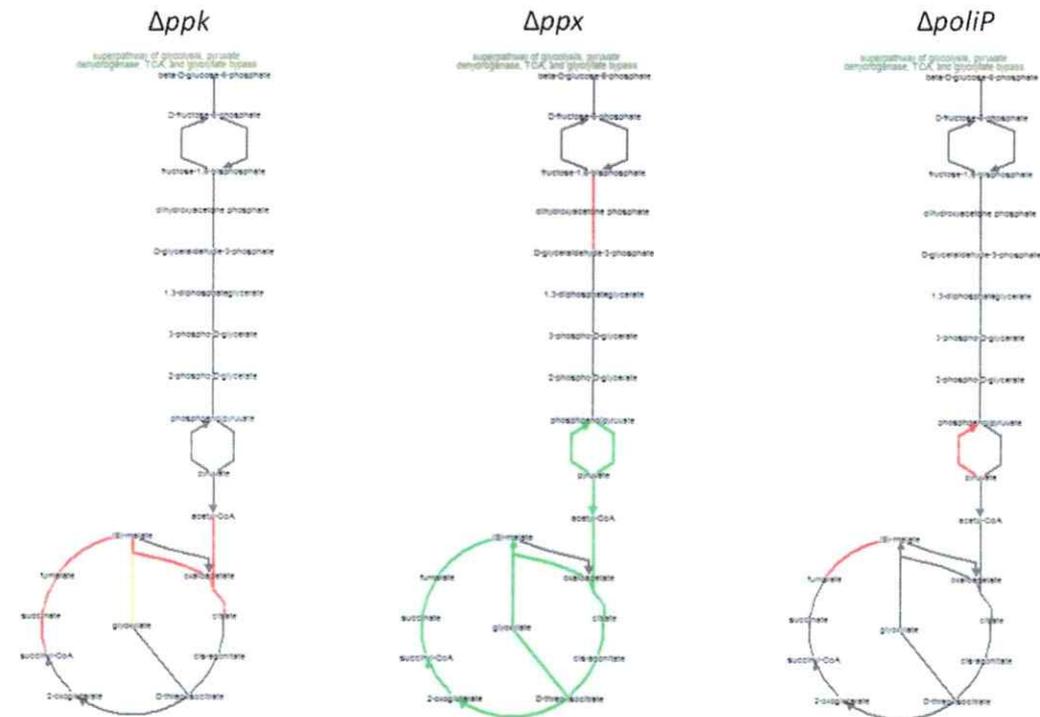


Figura 9. Representación de la vía de la glicólisis y el ciclo de Krebs mediante *Pathway Tools* para el caso de las tres cepas mutantes de este estudio.

La Figura 9 permite ilustrar y corroborar los análisis de enriquecimientos moleculares hechos previamente y da cuenta de los fenotipos energéticos mencionados en las secciones anteriores tanto para la mutante que carece de la PPK1 como para la que carece de la PPX. En la doble mutante, curiosamente, no se observan cambios importantes en esta vía.

En el caso de la fermentación se observa un aumento en una parte de esta vía en la mutante $\Delta ppk1$ y que se encuentra disminuida en la mutante Δppx , como se observa en la Figura 10.

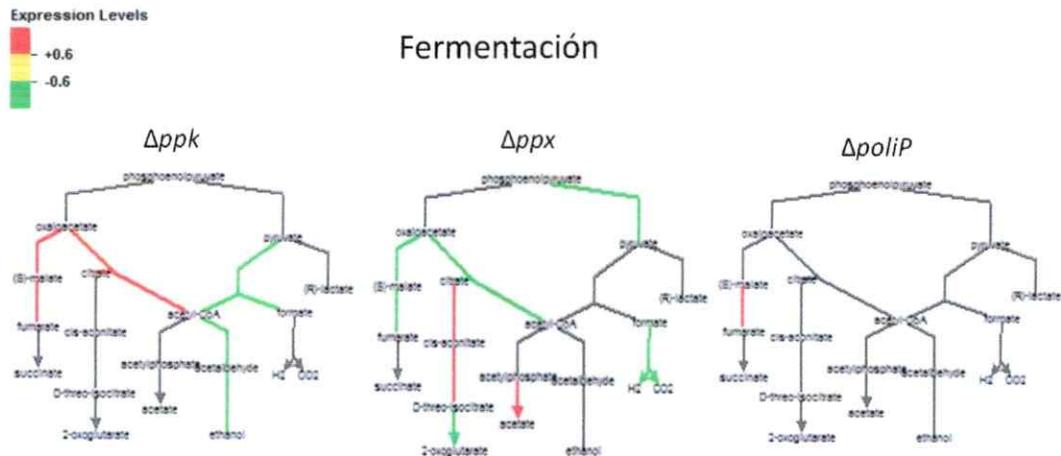


Figura 10. Representación de la ruta metabólica de la fermentación mediante *Pathway Tools* para las tres cepas mutantes utilizadas en este seminario de título.

Pese a que la fermentación es un proceso que se lleva a cabo en carencia de oxígeno, se observa una alteración diferencial en las enzimas de esta vía en las mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx . Esto podría relacionarse con el fenotipo energético mencionado anteriormente, en el que la bacteria trata de obtener energía activando todas las rutas metabólicas que le permitan realizar esto. Estos resultados concuerdan exactamente con lo observado en los microarreglos de DNA.

Para el caso de la respiración anaeróbica, al igual que en el caso de la fermentación se observa un efecto global sobre esta vía, pese a que normalmente se activa en ausencia de oxígeno. Si bien, como se ve en la Figura 11, el efecto no es antagónico como el observado en el caso de la Figura 9 y la Figura 10 para las dos mutantes simples, pero sí se refleja el efecto en más de un nodo de la ruta metabólica.

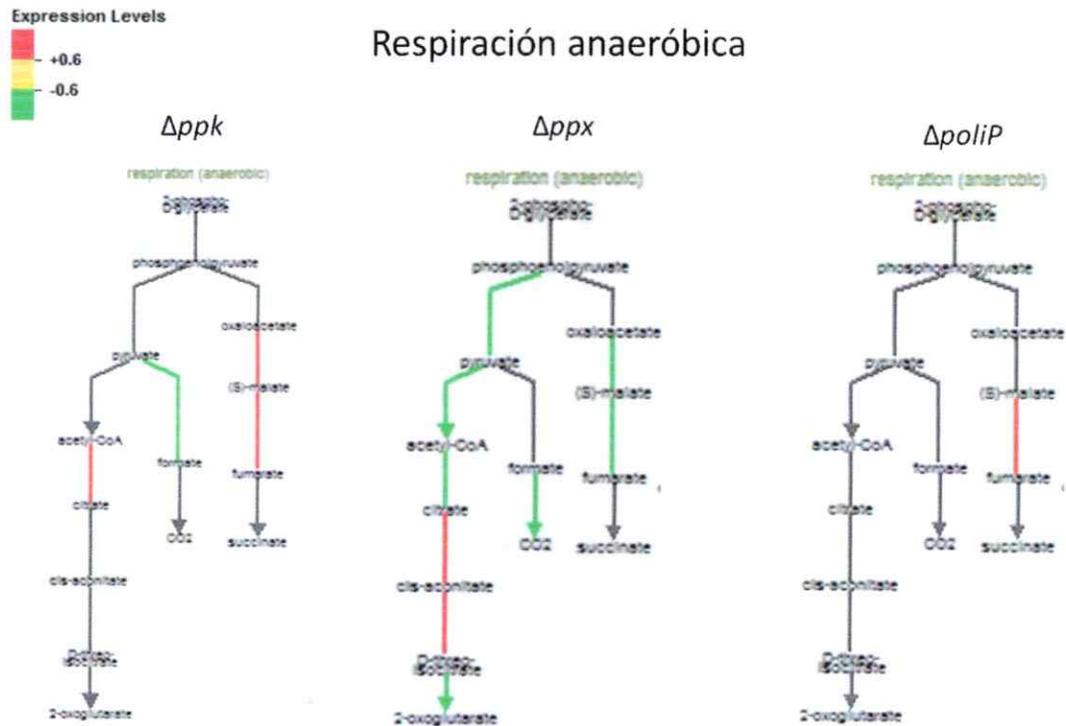


Figura 11. Representación de la vía metabólica de la respiración anaeróbica con los datos obtenidos por proteómica cuantitativa mediante *Pathway Tools* para las tres mutantes utilizadas en este estudio.

Al igual que en las dos rutas metabólicas representadas anteriormente, la doble mutante ($\Delta poliP$) no da cuenta de un efecto global de las vías, producto quizás del bajo número de proteínas identificadas respecto a las otras dos mutantes. Sí es importante señalar que de las pocas proteínas alteradas para la doble mutante en las tres vías metabólicas, todas coinciden con el comportamiento observado para la mutante $\Delta ppk1$.

Pathway Tools también permite analizar los datos desde el punto de vista de los reguladores transcripcionales (que son en gran medida los verdaderos responsables de los ajustes celulares). Para esto, *Pathway tools* posee un mapa de las redes regulatorias para la bacteria *E. coli* que permite visualizar si alguno de estos

reguladores transcripcionales presenta alteración en sus niveles en los datos obtenidos.

Uno de los reguladores transcripcionales interesante que fue detectado por este programa y que es expresado diferencialmente en las tres cepas mutantes con respecto a la condición control es el regulador transcripcional ArcA, perteneciente al sistema regulador de dos componentes ArcB/A. Este sistema, que actúa como sensor de los niveles de O₂ y controla la actividad de varias rutas catabólicas (Bekker et al., 2010). El primer componente, ArcB, es el sensor que transduce la señal (bajo O₂) vía actividad quinasa hasta el segundo componente, ArcA, que posee un dominio de unión a DNA (Figura 12) [Luchi et al., 1992].

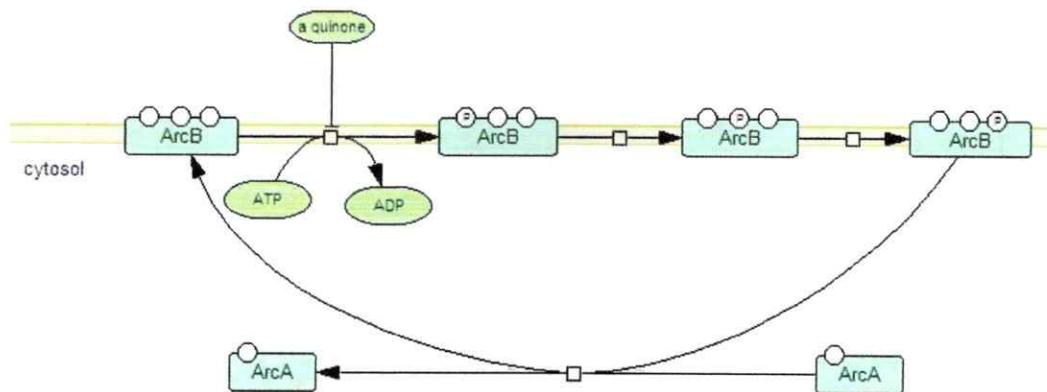


Figura 12. Mecanismo de acción para la activación de ArcA a través de ArcB. ArcB obtiene un grupo fosfato a partir de un ATP, lo transloca a través de sus tres sitios de fosforilación para transferírselo a ArcA, el cual posee dominios de unión a DNA. Tomado de *Pathway Tools*.

El regulador transcripcional ArcA actúa principalmente como un represor de los genes que codifican varias de las proteínas del metabolismo energético. Se ha sugerido que ArcA podría ser activado por un sensor distinto a ArcB, lo que lo relacionaría con la regulación de otros genes (Kato et al., 2007). En la cepa mutante *Δppk1* se observa una disminución en la abundancia relativa de este regulador

transcripcional ($\text{Log}_2 = -1,8206$), lo que se explica el aumento en la abundancia de varias proteínas del metabolismo energético codificadas en los genes que regula ArcA (Figura 12). Entre estos genes regulados se encuentran *nuoB*, *lldD*, *sucD*, *sucC*, *sdhB*, *sdhA*, *gltA*, *fumB*, *fumC*, *fumA*, *gatZ*, *gatY*, *glcB*, *mdh* y *aldA*, que corresponden a varias de las enzimas del ciclo de Krebs y de complejos respiratorios como la succinato deshidrogenasa, la NADH:ubiquinona oxidoreductasa, la citrato sintasa y la malato deshidrogenasa, entre otras enzimas. De esta manera, es muy probable que este regulador transcripcional sea uno de los principales responsables del fenotipo observado en esta mutante en el que se ven aumentadas las rutas metabólicas responsables de la producción de energía (Figura 13).

Por el contrario, en la mutante Δppx , la abundancia de este regulador aumenta respecto a la cepa control ($\text{Log}_2 = 0,8224$), lo que explica la disminución observada de las enzimas relacionadas con el metabolismo energético, como se observa en la Figura 13. Para el caso de la doble mutante, también se observa un incremento en la abundancia de ArcA ($\text{Log}_2 = 0,8479$), sin embargo, sólo son expresados diferencialmente los genes *nuoH*, *hyaB* y *fumC*, que codifican subunidades de complejos respiratorios y fermentativos. Esto podría dar cuenta de que el efecto pleiotrópico de los poliP puede estar acoplado a la fosforilación de ArcA de manera independiente a la fosforilación producida por ArcB, lo que se reflejaría en los ajustes celulares observados frente a los distintos niveles de poliP en *Escherichia coli*.

Resumiendo, es posible hipotetizar que los cambios diferenciales observados entre los mutantes Δppk1 y Δppx en el metabolismo central (ciclo de Krebs, fermentación y respiración anaeróbica) pueden ser explicados por un ajuste experimentado por la

bacteria en el circuito regulatorio responsable del sistema regulador de dos componentes ArcA/B.

Es más, dentro de la red regulatoria que está relacionada con ArcA, se encuentra el regulador transcripcional Fnr, que curiosamente se ve alterado en los enriquecimientos moleculares aplicados a los datos de los microarreglos de DNA. Se ha descrito que ArcA actúa frente a bajos niveles de O₂ (microaerobiosis), mientras que Fnr lo hace en ausencia de O₂ y es responsable de la activación de los sistemas anaeróbicos de la célula [Levanon y col., 2005]. Así, ArcA sería el responsable en primera instancia de la activación de los sistemas anaeróbicos, mientras que Fnr actuaría en segunda instancia.

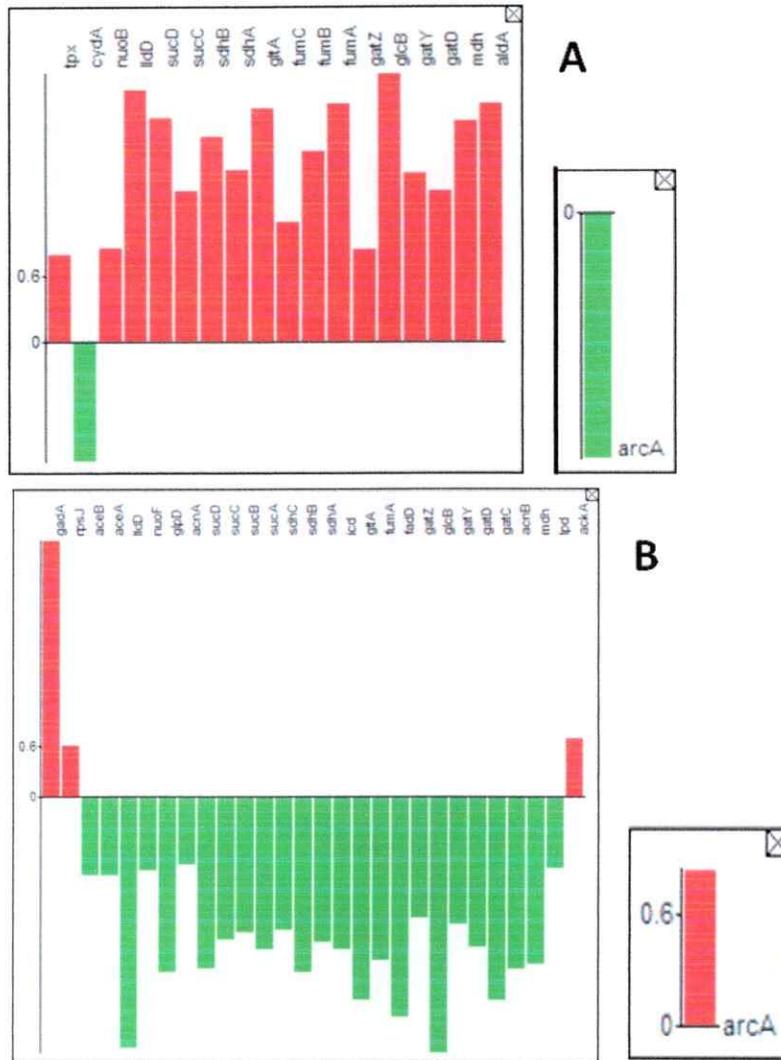


Figura 13. Niveles de abundancia de las proteínas codificadas en los genes que se encuentran bajo la regulación de ArcA. En A, para el caso de la cepa mutante $\Delta ppk1$, donde los niveles de ArcA disminuyen ($\text{Log}_2 = -1,8206$), y en B, para el caso de la mutante Δppx donde los niveles de ArcA aumentan ($\text{Log}_2 = 0,8224$).

Profundizando en la tendencia antagónica en las proteínas de las cepas mutantes $\Delta ppk1$ y Δppx (Figura 13) y que varias de las proteínas que aumentaron sus niveles de abundancia en la cepa que carece de la enzima PPK1, disminuyeron sus niveles en la cepa que carece de la enzima PPX, es que se realizó una comparación entre dichas proteínas con el programa MeV (ver Materiales y Métodos), como se observa en la Figura 14.

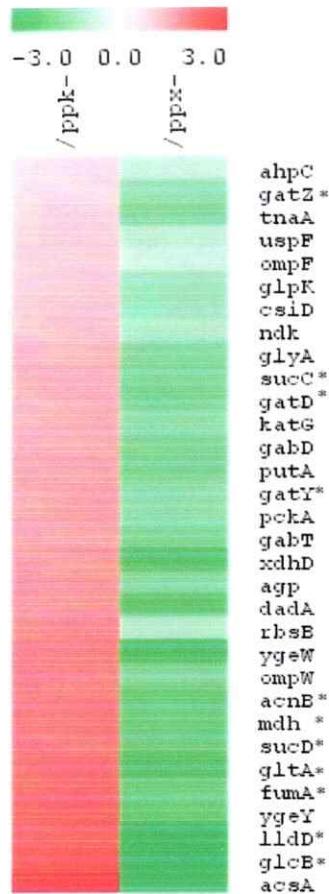


Figura 14. Perfil de abundancia de las proteínas que aumentaron sus niveles en la cepa mutante $\Delta ppk1$ y que a su vez disminuyeron sus niveles en la cepa mutante Δppx . Con asterisco se destacan aquellas proteínas que se encuentran reguladas por el regulador transcripcional ArcA.

De un total de 73 proteínas que disminuyeron sus niveles en la cepa mutante Δppx , 32 de ellas aumentaron sus niveles en la cepa mutante $\Delta ppk1$, presentando este comportamiento antagónico antes mencionado, lo que corresponde a aproximadamente un 44% de las proteínas que disminuyen sus niveles en la cepa que carece de la enzima PPX. De estas 32 proteínas que presentan comportamiento antagónico, 11 de ellas (34%) son reguladas por el regulador transcripcional ArcA, lo que da cuenta de que este regulador es el responsable del fenotipo energético

observado en ambas mutantes y que podría ser activado por una vía diferente a la convencional mediante ArcB, posiblemente relacionado con los poliP.

10.6 Análisis de las proteínas extracelulares

En este trabajo se logró optimizar un protocolo que permite precipitar y separar las proteínas extracelulares de las cepas de *E. coli* mutantes en el metabolismo de los poliP según su punto isoeléctrico y según su tamaño (2D-PAGE) a partir de los cultivos líquidos en medio rico (LB).

Mediante la comparación visual y por el programa PDQuest 8.0 (Bio-Rad, USA) de los geles obtenidos para las proteínas extracelulares de las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este estudio, se logró identificar un total de 18 proteínas expresadas diferencialmente (Tabla 8), las que serán extraídas de los geles para su posterior secuenciación mediante espectrometría de masas en el Centro Nacional de Biotecnología en Madrid (España).

Una vez identificadas estas proteínas será posible tener una visión integral del efecto que tiene sobre la bacteria la alteración del metabolismo de los poliP. Los estudios previos del laboratorio en los que se utilizaron microarreglos de DNA, arrojaron como resultados una disminución en la transcripción de los genes relacionados con la máquina flagelar. Es por esto, que se espera que alguna de las proteínas del proteoma extracelular seleccionadas para su identificación sea la flagelina.

Para el caso de muestras no tan complejas o subproteomas, como el caso de un proteoma extracelular, las técnicas de proteómica convencional siguen siendo una metodología útil para visualizar los cambios experimentados a nivel global en condiciones determinadas. Esto, debido a que al presentar un menor número de

proteínas es posible obtener una mejor separación y resolución en los geles de poliacrilamida, lo que permite una comparación más fácil y cómoda, aunque la manipulación y reproducibilidad de las muestras sigue presentando una gran dificultad.

Las técnicas a gran escala, como la proteómica, permiten obtener una visión general e integrada de los procesos que se ven afectados al modificar una condición. Estos efectos pueden ser a nivel de una proteína (puntuales) como también afectar a varias proteínas relacionadas con el mismo proceso (globales). Como este tipo de técnicas no permite dilucidar los mecanismos moleculares, las interacciones y las posibles regulaciones, se requieren de estudios a nivel de biología celular y molecular para corroborar las hipótesis surgidas en nuestros estudios de proteómica.

La proteómica cuantitativa basada en el marcaje isotópico de las proteínas (ICPL) resultó ser una técnica de gran importancia, pues permitió identificar varias proteínas con niveles de abundancia significativamente distintos a la condición control (wt) evitando un exceso de manipulación de las muestras, lo que se refleja en la dificultad para obtener una muestra con una cantidad importante y representativa de proteína. Además, la metodología ICPL permite mejorar la reproducibilidad de los resultados debido a la resolución y a la poca manipulación de las muestras. Es importante destacar que mediante esta metodología fue posible indentificar incluso factores transcripcionales, como el caso de ArcA, que debido a su baja abundancia, hubiese sido imposible de identificar mediante la proteómica convencional.

A partir de los estudios de gran escala se generan nuevas hipótesis biológicas relacionadas con los cambios observados a nivel global, por lo que la proteómica y

los estudios a gran escala, en general son útiles para generar aproximaciones cuando no se conoce mucho sobre un tema determinado.

En este seminario de título se utilizó la proteómica cuantitativa para identificar las proteínas con niveles alterados en las cepas mutantes relacionadas con el metabolismo de los poliP. Se encontraron algunas proteínas que coincidieron con lo observado mediante microarreglos de DNA, lo que permitirá validar aquellas hipótesis biológicas propuestas a partir de los estudios de genómica funcional.

11 CONCLUSIONES

- i. En este Seminario de Título se aplicó por primera vez y de manera exitosa, una metodología de proteómica cuantitativa (ICPL) para determinar los efectos producidos a nivel global en la bacteria *Escherichia coli*, cuando es alterado el metabolismo de los poliP producto de la carencia en las enzimas encargadas de sintetizar y/o degradar este polímero.
- ii. La alteración del metabolismo de los poliP en la bacteria *Escherichia coli* produjo una alteración en el metabolismo energético, afectando a procesos como el ciclo de Krebs, la fermentación y la respiración anaeróbica. Esto se evidenció mediante los análisis bioinformáticos en los que se revelaron las variaciones en las categorías de ontología (GO) relacionadas con estos procesos. Estos resultados coinciden con lo observado en los microarreglos de DNA.
- iii. Mediante la proteómica cuantitativa se logró identificar un total de 8.753 péptidos, de los cuales se lograron cuantificar un total de 5.377, lo que permitió identificar un total de 908 proteínas en las cuatro cepas utilizadas como modelo de estudio.
- iv. La comparación entre las abundancias relativas de proteínas y transcritos arrojó como coincidencias a un 15% del total de las proteínas identificadas mediante proteómica cuantitativa.
- v. La expresión diferencial del regulador transcripcional ArcA en las cepas mutantes sugiere que una desregulación del sistema ArcA/B sea responsable del fenotipo energético descrito para cada una de las cepas mutantes.

vi. En este trabajo se logró optimizar un protocolo de precipitación de las proteínas extracelulares de *Escherichia coli* que permitió separarlas y visualizarlas mediante métodos convencionales de proteómica. La identificación de estas proteínas permitirá completar estos análisis proteómicos globales.

vii. La complementación de los estudios de genómica funcional permitió obtener datos más precisos sobre los cambios a nivel de proteína y de los transcritos, así como también permitió establecer una correlación entre la cantidad de transcrito y la abundancia relativa de una proteína. Esto permite generar hipótesis biológicas, que pasan a ser parte de las proyecciones de este Seminario de Título, como también lo son el generar modelos matemáticos que permitan describir la influencia de cada uno de los actores moleculares relacionados con los procesos afectados por la alteración del metabolismo de los poliP.

12 BIBLIOGRAFIA

Ahn, K. a. K., A. (1990). "Polyphosphate Kinase from *Escherichia coli*: purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate." *The Journal of Biological Chemistry* 265(20): 11734-11739.

Akiyama, M., Crooke, E. and Kornberg, A. (1993). "An Exopolyphosphatase of *Escherichia coli*: The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon." *The Journal of Biological Chemistry* 268(1): 633-639.

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

Almaula N, Lu Q, Delgado J, Belkin S, Inouye M. (1995). "Nucleoside diphosphate kinase from *Escherichia coli*". *Journal of bacteriology*. 177(9):2524-2529.

Ault-Riché, D., Fraley, C. D., Tzeng, C-M., Kornberg, A. (1998). "Novel Assay Reveals Multiple Pathways Regulating Stress-Induced Accumulations of Inorganic Polyphosphates in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* 180: 1841-1847.

Bae W, Xia B, Inouye M, Severinov K. (2000). "Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(14):7784-9.

Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. and Kuster, B. (2007). "Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review." *Anal Bioanal Chem.* 389: 1017-1031.

Bekker, M., Alexeeva, S., Laan, W., Sawers, G., Teixeira de Mattos, J., Hellingwerf, K. (2010). "The ArcBA two-component system of *Escherichia coli* is regulated by the redox state of both the ubiquinone and the menaquinone pool". *Journal of bacteriology*. 192(3):746-54.

Bolesch, D. G. a. K., J. D. (2000). "Polyphosphate Binding and Chain Length Recognition of *Escherichia coli* Exopolyphosphatase." *The Journal of Biological Chemistry* 275(43): 33814-33819.

Bonting, C. F., Kortstee, G. J., Zehnder, A. J. (1991). "Properties of polyphosphate: AMP phosphotransferase of *Acinetobacter* strain 210A." *J. Bacteriol.* 173: 6484-6488.

Bou-Abdallah, F., Lewin, A., Le Brun, N., Moore, G. R., Chasteen, N. D. (2002). "Iron Detoxification Properties of *Escherichia coli* Bacterioferritin." *The Journal of Biological Chemistry* 277: 37064-37069.

Boyle, E., Weng, S., Gollub, J., Jin, H., Botstein, D., Cherry, J., Sherlock, G. (2004). "GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes." *Bioinformatics* 20(18): 3710-3715.

Brosius, J., Arfsten, U (1978). "Primary structure of protein L19 from the large subunit of *Escherichia coli* ribosomes." *Biochemistry* 17: 508-516.

Brown, M. R. W. a. K., A. (2004). "Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species." *PNAS* 101(46): 16085-16087.

Cha M-K, Kim W-C, Lim C-J, Kim K, Kim I-H. (2004) *Escherichia coli* periplasmic thiol peroxidase acts as lipid hydroperoxide peroxidase and the principal antioxidative function during anaerobic growth. *The Journal of biological chemistry*. 279(10):8769-78.

Chávez, F. P., Lünsdorf, H. and Jerez, C. A. (2004). "Growth of Polychlorinated-Biphenyl-Degrading Bacteria in the Presence of Biphenyl and Chlorobiphenyls Generates Oxidative Stress and Massive Accumulation of Inorganic Polyphosphate." *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 3064-3072.

Chávez, F. P., Gordillo, F., Jerez, C. A. (2006). "Adaptative responses and cellular behaviour of biphenyldegrading bacteria toward polychlorinated biphenyls." *Biotechnol. Adv.* 24: 309-320.

Chávez, F. P., Mauriaca, C. and Jerez, C. A. (2009). "Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria " *BMC Research Notes* 2(50).

Chen, C., Korobkova, E., Chen, H., Zhu, J., Jian, X., Tao, S., He, C., Zhu, H. (2008). "A proteome chip approach reveals new DNA damage recognition activities in *Escherichia coli*." *Nat Methods* 5(1): 69-74.

Choy, J. S., Aung, L. L., Karzai, A. W. (2007). "Lon Protease Degrades Transfer-Messenger RNA-Tagged Proteins." *J. Bacteriol.* 189: 6564-6571.

Collard, F., Collet, J-F., Gerin, I., Veiga-da-cunha, M., Van Schaftingen, E. (1999). "Identification of the cDNA encoding human 6-phosphogluconolactonase, the enzyme catalyzing the second step of the pentose phosphate pathway." *FEBS Letters* 459(2): 223-226.

Crooke, E., Akiyama, M., Rao, N. N. and Kornberg, A. (1994). "Genetically Altered Levels of Inorganic Polyphosphate in *Escherichia coli*." *The Journal of Biological Chemistry* 269(9): 6290-6295.

Erb, T. J., Berg, I. A., Brecht, V., Müller, M., Fuchs, G., Alber, B. E. (2007). "Synthesis of C₅-dicarboxylic acids from C₂-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: The ethylmalonyl-CoA pathway." *PNAS* 104: 10631-10636.

Fraley, C. D., Rashid, M. H., Lee, S. S. K., Gottschalk, R., Harrison, J., Wood, P. J., Brown, M. R. W. and Kornberg, A. (2007). "A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects." *PNAS* 104(9): 3526-3531.

Graves, P. R., Haystead, T. A. (2002). "Molecular biologist's guide to proteomics." *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 66: 39-63.

Hansen, A., Qiu, Y., Yeh, N., Blattner, F., Durfee, T., Jin, D. (2005). "SspA is required for acid resistance in stationary phase by downregulation of H-NS in *Escherichia coli*". *Molecular microbiology*. 56(3):719-34.

Harutyunyan, E., Oganessyan, V., Oganessyan, N., Avaeva, S., Nazarova, T., Vorobyeva, N., Kurilova, S., Huber, R., Mather, T. (1997). "Crystal Structure of Holo Inorganic Pyrophosphatase from *Escherichia coli* at 1.9 Å Resolution. Mechanism of Hydrolysis". *Biochemistry*, 36(25):7754-7760.

Hengge-Aronis, R. (2002). "Signal transduction and regulatory mechanism involved in control of the sigma(s) (*RpoS*) subunit of RNA polymerase." *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 66: 373-395.

Herzberg M, Kaye IK, Peti W, Wood TK. (2006). "YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport". *Journal of bacteriology*. 188(2):587.

Hooley, P., Whitehead, M. P., Brown, M. R. (2008). "Eukaryote polyphosphate kinases: is the 'Kornberg' complex ubiquitous?" *Trends Biochem. Sci.* 33: 577-582.

Hsieh, P. C., Shenoy, B. C., Jentoft, J. E., Phillips, N. F. (1993). "Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: evidence that poly(P) and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme." *Protein Expr. Purif.* 4: 76-84.

Huang, R., Reusch, R. N. (1996). "Poly(3-hydroxybutyrate) is associated with specific proteins in the cytoplasm and membranes of *Escherichia coli*." *J. Biol. Chem.* 271: 22196-22202.

Ishige, K., Zhang, H., Kornberg, A. (2002). "Polyphosphate kinase 2 (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP". *PNAS*. 99(26):16684-16688.

Ishihama, Y., Schmidt, T., Rappsibler, J., Mann, M., Hartl, F. U., Kerner, M. J. and Frishman D. (2008). "Protein abundance profiling of the *Escherichia coli* cytosol." *BMC Genomics*. 9: 102-118.

Iuchi S., Lin E. (1992). "Purification and phosphorylation of the Arc regulatory components of *Escherichia coli*". *Journal of bacteriology*. 174(17):5617-23.

- Jahid, I. K., Silva, A. J. and Benitez, J. A. (2006).** "Polyphosphate Stores Enhance the Ability of *Vibrio cholerae* To Overcome Environmental Stresses in a Low-Phosphate Environment." *Applied and Environmental Microbiology* 72(11): 7043-7049.
- Jennings, M. P., Beacham, I. R. (1989).** "Analysis of the *Escherichia coli* Gene Encoding L-Asparaginase II, *ansB*, and Its Regulation by Cyclic AMP Receptor and FNR Proteins." *J. Bacteriol.* 172: 1491-1498.
- Jensen KF, Nygaard P. (1975).** "Purine Nucleoside Phosphorylase from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Purification and Some Properties". *European Journal of Biochemistry.* 51(1):253-265.
- Jeruzalmi, D., Yurieva, O., Zhao, Y., Young, M., Stewart, J., Hingorani, M., O'Donnell, M., Kuriyan, J. (2001).** "Mechanism of Processivity Clamp Opening by the Delta Subunit Wrench of the Clamp Loader Complex of *E. coli* DNA Polymerase III." *Cell.* 106: 417-428.
- Karp, N. A., Spencer, M., Lindsay, H., O'Dell, K., Lilley, K. S. (2005).** "Impact of Replicate Types on Proteomics Expression Analysis." *Journal of Proteome Research* 4: 1867-1871.
- Keasling, J. D., Hupf, G. A. (1996).** "Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*." *Applied and Environmental Microbiology* 62: 743-746.
- Kern R, Malki A, Abdallah J, Tagourt J, Richarme G. (2007).** "Escherichia coli HdeB is an acid stress chaperone". *Journal of bacteriology.* 189(2):603-10.
- Keseler, I., Collado-Vides, J., Santos-Zavaleta, A., Peralta-Gil, M., Gama-Castro, S., Muñiz-Rascado, L., Bonavides-Martinez, C., Paley, S., Krummenacker, M., Altman, T., Kaipa, P., Spaulding, A., Pacheco, J., Latendresse, M., Fulcher, C., Sarker, M., Shearer, A., Mackie, A., Paulsen, I., Gunsalus, R., Karp, P. (2011).** "EcoCyc: a comprehensive database of *Escherichia coli* biology". *Nucleic acid research.* 39:D583-D590.
- Kessler D, Leibrecht I, Knappe J. (1991).** "Pyruvate-formate-lyase-deactivase and acetyl-CoA reductase activities of *Escherichia coli* reside on a polymeric protein particle encoded by *adhE*". *FEBS letters.* 281(1-2):59-63.
- Kim, K., Rao, N. N., Fraley, C. D. and Kornberg, A. (2002).** "Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp." *PNAS* 99(11): 7675-7680.
- Kornberg, A. (1995).** "Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable." *J. Bacteriol.* 177: 491-496.

- Kornberg, A., Rao, N. N. and Ault-Riché, D. (1999).** "Inorganic Polyphosphate: A Molecule of Many Functions." *Annu. Rev. Biochem.* 68: 89-125.
- Kulaev, I., Vagabov, V., Kulakovskaya, T. (1999).** "New aspects of inorganic polyphosphate metabolism an function." *J. Biosci. Bioeng.* 88: 111-129.
- Kuroda, A., Kornberg, A. (1997).** "Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*." *PNAS* 94: 439-442.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kornberg, A. (2001).** "Role of Inorganic Polyphosphate in Promoting Ribosomal Protein Degradation by the Lon Protease in *E. coli*." *Science* 293: 705-708.
- Lee, P. S. a. L., K. H. (2003).** "*Escherichia coli* - A Model System That Benefits From and Contributes to the Evolution of Proteomics " *Biotechnology and Bioengineering* 84(7): 801-814.
- Lee, S., Lee, Y. and Choi, Y. (2006).** "Molecular characterization of polyphosphate (PolyP) operon from *Serratia marcescens*." *J. Basic Microbiol.* 46(2): 108-115.
- Levanon, S. S., San, K., Bennett, G. (2005).** "Effect of Oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR Regulation Systems and Metabolic Responses". *Biotechnology and bioengineering.* 89(5):556-564.
- Li, Z., Sau, A., Furdui, C., Anderson, K. (2005).** "Probing the role of tightly bound phosphoenolpyruvate in *Escherichia coli* 3-deoxy-d-manno-octulosonate 8-phosphate synthase catalysis using quantitative time-resolved electrospray ionization mass spectrometry in the millisecond time range". *Analytical Biochemistry* 343(1):35-47.
- Loeffler, H., Kitao, A. (2009).** "Collective dynamics of periplasmic glutamine binding protein upon domain closure." *Biophys. J.* 97: 2541-2549.
- Maklashina, E., Berthold, D. A., Cecchini G. (1998).** "Anaerobic Expression of *Escherichia coli* Succinate Dehydrogenase: Functional Replacement of Fumarate Reductase in the Respiratory Chain during Anaerobic Growth." *J. Bacteriol.* 180: 5989-5996.
- Marengo, E., Robotti, E., Antonucci, F., Cecconi, D., Campostrini, N., Righetti, P. G. (2004).** "Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems." *Proteomics* 5: 654-666.

- Matsumoto, Y., Murai, M., Fujita, D., Sakamoto, K., Miyoshi, H., Yoshida, M., Mogi, T. (2006). "Spectrometric analysis of the ubiquinol-binding site in cytochrome bd from *Escherichia coli*". *The Journal of biological chemistry*. 281(4):1905-12.
- Mauriaca, C., Valdivieso, C., Vergara, A., Jerez, C., Chávez, F. (2011). "A transcriptome study of polyphosphate metabolism mutants in *Escherichia coli*". (Manuscrito en construcción).
- Merrikh, H., Ferrazzoli, A. E., Lovett, S. T. (2009). "Growth Phase and (p)ppGpp Control of IraD, a Regulator of RpoS Stability, in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* 191: 7436-7446.
- Mogk A, Deuerling E, Vorderwulbecke S, Vierling E, Bukau B. (2003). "Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation". *Molecular Microbiology*. 50(2):585-595.
- Molina, I., Pellicer, M. T., Badia, J., Aguilar, J., Baldoma, L. (1994). "Molecular characterization of *Escherichia coli* malate synthase G. Differentiation with the malate synthase A isoenzyme." *Eur. J. Biochem.* 224: 541-548.
- Monteoliva, L., Albar, J. P. (2004). "Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches." *Brief. Funct. Genomic Proteomic* 3: 220-239.
- Nandakumar, M. P., Cheung, A. and Marten, M. R. (2006). "Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from *Escherichia Coli* W3110." *Journal of Proteome Research* 5(5): 1155-1161.
- Nocek, B., Kochinyan, S., Proudfoot, M., Brown, G., Evdokimova, E., Osipiuk, J., Edwards, A., Savchenko, A., Joachimiak, A., Yakunin, A. (2008). "Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinase in bacteria". *PNAS* 105(46): 17730-17735.
- O'Farrell, P. Z., Goodman, H., O'Farrell, P. H. (1977). "High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Basic as well as Acidic Proteins." *Cell*. 12: 1133-1142.
- Offenbacher, S., Kline, E. S. (1984). "Evidence for polyphosphate in phosphorylated nonhistone nuclear proteins." *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 114-123.
- Ohtomo, R., Sekiguchi, Y., Mimura, T., Saito, M., Ezawa, T. (2004). "Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography." *Anal Biochem.* 328: 139-146.
- Paradela, A., Marcilla, M., Navajas, R., Ferreira, L., Ramos-Fernandez, A., Fernández M., Mariscotti, J. F., García-del Portillo, F. and Albar, J. P. (2010). "Evaluation of isotope-coded protein labeling (ICPL) in the quantitative analysis of complex proteomes." *Talanta* 80: 1496-1502.

Pavlov, E., Aschar-Sobbi, R., Campanella, M., Turner, R. J., Gómez-García, M. R., Abramov, A. Y. (2010). "Inorganic Polyphosphate and Energy Metabolism in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 285: 9420-9428.

Phadtare S., Inouye M. (2001) "Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*". *Journal of Bacteriology*. 183(4):1205.

Pick, U. y Weiss, M. (1991). "Polyphosphate Hydrolysis within Acidic Vacuoles in Response to Amine-Induced Alkaline Stress in the Halotolerant Alga *Dunaliella salina*" *Plant physiology*. 97:1234-1240.

Price, A. C., Zhang, Y., Rock, C. O., White, S. W. (2004). "Cofactor-Induced Conformational Rearrangements Establish a Catalytically Competent Active Site and a Proton Relay Conduit in FabG." *Structure* 12: 417-428.

Rangarajan, E. S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hunh, M., Schrag, J. D., Cygler, M. and Matte, A. (2006). "The Structure of the Exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 Suggest a Binding Mode for Long Polyphosphate Chains." *J. Mol. Biol.* 359: 1249-1260.

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

Rao, N. N., Gómez-García, M. R. and Kornberg, A. (2009). "Inorganic Polyphosphate: Essential for Growth and Survival." *Annu. Rev. Biochem.* 78: 605-647.

Rashid, M. H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D. G., Hamood, A. N., Iglewski, B. H. and Kornberg, A. (2000). "Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*." *PNAS* 97(17): 9636-9641.

Rashid, M. H. a. K., A. (2000). "Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*." *PNAS* 97(9): 4885-4890.

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

Reusch, R. N., Sadoff, H. L. (1988). "Putative structure and functions of a poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes." *PNAS* 85: 4176-4180.

Reusch, R. N., Huang, R., Bramble, L. L. (1995). "Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca^{2+} channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*." *Biophys. J.* 69: 754-766.

Richard, H., Foster, J. (2004). "Escherichia coli Glutamate- and Arginine-Dependent Acid Resistance Systems Increase Internal pH and Reverse Transmembrane Potential." *J. Bacteriol.* 186: 6032-6041.

Russell, L., Yamazaki, H. (1978). "The dependence of *Escherichia coli* asparaginase II formation on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein." *Can. J. Microbiol.* 24: 629-631.

Sambrook, J., Russell, D. W. (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schneider DA, Gourse RL. (2003). "Changes in the Concentrations of Guanosine 5J-Diphosphate 3J-Diphosphate and the Initiating Nucleoside Triphosphate Account for Inhibition of rRNA Transcription in". *Journal of bacteriology.* 185(20):6192-6194.

Schneider, D., Pohl, T., Walter, J., Dörner, K., Kohlstädt, M., Berger, A., Spehr, V., Friedrich, T. (2008). "Assembly of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 735-739.

Shi, x., Rao, N. N. and Kornberg, A. (2004). "Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: Motility, biofilm formation, and sporulation." *PNAS* 101(49): 17061-17065.

Strohmaier H, Remler P, Renner W, Högenauer G. (1995). "Expression of genes *kdsA* and *kdsB* involved in 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid metabolism and biosynthesis of enterobacterial lipopolysaccharide is growth phase regulated primarily at the transcriptional level in *Escherichia coli* K-12". *Journal of bacteriology.* 177(15):4488-500.

Stumpf, J. D., Foster, P. L. (2005). "Polyphosphate kinase regulates error-prone replication by DNA polymerase IV in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 57: 751-761.

Sureka, K., Dey, S., Datta, P., Kumar, S. A., Dasgupta, A., Rodrigue, S., Basu, J., Kundu, M. (2007). "Polyphosphate kinase is involved in stress-induced *mprAB-sigE-rel* signalling in *mycobacteria*." *Mol. Microbiol.* 65: 261-276.

Tanaka, S., Lee, S. O., Hamaoka, K., Kato, J., Takiguchi, N., Nakamura, K., Othake, H., Kuroda, A. (2003). "Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microtholunatus phosphovorius*." *J. Bacteriol.* 185: 5654-5656.

Tonella, L., Hoolgland, C., Binz, P. A., Appel, R. D., Hochstrasser, D. F., Sánchez, J. C. (2001). "New perspectives in de *Escherichia coli* proteome investigation." *Proteomics* 1: 409-423.

Traxler, M. F., Summers, S. M., Nguyen, H., Zacharia, V. M., Hightower, G. A., Smith, J. T., Conway, T. (2008). "The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*." *Mol. Microbiol.* 68(5): 1128-1148.

Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., Van Melderen, L. (2006). "Biological roles of the Lon ATP-dependent protease." *research in microbiology* 157(8): 701-713.

Van Veen, H. W., Abee, T., Kortstee, G. J. J., Periera, H., Konings, W. N., Zehnder, A. J. B. (1994). "Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A." *J. Biol. Chem.* 269: 29509-29514.

Varela, C., Mauriaca, C., Paradela, A., Albar, J. P., Jerez, C., Chávez, F. (2010). "New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study". *BMC.* 10:7.

Vera, M., Pagliai, F., Guiliani, N., Jerez, C. A. (2008). "The chemolithoautotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans* can survive under phosphate-limiting conditions by expressing a C-P lyase operon that allows it to grow on phosphonates." *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1829-1835.

Wendrich, T. M., Blaha, G., Wilson, D. N., Marahiel, M. A., Nierhaus, K. H. (2002). "Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA." *Molecular cell* 10(4): 779-788.

Wigneshweraraj S., Kuznedelov K., Severinov K, Buck M. (2003). "Multiple roles of the RNA polymerase beta subunit flap domain in sigma 54-dependent transcription". *The Journal of biological chemistry.* 278(5):3455-65.

Williams, M., Ouyang, T., Flickinger, M. (1994). "Starvation-induced expression of SspA and SspB: the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation". *Mol. Microbiol.* 11(6) 1029-43.

Wintermeyer, W., SavelsBergh, A., Semenov, Y., Katunin, V., Rodnina, M. (2001). "Mechanism of Elongation Factor G Function in tRNA Translocation on the Ribosome". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66:449-458.

Xiao-Xia Xia, M.-J. H., Sang Yup Lee and Jong-Shin Yoo (2008). "Comparison of the extracellular proteomes of *Escherichia coli* B and K-12 strains during high cell density cultivation." *Proteomics* 8: 2089-2103.

Zhang, H., Ishige, K., Kornberg, A. (2002). "A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria". *PNAS* 99(26): 16678-16683.

Zhang, H., Gómez-García, M. R., Brown, M. R., Kornberg, A. (2005). "Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: influence on development, sporulation and predation." *PNAS* 102: 2731-2735.

Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C., Jarboe, L. R., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2009). "Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*." *PNAS* 106: 20180-20185.

Zhu, Y., Lee, S. S., Xu, W. (2003). "Crystallization and characterization of polyphosphate kinase from *Escherichia coli*." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 997-1001.

Zhu, Y., Huang, W., Lee, S. S. K. and Xu, W. (2005). "Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis." *EMBO reports* 6(7): 681-687.