

UCH-FC  
Biotecnología  
V293  
C.A



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Estudio de proteómica diferencial en  
*Pseudomonas sp.B4* con niveles deficientes de  
polifosfatos**



***CRISTIÁN HERNÁN VARELA RAMÍREZ***

Abril 2009  
Santiago - Chile

**Director Seminario de Título**  
Dr. Carlos A. Jerez

**Co-Director**  
Dr. Francisco P. Chávez



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“Estudio de proteómica diferencial en *Pseudomonas*  
*sp.*B4 con niveles deficientes de polifosfatos”

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

***CRISTIÁN HERNÁN VARELA RAMÍREZ***

Dr. Carlos A. Jerez  
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Carlos A. Jerez in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Francisco P. Chávez  
Co-Director

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

Comisión de Evaluación

Dr. Michael Handford  
Presidente Comisión

Handwritten signature of Michael Handford in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Ricardo Cabrera  
Corrector

Handwritten signature of Ricardo Cabrera in blue ink, written over a horizontal line.



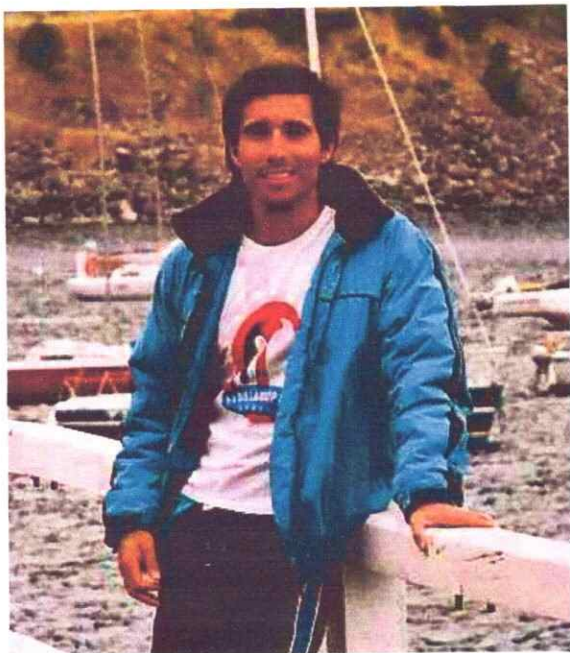
Santiago de Chile, Abril 2009



*Dedicado a mi abuelo,  
por regalarme sus alelos.*

*"Mi canto es de los andamios, para alcanzar las estrellas"*

*Víctor Jara  
(1932-1973)*



Mi historia comienza el mismo día en que mi madre celebraba su cumpleaños número 24. Si bien el mito cuenta que los segundos bebés nacen más fácil que sus predecesores, en esa sala de parto sólo un fórceps en manos de mi neonatólogo me permitió ver la luz. Lo que sí sé no es mito, es que como segundo hijo tuve regalías que mi hermana mayor no tuvo, pues gran porcentaje de mis travesuras de infancia quedaron enterradas bajo gruesas capas de impunidad.

Desde pequeño sentí la necesidad de querer saber cómo funcionaba y para qué servía cada uno de los artefactos que tenían la mala suerte de meterse en mi campo visual. Ésto, sumado a la falta de castigo y a la venia de mi abuelo materno, terminaron por convertir a mi casa (y muchas veces las de otros) en talleres improvisados en donde todo podía ser desarmado.

De mi niñez, recuerdo con inmensa felicidad tardes enteras en el taller de mi abuelo “arreglando” máquinas que yo nunca supe bien cómo funcionaban, preguntas más y respuestas tuyas eran, básicamente, la dinámica de las conversaciones. Cuando las preguntas no olían a aceite y a grasa en el taller; un olor a naranjas o a higos amenizaba la conversación arriba del techo de la casa, en donde se podían ver el cielo, las nubes, las copas de los árboles, los gatos y las aves; flora y fauna que desde el suelo no estaba disponible. Fue en esas tardes donde la física, las matemáticas, la química y por sobre todo la biología golpearon la puerta de mi vida; pero lo supe muchos años después.

Mi infancia transcurrió entre el tenis y el fútbol, pasiones que nunca me dieron mucho rédito dentro de la cancha, pero que desde la galería me lo han dado todo. Años más tarde, durante mi adolescencia, fueron las artes marciales las que ocuparon un espacio importante de mi vida. Hasta el día de hoy, la actividad física sigue siendo una de mis pasiones. Y si de pasiones se trata, es en la música donde muchas veces he encontrado tranquilidad, paz y felicidad. No puedo dejar de mencionar a mi equipo de fútbol, la Universidad de Chile, al cual he seguido incondicionalmente durante toda mi vida y por el cual he llorado, reído y destrozado mi garganta.

En términos académicos, la responsabilidad corre por parte de mi colegio, fue en el Instituto Nacional donde se forjó mi cariño por la ciencia y el saber. En ese lugar viví una de las etapas más bellas de mi vida y tuve la suerte de conocer grandes maestros (en lo humano y en lo académico) y también tremendos amigos.

Una vez fuera del colegio, los vientos me llevaron por casi 3 años a la Facultad de Odontología; pero el viento cambia, y un segundo intento me hizo encallar en la mítica Facultad de Ingeniería, lugar que si bien no me entregó un diploma, me dio gran parte de mis mejores amigos. Después de las dudas vocacionales (aunque a veces creo que sólo eran las ganas de querer saberlo todo), ingresé a la gloriosa Facultad de Ciencias, en donde viví otra bellísima etapa. Aquí fue donde recibí una sólida formación académica para poder dar mis primeros pasos como científico, de la mano de profesores del más alto nivel. Fue aquí también donde encontré espacio para la amistad, el amor, el fútbol, la diversión y el Charismo, que le ha dado sentido a mi vida en lo espiritual y humano.



“Ser un romántico viajero, y el sendero continuar, ir más allá del horizonte, do remonta la verdad”

## Agradecimientos

En esta hoja quisiera expresar desde lo más profundo de mi corazón mi gratitud hacia todos quienes han estado conmigo en los momentos buenos y también en los malos; a los que de una u otra manera han recorrido este largo camino junto a mí, y que por eso este trabajo en parte también les pertenece.

En primer lugar quisiera agradecer a mis padres Ljubica y Hernán por darme este maravilloso regalo que es la vida y por hacer los esfuerzos que estuvieron en sus manos para que pudiese educarme. También deseo agradecer a mi hermana Alejandra por su cariño, admiración y ayuda en los momentos que lo necesité. A mis tíos Miroslava y Raúl, y a mis primos Dominique y Raúl, por la tremenda ayuda que me dieron abriéndome las puertas de su casa cuando, por esas cosas del destino, la vida me cerró las otras. El valor del cariño que encontré en su casa no lo podré pagar jamás, parte de mi formación como profesional es fruto de ustedes.

Quiero agradecer a mi colegio, el Instituto Nacional, a sus profesores y a sus funcionarios, por todas las cosas que aprendí allí, por los momentos vividos y por los amigos que me entregó. A la Universidad de Chile, la Casa de Bello que también se convirtió en mi casa, a la Facultad de Ciencias y a sus profesores, donde quiera que vaya, llevaré orgulloso mi diploma.

Agradezco al Dr. Carlos Jerez por la confianza al permitirme trabajar en su laboratorio y por la formación como futuro científico. Para mí ha sido un honor y un agrado hacerlo, más aún sabiendo que el orgullo institutano ronda el laboratorio.

También le agradezco al Dr. Francisco Chávez, que además de ser mi mentor directo en lo experimental, en este tiempo también se convirtió en un amigo, gracias por la confianza, el apoyo y la formación. Aprovecho de expresar mi admiración hacia ti como persona y como académico, por tu entrega y pasión con que desarrollas tu trabajo, por jugártela al 100% por tus alumnos, para mí es un honor ser parte de tu F1 de tesis. Es un agrado que viniendo desde tan lejos, te hayas puesto esa camiseta con una U y un chunchito en el pecho que yo tanto amo, sin lugar a dudas que la mereces. Un bullanguero de verdad.

A los correctores Dr. Michael Handford y Dr. Ricardo Cabrera por la disponibilidad para la evaluación y por sus aportes al escrito. Al laboratorio de Fisiología Vegetal por facilitarnos el programa para analizar los geles.

Debo mencionar en estas líneas a don Juan Araos, por la entrega en su trabajo, por tratar de hacernos las cosas más fáciles dentro del laboratorio y por el cariño demostrado, por su amabilidad y gran calidad humana. Sin lugar a dudas una de las personas que recordaré con mucho cariño por el resto de mi vida.

Gracias también a Cecilia Mauriaca por ser parte del team poliP/*Pseudomonas* y la F1 del Fran, por aguantar mis ladridos todo el día en el mesón (no debe ser fácil), por luchar contra la entropía en mi mismo bando y por contagiarme con un poco de tu disciplina.

A Fernando Pagliai y a Claudio Navarro, por la amistad, siempre fue grato compartir el laboratorio con ustedes. Gracias también por compartir sus conocimientos y tener la disposición para aportar con ideas, mejoras a los protocolos y ayuda con los experimentos. Mención a parte las gratas batallas de guante blanco (a veces) en los Fantasy.

A Álvaro, Lissette, Alex, Felipe, Simón y Mauricio A. por ayudarme con los primeros geles y a montar la técnica, aportar con ideas y críticas siempre de buena manera. A Álvaro por las gratas conversaciones de música y crítica social (jeje) y a Felipe por todas las horas de risa de las que me alimentó.

A Coto y a la Rafa, por la buena onda que siempre he percibido de ustedes y hacerme gratas las largas horas de trabajo diario.

Al resto de la gente del laboratorio por la convivencia. A Arrehnius por el tremendo mote con huesillos y a Andrés por sus chocolates y calugas colombianas.

A la gente del Laboratorio del profe Nicolás, en especial a él por sus aportes a mi trabajo en los seminarios y por tratar de darle un valor a la ciencia dentro de la sociedad más allá de lo netamente académico. A la Vale, Maltias, Coté y a Flags gracias por la buena onda, la buena disposición y las buenas tertulias para amenizar el trabajo, las buenas convivencias con cuecas y rock y los carretes que compartimos.

Un gran agradecimiento a mis amigos Bochefianos, por no olvidarse nunca de mí. A Manu y Farmi por las pegas, los préstamos, el apoyo, el cariño, los momentos vividos y toda la buena onda, son grandes de verdad. A la Solsi, Paipa y a Max, por siempre tenerme presente en sus vidas y por el cariño.

A la Mela, Silvia, Loreto, Fran, por ser mis amigas y escucharme siempre, me gustaría tener el todo el tiempo del mundo para verlas más seguido. A Claudia, por el cariño, el apoyo, los préstamos y los sueños que vivimos juntos. A Daniela, por la amistad y la preocupación constante por mí. A Gabriela, por ayudarme a recuperar la fe en Dios. A Gina, por tu sonrisa.

A mi hermano Germán por ser un ejemplo de lucha y esfuerzo, si estoy en esta instancia es por tu apoyo y tus consejos, gracias por no perder nunca la confianza en mis capacidades. Al Pelao por las cosas vividas cuando niños. A Migue y Nico por los carretes y los momentos vividos.

A mis compañeros de carrera que se convirtieron en mis amigos con el correr del tiempo, en especial a Pauli, Pomelo, Diego, la gente de Los Viejos Estandartes, a Cubi, Banana. Las Lillas todas: Dinki, Nayi, Nía, Villasana, Carola, Pao, Romi. Gracias por todo el cariño que siempre me han entregado, los lindos momentos juntos y por hacer de Byron un personaje de culto.

A mis hermanos Charistas, por hacer de este movimiento una forma de vida, una filosofía, por todos los carretes y momentos vividos, a los jugadores del Aleti, por las tardes de gloria. Gracias en especial a Carlos y a Sebastián por la convivencia, por ser mi familia, por escucharme siempre, por apoyarme en mis problemas de manera desinteresada. A Toño, Kote, Vicho y Andrés por ser parte de esta familia, por el aguante, por la ayuda y apoyo, por ser el ala dura del Charismo no viviendo en la Chara, esta también fue su casa. A todos los Charistas por ser fieles discípulos de Richard Kawada y llevar la palabra de Pateste por el mundo entero, cumpliendo con el apostolado que el Charismo nos impone.

Todos íbamos a ser Reyes, de una Chara sobre el mar.

Muchas Gracias a todos.



# Índice de contenidos



1.-	Índice de tablas	iv
2.-	Índice de figuras	v
3.-	Lista de abreviaturas	vi
4.-	Resumen	viii
5.-	Abstract	ix
6.-	Introducción	1
6.1	Polifosfato inorgánico	1
6.1.1	Funciones de los poliPs	4
6.1.2	Biosíntesis y degradación de los poliPs	6
6.1.3	poliPs en Pseudomonas sp.B4	11
6.2	La proteómica como herramienta para el estudio de los poliPs	12
6.3	Objetivos	15
6.3.1	General	15
6.3.2	Específicos	15
7.-	Materiales y métodos	16
7.1	Células, medios y condiciones de cultivo	16
7.1.1	Cepas bacterianas	16
7.1.2	Medios de cultivo	18
7.2	Métodos de biología molecular	19
7.2.1	Extracción de ADN plasmidial	19
7.2.2	Cuantificación de ADN plasmidial	19
7.2.3	Digestión de ADN plasmidial	20
7.3	Métodos de proteómica	20
7.3.1	Preparación del extracto total de proteínas	20

7.3.2	Preparación de las muestras de proteínas extracelulares	21
7.3.3	Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)	22
7.3.4	Tinción de los geles de poliacrilamida	23
7.3.5	Selección de proteínas desde los geles de poliacrilamida	23
7.3.6	Digestión "in-gel" de proteínas y preparación de las muestras	24
7.3.7	Huella peptídica MALDI , análisis MS/MS y búsqueda en bases de datos	25
7.3.8	Análisis LC-ESI MS/MS	26
7.3.9	Búsqueda en bases de datos	26
8.-	Resultados	27
8.1	Verificación fenotípica de las cepas	27
8.2	Condiciones óptimas para la preparación de la muestra para 2D-PAGE	28
8.3	Proteómica Diferencial mediante 2D-PAGE	30
9	Discusión	41
9.1	Determinación de las condiciones óptimas de preparación de las muestras de proteínas	41
9.2	Proteómica diferencial en <i>Pseudomonas sp.</i> B4 deficiente de poliP	42
9.2.1	Proteínas con niveles aumentados en la cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 deficiente de polifosfatos	42
9.2.1.1	Metabolismo energético/Ciclo de Krebs	42
9.2.1.2	Metabolismo de los ácidos grasos	44
9.2.1.3	Plegamiento de las proteínas y respuesta al estrés	46
9.2.1.4	Biosíntesis de los aminoácidos	49
9.2.1.5	Factores traduccionales	51
9.2.2	Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 deficiente de polifosfatos	53
9.2.2.1	Proteínas transportadoras	53



	9.2.2.2 Motilidad	53
	9.2.2.3 Otras proteínas y proteínas de función desconocida	54
10	Conclusiones y Proyecciones	56
11	Bibliografía	62



# 1 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones óptimas de preparación de los extractos de proteínas	30
Tabla 2. Proteínas con niveles aumentados en la cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 deficiente de polifosfatos (poliP-)	36-37
Tabla 3. Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de <i>Pseudomonas sp.</i> B4 deficiente de polifosfatos (poliP-)	39-40



## 2 ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Polifosfato Inorgánico	1
Figura 2. Gránulos de poliP en <i>Pseudomonas sp.B4</i>	3
Figura 3. Expresión constitutiva de <i>PPX1r</i> , Actividad <i>PPX</i> en los extractos y Contenido de poliP en <i>Pseudomonas sp.B4</i> recombinantes	12
Figura 4. Vector de expresión constitutiva pMLS7	17
Figura 5. Vector de expresión constitutiva pS7PPX1	18
Figura 6. Análisis de restricción de plasmidios pMLS7 y pS7PPX1 de <i>Pseudomonas sp.B4</i> . Análisis visual de las colonias en placas de LB-agar	28
Figura 7. 2D-PAGE rango de pH 5-8 de extractos totales de proteínas de <i>Pseudomonas sp.B4</i> poliP+ y poliP-	33
Figura 8. 2D-PAGE rango de pH 5-8 y 4,7-5,9 de extractos totales de proteínas de cepas de <i>Pseudomonas sp.B4</i> poliP+ y poliP-	34
Figura 9. Proteínas con niveles aumentados en la cepa de <i>Pseudomonas sp.B4</i> deficiente de polifosfatos (poliP-)	35
Figura 10. Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de <i>Pseudomonas sp.B4</i> deficiente de polifosfatos (poliP-)	38
Figura 11. Enzimas del ciclo de Krebs sobreexpresadas en cepa poliP(-) durante la fase exponencial	43
Figura 12. Modelo propuesto para el ajuste metabólico bacteriano ante niveles bajos de poliP	46

### **3 LISTA DE ABREVIATURAS**

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

**ABC:** Cassette de unión a ATP

**ACP:** Proteína portadora de acil

**AMP:** Adenosín monofosfato

**Arp:** Proteína relacionada a actina

**ATP:** Adenosín trifosfato

**BLAST:** Herramienta de búsqueda de alineamientos locales

**CE:** Electroforesis capilar

**CBB:** Azul de Coomasie brillante

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**DTT:** Ditioneitol

**EF:** Factor de elongación

**EST:** Expressed sequence tag

**GDP:** Guanosín difosfato

**GTP:** Guanosín trifosfato

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución

**IEF:** Isoelectroenfoque

**LPS:** Lipopolisacárido

**MS:** Espectrometría de masas

**NAD(P):** Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato)

**NCBI:** Centro nacional para la información biotecnológica

PAO: Organismo acumulador de polifosfatos

PHA: Polihidroxicanoato

PHB: Polihidroxiacetato

Pi: Ortofosfato

PMSF: Fenilmetanosulfonilfluoruro

poliP: Polifosfato inorgánico

(p)ppGpp: Guanosina (penta)tetrafosfato

PPK: Polifosfato quinasa

PPX: Exopolifosfatasa

PVDF: Polivinilideno fluoruro

TRAP: Transportador periplásmico independiente de ATP tripartito



#### 4 RESUMEN

El polifosfato inorgánico (poliP) es un polímero lineal de residuos ortofosfato ampliamente distribuido en los organismos vivos. En *Pseudomonas sp.* B4, sus niveles celulares presentan variaciones importantes según la condición fisiológica y/o ambiental en que se encuentre el microorganismo. También se ha demostrado que las células bacterianas con niveles deficientes de poliP son incapaces de moverse, formar biopelículas y además disminuyen su capacidad de sobrevivir en condiciones de estrés. Para estudiar desde un punto de vista global este fenómeno realizamos experimentos de proteómica diferencial en *Pseudomonas sp.* B4 con niveles deficientes de poliP en diferentes condiciones de cultivo y fases del crecimiento.

Encontramos que la disminución de los poliP aumenta los niveles de las chaperonas y los factores de protección contra el estrés oxidativo; de algunas enzimas involucradas en el ciclo de Krebs y la beta oxidación de ácidos grasos; así como de la síntesis del ATP y la biosíntesis de los aminoácidos. Por otro lado, estos bajos niveles de poliP disminuyen la expresión de los transportadores de membrana y de los factores de degradación de las proteínas; la transcripción y la motilidad. Estos resultados sugieren que los poliP están relacionados con el metabolismo energético primario, con los procesos celulares de respuesta al estrés y con el transporte activo de moléculas en la membrana celular

## 5 ABSTRACT

Inorganic polyphosphate (polyP) is a linear chain of phosphate residues widely distributed among all organisms. *Pseudomonas sp.*B4 exhibits different levels of the biopolymer depending on the physiological and/or environmental conditions.

Bacteria with low polyP levels cells are defective in motility, biofilm formation, general stress and stringent responses. The aim of this research is to obtain a global view about this phenomenon using differential proteomic assays in low polyP levels *Pseudomonas sp.* B4 strains, in different growth phases and culture mediums.

We found that low polyP levels increase chaperones and oxidative stress protection factors; as well as some TCA cycle and fatty acids oxidation proteins; ATP and aminoacids biosynthesis are improved under the same condition. On the other hand, these low levels reduce the expression of a wide variety of membrane transporters; protein degradation factors; transcription and motility.

Our results suggest that polyP is related to energetic metabolism, stress and stringent response and the active transport of the molecules through cellular membrane.

## p6 INTRODUCCIÓN

### 6.1 Polifosfato Inorgánico

El polifosfato inorgánico (poliP) es un polímero lineal compuesto por residuos de ortofosfato (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido (Figura 1). Debido a la carencia de una función concreta es considerado un fósil molecular, probable remanente de la evolución prebiótica. El poliP es ubicuo y abundante, ampliamente distribuido en todos los organismos vivos: bacterias, arqueas y eucariontes. Sus funciones en los seres vivos varían considerablemente según la naturaleza del organismo [Kulaev y col., 1999; Brown y Kornberg, 2004].

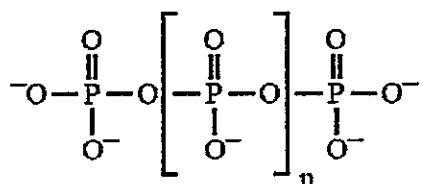


FIGURA 1. Polifosfato Inorgánico. Kornberg y col., 1999.

En los procariontes, los poliPs se encuentran distribuidos en el citoplasma y asociados al periplasma y a la membrana plasmática. Algunas bacterias son capaces de acumular grandes cantidades de poliPs bajo ciertas condiciones (e.g., en *Acinetobacter johnsonii* aislada desde los lodos activados el poliP alcanza hasta un 30% del peso celular) [Deinema y col., 1985] y su concentración depende de la cantidad de fosfato presente en



el medio. En las bacterias del género *Neisseria*, cerca de la mitad del total del polímero forma una cápsula protectora en el exterior de la célula y estaría involucrado en los procesos de patogenicidad [Tinsley y col., 1993]. Por otro lado, en la bacteria *Helicobacter pylori*, éstos se encuentran en el citoplasma, el polo flagelar y asociados a la membrana plasmática [Bode y col., 1993]. Las levaduras y otros microorganismos eucariontes poseen un alto contenido de poliPs en el citoplasma, la vacuola, la mitocondria y el núcleo; mientras que en los animales, los poliPs han sido descritos en altas cantidades en los estadios tempranos de algunas esponjas y en las fracciones subcelulares de los roedores y humanos tales como el núcleo, la mitocondria y la membrana plasmática [Imsiecke y col., 1996; Kumble y Kornberg, 1996].

Mediante microscopía electrónica, los poliPs son visibles como acumulaciones granulares (Figura 2) y al igual que otros polianiones, cambian la absorción de la tinción básica azul de toluidina a una longitud de onda más corta (630nm a 530nm) [Ohtomo y col., 2004].

Los niveles de poliP presentan variaciones importantes según las condiciones fisiológicas y/o ambientales en que se encuentren las bacterias [Kornberg y col., 1999]. Por ejemplo, en condiciones de estrés se observa una acumulación importante de los poliPs, en tanto que las bacterias con niveles disminuidos de poliPs no son capaces de sobrevivir en la fase estacionaria y son menos resistentes al estrés térmico, oxidativo y osmótico [Sureka y col., 2007].

Las enzimas más importantes involucradas en la biosíntesis y degradación de los poliPs son: la polifosfato quinasa (*PPK*), que cataliza la polimerización reversible de la cadena de poliP a partir de ATP y/o GTP [Ahn y Kornberg, 1990]; la poliP-AMP-

fosfotransferasa que utiliza al poliP para fosforilar el AMP; la exopolifosfatasa (*PPX*) que libera Pi desde el extremo de la cadena de poliP; las endopolifosfatasa que cortan el poliP para producir cadenas más cortas; la glucosa-6-fosfotransferasa (glucoquinasa); y la adenosina monofosfato fosfotransferasa entre otras [Kulaev y col., 1999].

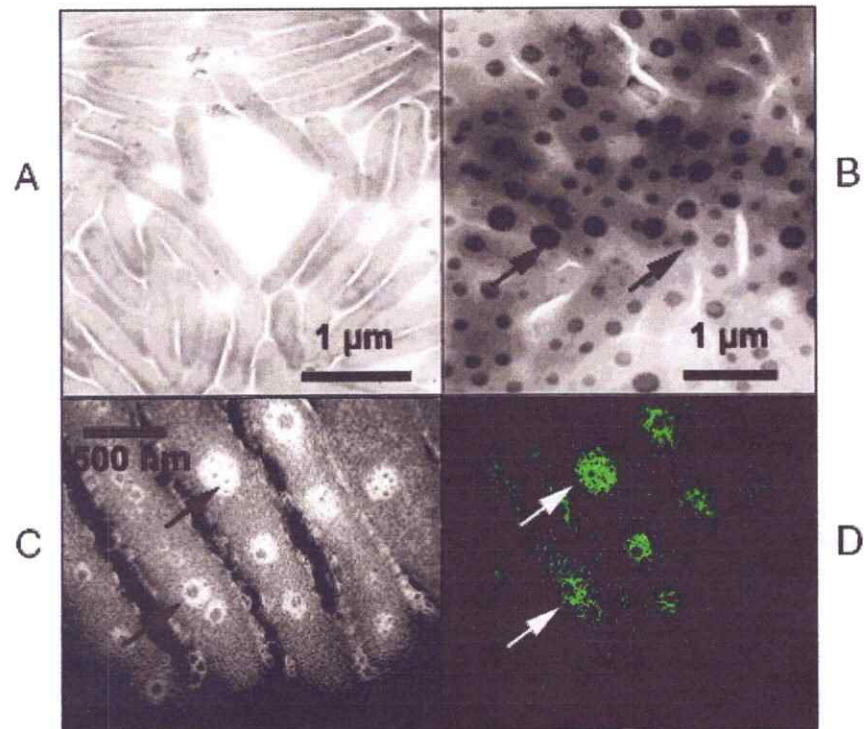


FIGURA 2. Gránulos de poliP (flechas) en *Pseudomonas sp* B4 crecida en glucosa (A) y 4-Cl-bifenilo (B) como únicas fuentes fuente de carbono. Microfotografía electrónica de *Pseudomonas sp*.B4 con gránulos densos al paso de los electrones (C). Distribución de fosfatos (en verde) obtenida por ESI (electron spectroscopy imaging) (D). [Chávez y col., 2006].

### 6.1.1 Funciones de los poliPs

Dentro de las funciones que se le han asignado a los poliPs en los microorganismos se encuentran: 1) fuente de energía en la síntesis del ATP; 2) sustituto del ATP en

reacciones de fosforilación; 3) reserva de Pi; 4) control osmótico; 5) quelante de cationes divalentes; 6) amortiguador intracelular de iones alcalinos; 7) elemento estructural junto con el poli- $\beta$ -hidroxibutirato y el  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana de células competentes para la transformación bacteriana; 8) regulador del desarrollo celular; 9) componente de la cápsula bacteriana [Kornberg y col., 1999].

El poliP es un sustituto del ATP en las reacciones de fosforilación y posee una gran variedad de aceptores de grupos Pi como los azúcares y los ácidos grasos, entre otros. Existen glucoquinasas que utilizan ATP o poliP como donante de grupos Pi, y las especies filogenéticamente más antiguas muestran preferencia estricta por poliP como en el caso de la glucoquinasa en *Microlumatus phosphovorus* [Hsieh y col., 1993; Kornberg, 1995; Tanaka y col., 2003].

El fosfato es un elemento esencial para la célula y su homeostasis puede mantenerse gracias al poliP, el cual cumple la función de reserva, puesto que como complejo agregado con contraiones multivalentes es osmóticamente menos activo que el fosfato libre [Kornberg, 1995]. Sus niveles intracelulares se mantienen en un rango pequeño cercano a 10mM en medios extracelulares que pueden variar su concentración hasta en seis órdenes de magnitud [Rao y col., 2009]. En diversos microorganismos, se ha demostrado que los niveles de poliPs disminuyen en respuesta a la carencia de fosfato en el medio [Vera y col., 2008].

Debido a su condición de polianión, el poliP es un quelante de metales y participa en la detoxificación de algunos metales pesados (Zn, Fe, Cu y Cd) mediante la unión a éstos, lo cual reduce su toxicidad. La entrada de los metales catiónicos a la célula estimula la actividad exopolifosfatasa [Keasling y Hupf, 1996]. En *Acinetobacter johnsonii* los

iones de los metales divalentes y el fosfato inorgánico son excretados como un quelato vía el sistema simporte  $\text{MeHPO}_4/\text{H}^+$  [van Veen y col., 1994]. Por su parte, en el arqueón *Sulfolobus metallicus*, los niveles de poliP muestran un descenso gradual con el incremento de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  en el medio, lo que muestra un posible vínculo entre el poliP y la adaptación del microorganismo a la presencia del metal [Remonsellez y col., 2006].

En la membrana de *Escherichia coli*, se han aislado complejos formados por poliP,  $\text{Ca}^{2+}$  y poli- $\beta$ -hidroxibutirato [Reusch y Sadoff, 1988], los cuales aumentan en las células competentes cuyas membranas son fácilmente permeables al ADN [Huang y Reusch, 1996]. Se ha propuesto que estos complejos están involucrados en el transporte del ADN hacia el interior de la célula; pero estudios más recientes sugieren que servirían como canales de calcio activados por voltaje [Reusch y col., 1995].

El poliP también interactúa con las proteínas básicas (e.g., histonas) y con los dominios básicos de proteínas tales como las polimerasas y las proteínas nucleares no-histonas [Offenbacher y Kline, 1984], lo cual podría dar cuenta de un papel regulatorio en la expresión génica. Debido a que los niveles de poliPs fluctúan en respuesta a las condiciones nutricionales, es posible que éstos funcionen en una red de respuestas que gobiernan las etapas del ciclo celular y el desarrollo. En *E. coli*, existe otra enzima con actividad exopolifosfatasa, la guanosina pentafofato hidrolasa, que produce guanosina tetrafofato (ppGpp), un potente efector en la respuesta bacteriana ante el estrés. Durante la privación de los aminoácidos, la enzima *RelA* genera guanosina pentafofato (pppGpp) a partir de ppGpp que reprime la hidrólisis de poliP por la exopolifosfatasa y permiten su acumulación [Rao y col., 1998].

Otro factor importante en la regulación de la expresión génica durante la fase estacionaria es el factor *RpoS*, cuya transcripción se estimula por ppGpp y que controla la respuesta transcripcional de más de 50 genes en cascadas que contribuyen al ajuste metabólico que permite la dormancia. Este factor, se encuentra también involucrado en la patogenicidad bacteriana en animales y protozoos [Hengge-Aronis, 2002].

En algunos microorganismos, los cambios asociados al desarrollo, ocurren en respuesta a la ausencia de algún nutriente (i.e., formación del cuerpo frutoso y esporas en especies de *Myxobacteria*; esporulación en *Bacillus* y en hongos; y formación del heterocisto en *Cyanobacteria*). En el caso de *Myxococcus xanthus*, la actividad de la poliP-AMP fosfotransferasa está aumentada drásticamente al entrar en la fase estacionaria [Zhang y col., 2005a].

### 6.1.2 Biosíntesis y degradación de los poliPs

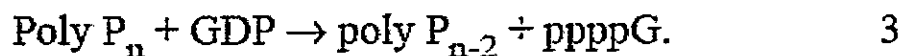
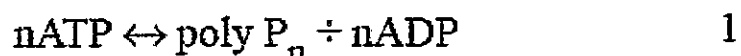
Los principales genes involucrados en el metabolismo del poliP en *E. coli* se encuentran ubicados en el operón *poliP*, el cual posee el gen *ppk* y siete bases río abajo el gen *ppx*, los cuales codifican para las proteínas que sintetizan y degradan el poliP, respectivamente [Akiyama y col., 1993]. Se ha postulado que el operón estaría regulado por el sistema de dos componentes *PhoBR* aunque existen evidencias que apuntan lo contrario [Lee y col., 2006]. En contraste con *E. coli*, en *Pseudomonas aeruginosa* los genes están juntos pero no organizados en un operón, sino que son transcritos de manera divergente [Miyake y col., 1999]. En este último organismo, los análisis indican que el gen *ppk* es transcrito desde un promotor dependiente del factor  $\sigma^E$ , lo cual lo asocia con la respuesta al estrés ambiental. Sin embargo, no existe correulación entre los

promotores de *ppk* y *ppx* en respuesta al shock osmótico o al estrés oxidativo. Durante el estrés osmótico, la transcripción del gen *ppk* es mayor durante la fase estacionaria que en la exponencial; por el contrario, en igual condición, la activación del gen *ppx* es mayor durante la fase exponencial que en la fase estacionaria [Zago y col., 1999].

*Polifosfato quinasa PPK*. Las enzimas con capacidad de sintetizar el poliP que están descritas poseen estructuras diversas y se han nombrado en orden numérico según han sido descubiertas en el tiempo [Hooley y col., 2008].

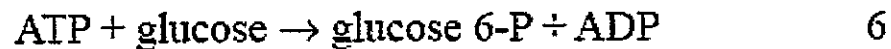
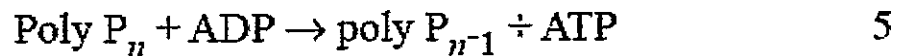
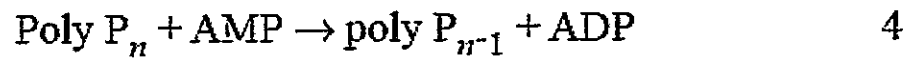
En bacterias, la síntesis del poliP se realiza, principalmente, mediante la polimerización reversible del fosfato terminal del ATP por acción de la enzima polifosfato quinasa *PPK1* (ecuación 1) [Ahn y Kornberg, 1990]. Ésta fue identificada por primera vez en *E. coli* asociada a la membrana interna y se encuentra en más de un centenar de genomas bacterianos, incluyendo patógenos humanos, en donde se ha demostrado que la *PPK1* es esencial en los procesos infectivos y de virulencia (e.g., *P. aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella dublin*). Esta característica la convierte en un blanco interesante en el diseño de fármacos antimicrobianos [Zhu y col., 2003; Zhu y col., 2005]. Además, posee un papel importante en procesos tales como: la formación de biopelículas, la predación, la motilidad y el quorum sensing. No obstante encontrarse distribuida ampliamente en bacterias y arqueas, un gen ortólogo de *ppk1* en eucariontes sólo ha sido reportado en *Dictyostelium discoideum* (*DdPPK1*) [Zhang y col., 2005b]. Los genes responsables de la síntesis de los poliPs en algunas bacterias y en el resto de los eucariontes que no poseen *PPKs* aún no se conocen [Brown y Kornberg, 2004].

Las cepas mutantes de *ppk1* en *P. aeruginosa* PAO1 poseen los niveles de poliPs disminuidos, afectados los procesos tales como la motilidad [Rashid y Kornberg, 2000], la formación de biopelícula y presentan cambios en los niveles de mRNA y una alta compactación del nucleoide [Brown y Kornberg, 2004]. No obstante la baja actividad *PPK1* encontrada en los mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 (i.e., <1% de la actividad de la cepa silvestre), estas mutantes aún mantienen un 20% de los niveles de poliP de la cepa silvestre [Rashid y col., 2000]. Este fenómeno está asociado a la presencia de la enzima *PPK2*, que sintetiza de manera reversible el poliP a partir tanto de GTP como de ATP. Sin embargo, en la célula su función fundamental corresponde a la actividad nucleósido difosfato quinasa (i.e., síntesis de GTP a partir de GDP y poliP) (ecuación 2). El gen *ppk2* codifica para una proteína de 357 residuos aminoacídicos de masa molecular 40,8 kDa, ampliamente conservada en bacterias y también posee ortólogos en arqueas [Zhang y col., 2002]. Otra actividad de la *PPK1* es la transferencia de un grupo pirofosforil desde el poliP a GDP para formar ppppG lineal (ecuación 3) [Kuroda y Kornberg, 1997].



*Utilización y degradación de los poliPs.* El poliP puede ser utilizado como sustrato por las fosfotransferasas y las hidrolasas, que permiten generar ATP a partir de poliP. Mediante la acción combinada de la AMP-fosfotransferasa (ecuación 4) y la *PPK1*

(ecuación 5) el AMP es convertido a ATP, el cual puede ser utilizado por glucoquinasas para formar glucosa 6-fosfato (ecuación 6) [Bonting y col., 1991; Ahn y Kornberg, 1990; Hsieh y col., 1993].



*Exopolifosfatasas.* Estas enzimas hidrolizan los enlaces fosfato terminales de las cadenas de poliP para generar Pi y se encuentran en una gran variedad de organismos. En *E. coli*, la *PPX* es altamente procesiva e hidroliza por completo cadenas de hasta 1000 residuos fosfato sin liberar intermediarios. Posee múltiples sitios de unión a los poliPs en distintos dominios de la enzima, que son responsables del reconocimiento del tamaño del polímero [Bolesch y Keasling, 2000]. En *P. aeruginosa*, la proteína posee 506 residuos aminoacídicos, 58,7 kDa de masa molecular y presenta una identidad cercana al 40% con la *PPX* y la pppGpp-5'-fosfohidrolasa (*GppA*) de *E. coli*. La acumulación de poliP en este organismo, está regulada por la inhibición enzimática de la *PPX* por los nucleótidos de respuesta a estrés ppGpp y pppGpp, sin modulación aparente de las tasas de transcripción de los genes *ppk* y *ppx* [Zago y col., 1999].

Por su parte, en el arqueón *Sulfolobus solfataricus*, se ha reportado una *PPX* de 417 residuos aminoacídicos, activa para degradar las cadenas largas de aproximadamente 800 residuos, y que al ser comparada con *PPXs* presentes en bacterias posee identidades



de secuencia entre 25-45% [Cardona y col., 2002]. Por otro lado, *Saccharomyces cerevisiae* posee varias *PPXs* con actividad enzimática en el citoplasma, la vacuola, la envoltura celular, el núcleo, la matriz y la membrana mitocondrial. Una de ellas corresponde a una exopolifosfatasa citosólica de bajo peso molecular (*scPPXI*, 45 kDa al igual que la *PPX* de la matriz mitocondrial), perteneciente a la familia de fosfoesterasas DHH. El rango de sustrato es de 3 a 1000 residuos, presentando preferencia por cadenas de poliP de aproximadamente 250 residuos y no tiene actividad sobre el pirofosfato, el ATP o la forma cíclica de tripolifosfato [Wurst y Kornberg, 1994]. Las *PPXs* presentes en la vacuola, la membrana mitocondrial y el núcleo corresponden a una *PPX* de alta masa molecular (1000 kDa aproximadamente) [Ugochukwu y col., 2007].

*Endopolifosfatasas.* En *S. cerevisiae* se ha caracterizado una endopolifosfatasa que actúa en los poliPs de cadena larga (más de 60 residuos). En promedio se cortan tres trifosfatos desde la cadena hasta que se obtiene un poliP de 60 residuos (ecuación 7) [Kumble y Kornberg, 1996].



### 6.1.3 PoliPs en *Pseudomonas sp. B4*

La acumulación de poliP en respuesta a la deprivación de nutrientes ha sido reportada en el género *Pseudomonas*, organismos considerados tipo PAO (organismo acumulador

de polifosfatos, sigla en inglés). Dentro de dicho grupo, se encuentra la bacteria *Pseudomonas sp.* B4, neutrófila, heterótrofa e hiperacumuladora de poliP bajo determinadas condiciones y medios de cultivo [Chávez y col., 2004].

La estrategia de generar mutantes del gen *ppk1* en *Pseudomonas sp.* B4 presenta algunas desventajas puesto que su genoma no se encuentra secuenciado. Además, en dicho género se ha reportado la existencia de otras enzimas capaces de sintetizar poliP (i.e., *PPK2*) [Zhang y col., 2002] y que, como ya se indicó, mantienen hasta en un 20% los niveles de poliP. Por lo tanto, la sobreexpresión de la *PPX* es una vía alternativa a la delección del gen *ppk* con el fin de bajar los niveles de poliP celular, puesto que la hidrólisis del polímero es irreversible y provoca la disminución del poliP [Wurst y col., 1995].

En este contexto, es que en nuestro laboratorio se han obtenido bacterias recombinantes con niveles deficientes de poliPs mediante la sobreexpresión de la *scPPXI* con el uso de vectores de amplio rango [Lefebvre y Valvano, 2002]. Los extractos proteicos de las cepas recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 que sobreexpresaron constitutivamente la *scPPXI*, presentaron actividad exopolifosfatasa aumentada en 10 veces en comparación con la cepa control y la remoción de más del 95% del poliP celular (Figura 3). Estas cepas presentan, además, características asociadas a la incapacidad de acumular poliP (i.e., motilidad y capacidad de formación de biopelícula disminuida) [Chávez y col., 2009].

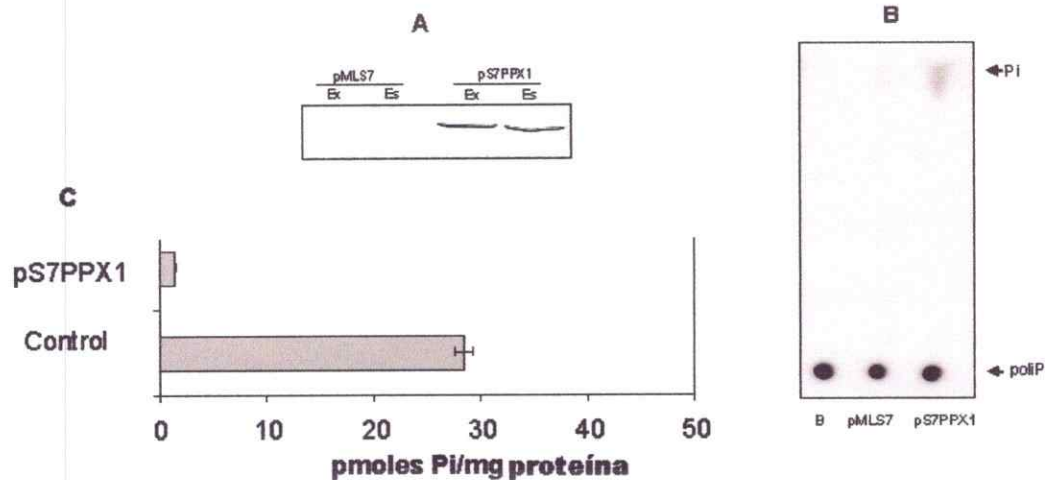


FIGURA 3. A.- Expresión constitutiva de *PPX1r* en *Pseudomonas sp. B4* por Western-blot ( $\alpha$ -His6) de los extractos totales de *Pseudomonas sp. B4* recombinantes en fase exponencial (Ex) y fase estacionaria (Es) de crecimiento en medio LB. B.- Actividad *PPX* en los extractos de *Pseudomonas sp. B4* recombinantes. Cromatografía en capa fina (TLC) de los productos de la actividad *PPX* de extractos totales de células transformadas con los plasmidios de expresión constitutiva *pMLS7* y *pS7PPX1* (B=blanco de reacción). C.- Contenido de poliP en *Pseudomonas sp. B4* recombinantes *pS7PPX1* y *pMLS7* (control) crecidas en medio LB. [Chávez y col., 2009]. La concentración de poliP se expresa en términos de los residuos de Pi que forman ATP [Ault-Riché y col., 1998].

## 6.2 La proteómica como herramienta para el estudio de los poliPs

Las evidencias indican la importancia de los poliPs 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 adversas. No obstante, los cambios metabólicos que se producen en condiciones de carencia del polímero no han sido estudiados con profundidad.

Dados los efectos pleiotrópicos asociados a la disminución de los niveles de poliPs, es necesario un análisis a escala global de la expresión génica que se produce como respuesta a dicha condición, el cual permita determinar los procesos celulares y las proteínas particulares involucradas. En este sentido, es posible realizar estudios a nivel

de la transcripción génica o bien a nivel del proteoma y obtener una visión integrada de la respuesta celular. Estos estudios, permiten tanto identificar como cuantificar los efectos de los actores moleculares que participan en un proceso biológico determinado. Los métodos de la genómica funcional y la proteómica no son necesariamente hipótesis-dependiente, sin embargo, ofrecen información acerca de la transcripción, la regulación genética y la expresión, localización e interacción de las proteínas. En virtud del tipo de información que entregan, ambas aproximaciones son complementarias y resultan de gran utilidad en los estudios donde no existe, necesariamente, información previamente definida.

Las muestras complejas de proteínas pueden ser separadas y visualizadas 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 metodologías más eficiente y menos costosa para tal objetivo [O'Farrell y col., 1977]. El patrón de expresión de las proteínas de un organismo bajo diferentes condiciones puede ser comparado cuantitativa y cualitativamente. Mientras la aparición/aumento o desaparición/disminución de una proteína entrega información acerca de su expresión diferencial, la intensidad de dicho fenómeno informa, cuantitativamente, del nivel de expresión de la proteína [Graves y Haystead, 2002]. Esta metodología incluye, además de la separación por IEF y la masa molecular, la visualización y el análisis de las imágenes, la selección de las proteínas desde los geles, la digestión de éstas, el análisis de los péptidos por espectrometría de masas y la consulta de los espectros obtenidos en las bases de datos disponibles [Monteoliva y Albar, 2004].

Conocer el metabolismo y las funciones de los poliPs a fondo, las causas de los efectos pleiotrópicos asociados a su carencia y los ajustes fisiológicos que las bacterias realizan para enfrentarla permitiría, en teoría, disponer de estrategias de mejoramiento de algunos procesos metabólicos como la biorremediación o la biolixiviación, los cuales se ven potenciados en algunos organismos que acumulan y utilizan poliPs como sustrato para llevarlos a cabo. Con este objetivo planteado se utilizará la proteómica diferencial, específicamente 2D-PAGE, como la metodología idónea para estudiar los efectos de la carencia de poliP en las bacterias.

## **6.3 Objetivos**

### **6.3.1 General**

Estudio de la expresión diferencial del proteoma de *Pseudomonas sp.* B4 (extractos totales y extracelulares) en condiciones normales y de carencia de poliPs.

### **6.3.2 Específicos**

- Desarrollo de un protocolo apropiado para el análisis del proteoma total y los subproteomas de *Pseudomonas sp.* B4 mediante 2D-PAGE.

- Determinar, mediante análisis de geles bidimensionales (2D-PAGE), los cambios del proteoma total y el subproteoma extracelular de *Pseudomonas sp.* B4 deficiente en los niveles de poliP con respecto a una cepa control en condiciones de crecimiento planctónico y en las colonias crecidas en medio sólido.

- Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas mediante MS.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Células, medios y condiciones de cultivo

#### 7.1.1 Cepas bacterianas

Se utilizó como modelo de estudio la bacteria *Pseudomonas sp.* B4, neutrófila, heterótrofa e hiperacumuladora de poliP en condiciones silvestres. Su genoma no se encuentra secuenciado. Esta bacteria fue aislada del río Elba en Alemania y suministrada al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología por el Profesor Kenneth Timmis [Bartels y col., 1999]. El estudio de expresión diferencial de las proteínas se realizó con dos cepas recombinantes portadoras de los plasmidios *pMLS7* y *pS7PPX1* respectivamente (Figuras 4 y 5). La cepa portadora del primero de estos plasmidios corresponde a una cepa control (poliP(+)) con niveles normales de poliP. La cepa portadora del segundo plasmidio (poliP(-)) sobreexpresa la exopolifosfatasa de levadura *scPPX1*, la cual permite obtener cepas con niveles deficientes de poliPs [Chávez y col., 2009].

Descripción de los plasmidios utilizados:

*pMLS7*: plasmidio de expresión constitutiva de amplio espectro derivado del *pBBR1* aislado originalmente de *Bordetella bronchiseptica* [Lefebvre y Valvano, 2002].

Tiene un tamaño de 6.124 pb y se mantienen entre 20 y 30 copias en la célula. El vector codifica una proteína esencial para la replicación (*rep*) y otra para la movilización (*mob*) plasmidial. Posee la región promotora de la proteína ribosomal *S7* y la potente señal terminadora del operón ribosomal (*rrnB*) de *Burkholderia xenovorans* LB400. Contiene el gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) que provee resistencia al antibiótico Trimetoprim. Los transformantes portadores de este plasmidio se utilizaron a lo largo de este trabajo como la cepa control (poliP(+), Figura 4) [Chávez y col., 2009].

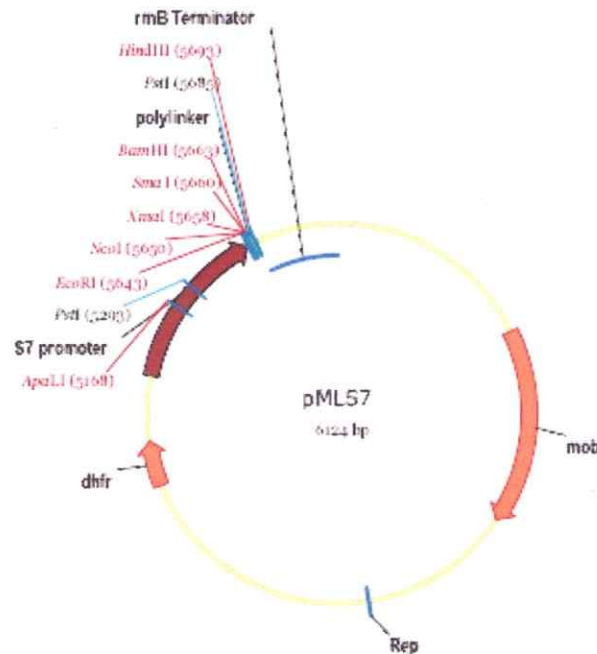


FIGURA 4. Vector de expresión constitutiva pMLS7. *dhfr*: gen de la dihidrofolato reductasa (resistencia a trimetoprim); *rrnB*: terminador transcripcional; *S7*: promotor de proteína ribosomal de *Burkholderia* sp. cepa LB400; *mob*: gene requerido para la conjugación; *rep*: gen proteína de replicación.



*pS7PPX1*: derivado del pMLS7 con la inserción del gen *PPX1* (gen que codifica para la proteína *scPPX1* fusionado a una cola de 6 histidinas) entre los sitios *EcoRI* y *BamHI* (7.322 pb). Este plasmidio confiere a los transformantes el fenotipo deficiente en los niveles de poliPs (poliP(-), Figura 5) [Chávez y col., 2009].

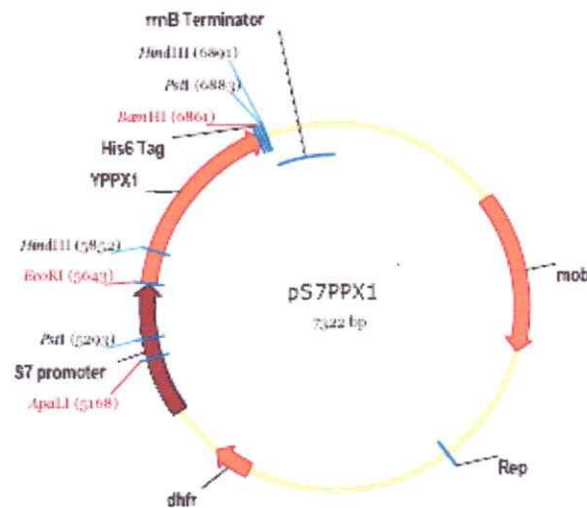


FIGURA 5. Vector de expresión constitutiva pS7PPX1. *dhf*: gen de la dihidrofolato reductasa (resistencia a trimetoprim); *rrnB*: terminador transcripcional; S7: promotor de proteína ribosómica de *Burkholderia* sp. cepa LB400; *mob*: gene requerido para la conjugación; *rep*: gen proteína de replicación. YPPX1: proteína *scPPX1* con His6Tag.

### 7.1.2 Medios de cultivo

Las cepas bacterianas se cultivaron en medio Luria-Bertani líquido y sólido (LB: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l) [Sambrook y Russell, 2001] suplementados con el antibiótico Trimetoprim 100 µg/ml (disuelto en N,N-dimetilformamida). El medio líquido se utilizó para cultivos en matraces con 25, 50 y

100 ml de medio. Para el cultivo en placas se utilizó medio líquido complementado con agar a una concentración de 1.5% p/v.

Los cultivos en matraces se prepararon a partir de inóculos 1/100 y los cultivos en placas a partir de 100 µl de una dilución  $10^{-6}$  desde precultivos de 5 ml crecidos a 37°C durante la noche. Las cepas se mantuvieron en glicerol al 40% v/v a -80°C.

*Condiciones de cultivo.* Todos los cultivos se crecieron en condiciones aeróbicas a 37°C. Para los cultivos líquidos se utilizó una agitación rotatoria de 120 rpm hasta una OD 0.7 medidos a 600nm para los cultivos de fase exponencial y 2.0 en fase estacionaria. Los cultivos en placas se incubaron a 25°C durante 72 hs.

## **7.2 Métodos de biología molecular**

### **7.2.1 Extracción de ADN plasmidial**

Se extrajo ADN plasmidial desde precultivos de ambas cepas mediante el protocolo especificado en el manual del E.Z.N.A® Plasmid miniprep kit I (Omega Bio-Tek, USA)

### **7.2.2 Cuantificación de ADN plasmidial**

El ADN obtenido fue cuantificado a partir de 1 µl de muestra, mediante el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop® ND-1000.

### **7.2.3 Digestión de ADN plasmidial**

Se realizó una digestión doble con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* durante 1 h a 37°C. Las concentraciones de reactivos utilizadas se realizaron según lo indicado por el fabricante (NEB®, USA).

## **7.3 Métodos de proteómica**

### **7.3.1 Preparación del extracto total de proteínas**

a) Cultivos líquidos: los cultivos crecidos en matraces se centrifugaron durante 15 mins a 7.000 x g a 25°C y se descartó el sobrenadante.

b) Cultivos en placa: se colectaron aproximadamente 200 mg de células desde las colonias con un asa metálica estéril.

Ambos tipos de muestras siguieron el protocolo descrito a continuación:

Los sedimentados de las células obtenidos se lavaron con 1 ml de tampón de sonicación (Tris 40 mM pH 8,15) en tubos de 1,5 ml un total de cuatro veces con centrifugaciones de 2 mins a 15.000 x g a 25°C entre los lavados. Posteriormente, se resuspendió el sedimentado celular en el mismo tampón en proporción 10 µl por mg de masa húmeda de células obtenidas. A 1 ml de la muestra se le adicionó lisozima a 0,1 mg/ml y se incubó por 20 mins a temperatura ambiente, luego se le adicionó RNAasa a 50 µg/ml y PMSF 1 mM. La lisis celular se completó mediante sonicación en hielo: 7 ciclos de 20 segundos con intervalos de detención de 1 min aproximadamente. Se le agregó ADNasa 50 µg/ml e incubó por 10 mins en hielo. La muestra se centrifugó durante 20 min a 15.000 x g a 4°C y el sobrenadante se concentró hasta la mitad del volumen en

columnas Microcon® YM-3 (10.000 x g, 4°C) mediante 1 volumen de tampón como eluyente. La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el reactivo Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad, USA) y mediante BSA como estándar de calibración. Posteriormente, se procedió a precipitar 500 µg de proteínas mediante el sistema Ready-Prep 2D Cleanup Bio-Rad® (Bio-Rad, USA) las cuales se resuspendieron en 250 µl de tampón de isoelectroenfoque (tampón IEF: 7 M Urea, 2 M Tiourea, 4% CHAPS, 0,0002% azul de bromofenol) que se completó con agua nanopura hasta un volumen final de 300 µl. Posteriormente, se adicionó DTT a una concentración 100 mM y los anfolitos (Bio-Rad, USA) respectivos (rangos 5-8 y 4,7-5,9) al 0,2%; la muestra se incubó durante 1 h a 25°C y se procedió según se detalla en la sección electroforesis bidimensional (7.3.3).

### **7.3.2 Preparación de las muestras de proteínas extracelulares**

A partir de los cultivos líquidos se obtuvo el sobrenadante por centrifugación durante 15 mins a 7.000 x g a 25°C, el cual se filtró con filtros Millipore de 0,22 µm (Millex-GV Filter, 0,22 µm, PVDF); se le agregó ácido tricloroacético hasta concentración 15% y se mantuvo a 4°C toda la noche. La muestra se centrifugó durante 50 min a 10.000 x g a 4°C, se descartó el sobrenadante y el sedimentado se lavó tres veces con 5 ml de acetona fría y dos veces con etanol frío al 100% (centrifugaciones de 20 min a 16.000 x g a 4°C entre los lavados). Posteriormente, las muestras se trataron con cloroformo/metanol como se detalla a continuación: se agregaron 400 µl de metanol y se resuspendió con micropipeta; se adicionaron 100 µl de cloroformo y se agitó en vórtex hasta homogeneizar completamente; se agregaron 300 µl de agua nanopura y se agitó. La

mezcla se centrifugó por 2 mins a 15.000 x g. La fase acuosa superior se removió, se agregaron 400 µl de metanol y luego se resuspendió el sedimentado. Se centrifugó por 2 mins a 15.000 x g, se removió el sobrenadante y finalmente las muestras se secaron a temperatura ambiente.

A la muestra seca se le agregaron 250 µl de tampón de IEF más 50 µl de agua nanopura, se le adicionaron DTT a una concentración de 100 mM y anfolitos de rango 3-10 al 0,2%; la muestra se incubó durante 1 h a 25° C y se procedió según se detalla en la sección electroforesis bidimensional (7.3.3).

### **7.3.3 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)**

-Primera dimensión (IEF): la muestra preparada se añadió a lo largo del canal de la cubeta de focalización del equipo PROTEAN® IEF (Bio-Rad, USA) poniendo una tira de 17 cm de largo con gradientes de pH 4,7-5,9 / 5-8 / 3-10NL (ReadyStrip™ IPG, Bio-Rad, USA) durante 1 h a 20°C, luego se le adicionaron 2,5 ml de aceite mineral y se programó el paso de rehidratación activa durante 12 h a 50 V a 20°C seguido del programa de focalización 15 mins a 250 V; 2 hs a 2.000 V; 4 hs a 8.000 V y 11 hs a 10.000 V, hasta completar un total de 121.000 Vh a 20°C.

-Segunda dimensión (SDS-PAGE): la tira con la muestra ya focalizada se introdujo en 6 ml de tampón de equilibrio + DTT 2% por 10 mins a temperatura ambiente con agitación de 100 rpm, luego en 6 ml de tampón de equilibrio + yodoacetamida 2,5% durante 10 mins a temperatura ambiente con agitación de 100 rpm (tampón de equilibrio: Urea 6 M; SDS 2%; Tris/Cl 0.05 M pH 8,8; glicerol 20%).

Luego, la tira se colocó en un gel de poliacrilamida al 12,5% montado en el sistema Protean® II y sometido a 50 V durante 23 hs a temperatura ambiente.

#### **7.3.4 Tinción de los geles de poliacrilamida**

a) Tinción con azul de Coomassie: la fijación se realizó durante 1 h en 150 ml de la solución de fijación (50% etanol; 2% ácido fosfórico), la tinción se realizó durante 3 hs en 150 ml de la solución “blue silver” (CBB G-250 0.12%; ácido fosfórico 10%; sulfato de amonio 10% y metanol 20%); y se destiñó con tres lavados con 150 ml de una solución de metanol/agua al 15% y tres lavados con agua.

b) Tinción argéntica: la fijación se realizó durante 20 mins en 150 ml de solución de fijación (ácido acético 5%; metanol 50%) y el gel se lavó por 10 mins en 150 ml de metanol al 5%; luego se lavó dos veces con agua bidestilada durante 15 mins cada lavado; el paso de sensibilización se realizó por un min en 150 ml de solución de ditionito 0,025% y un lavado por 1 min en agua bidestilada. La tinción se realizó por 30 mins en 150 ml de solución de tinción (nitrato de plata 0,012 M; formaldehído 3%) y un lavado de 1 min en agua bidestilada. Posteriormente, se realizó un revelado durante 5 min aproximadamente en 150 ml de solución de revelado (carbonato de sodio 6%; tiosulfato 20  $\mu$ M; 6 mM de formaldehído). El revelado se detuvo con una solución de ácido acético al 3%.

#### **7.3.5 Selección de proteínas desde los geles de poliacrilamida**

Las fotografías digitales obtenidas de los geles de poliacrilamida se analizaron computacionalmente mediante el programa Delta2D v.3.6. Debido a la alta variabilidad

del análisis comparativo de los geles de las cepas poliP(+) y poliP(-), el umbral de variación significativa para una proteína se estableció como un factor mínimo de 2,0 veces (100%,  $p < 0,05$ ) [Marengo y col., 2005] considerando el promedio de al menos dos réplicas biológicas y una réplica técnica (ver anexo 1). Las proteínas con tasas de cambio menor a 2,0 incluidas correspondieron a manchas que bajo la inspección visual su expresión diferencial resultó evidente en las réplicas. Las proteínas seleccionadas fueron escindidas desde los geles para su secuenciación por espectrometría de masas, los resultados se analizaron mediante el motor de búsqueda Mascot, sobre las bases de datos de los genomas anotados del género *Pseudomonas*, con un valor mínimo de significancia para el Mascot score de 60, equivalente a un 95% de probabilidad de que el resultado no sea un falso positivo.

#### **7.3.6\* Digestión "in-gel" de proteínas y preparación de las muestras**

Las proteínas escindidas desde los geles se depositaron en placas de 96 pocillos y procesadas automáticamente mediante el equipo Proteineer DP (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). Se utilizó el protocolo de digestión de Schevchenko [Schevchenko y col., 1996] con pequeñas variaciones. Los trozos de gel se lavaron en primer lugar con 50 mM de bicarbonato de amonio y posteriormente con acetonitrilo previo a la reducción con 10 mM de DTT en una solución 25 mM de bicarbonato de amonio y una alquilación con 55 mM de yodoacetamida en una solución de 50 mM de bicarbonato de amonio. Posteriormente se enjuagaron con 50 mM de bicarbonato de amonio y acetonitrilo, y luego secados bajo una corriente de nitrógeno. Se agregó tripsina de cerdo (Promega, Madison WI) a una concentración final de 16 ng/ $\mu$ l en una solución de

25% de acetonitrilo/50 mM bicarbonato de amonio, la digestión se realizó por 6 h a 37°C. La reacción se detuvo por adición de 0,5% de ácido trifluoroacético para la extracción de los péptidos. Los péptidos trópicos se secaron por centrifugación al vacío y resuspendidos en 4 µl de solución MALDI. Alícuotas de 0,8 µl de cada mezcla de péptidos se depositaron en placas de 386 pocillos OptiTOF™ Plate (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) y secado a temperatura ambiente. Una alícuota de 0,8 µl de la solución matriz (3 mg/ml de ácido ciano-hidróxicinámico en solución MALDI) se adicionó a la digestión seca y posteriormente se seco a temperatura ambiente.

#### **7.3.7\* Huella peptídica MALDI, análisis MS/MS y búsqueda en bases de datos**

Las muestras se analizaron automáticamente (MALDI-TOF) mediante el espectrómetro de masas ABi 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) en el modo reflector de ion positivo (voltaje de aceleración 25 kV para MS y 1 kV for MS/MS) y el espectro se analizó en el equipo ABi 4000 (Series Explorer Spot Set Manager). Los espectros de huella peptídica y de los fragmentos iónicos MS/MS fueron corregidos mediante el ABi 4000 Series Explorer Software v3.6.

Cada espectro de huella peptídica se calibró con las señales de masa de iones de autólisis de tripsina para dar una precisión de medición de masa típica de < 25 ppm. Conocidas tanto las señales de masa de la tripsina y la queratina como la del sodio y el potasio, estas fueron removidas de la lista de los picos. Para suministrar los datos combinados de la huella peptídica y MS/MS al programa MASCOT v.2.1 (Matrix Science, Londres,



UK) se utilizó el programa GPS Explorer v4.9, búsqueda realizada en la base de datos de proteínas no redundante NCBI protein database.

### **7.3.8\* Análisis LC-ESI MS/MS**

En algunos casos, las muestras fueron analizadas por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas electrospray de trampa iónica (LC ESI-MSMS) Ultimate 3000 nano LC (Dionex, Amsterdam, Holanda) y una columna de fase reversa de 75 mm I.D, 100 mm a un flujo de 300 nl/min, acoplado al espectrómetro de masas de trampa iónica Bruker HCT Ultra (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) en modo de exclusión dinámica.

### **7.3.9\* Búsqueda en bases de datos**

Para la identificación de las proteínas, los espectros de LC-ESI MS/MS se traspasaron a la interfase BioTools 2.0 (Bruker Daltonics) para ser consultados en la base de datos NCBI<sup>nr</sup> mediante el motor de búsqueda MASCOT v.2.2.04 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com) Matrix Science, Londres, UK). Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: carbamidometil cisteína como resultado de la modificación por el tratamiento con yodoacetamida, metioninas oxidadas como modificación variable, tolerancia de masa peptídica de 0,5 Da para la masa parental y los fragmentos, y 1 para los sitios de corte perdidos. En todas las identificaciones de proteínas, los valores para el algoritmo de probabilidad MOWSE fueron más grandes que el mínimo establecido como significativo con un valor  $p < 0,05$ . \* Análisis realizados en colaboración con el Servicio de Proteómica del Centro

Nacional de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Madrid, España.

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Verificación fenotípica de las cepas

Con el objetivo de verificar los fenotipos de las cepas de *Pseudomonas sp.* B4 portadoras de los plasmidios *pMLS7* y *pS7PPXI*, se realizaron análisis de restricción del ADN plasmidial, inspección visual de la morfología de las colonias en placas de LB-agar y observación de la motilidad celular mediante microscopía óptica.

La digestión con enzimas de restricción se muestra en la Figura 6. El plasmidio *pS7PPXI* digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI presenta un banda de 1218 pb correspondiente al gen *PPXI* y otra correspondiente al resto del plasmidio de 6104 pb. La cepa control poliP(+) con el vector pero sin el inserto, sólo presenta el plasmidio digerido de 6124 pb.

El análisis visual muestra que cada cepa posee un fenotipo distinto. La cepa poliP(+) presentó colonias de 0,5-1,5 cm de diámetro aproximado, de textura rugosa e irregular producto de la alta motilidad similar a la cepa silvestre. Por otro lado, las cepas poliP(-) presentaron colonias pequeñas, de 0,2 cm de diámetro, circulares, lisas y de baja motilidad. Estas características concuerdan con el fenotipo esperado según Chávez y col., 2009 para cada cepa, lo cual permite continuar con el trabajo proteómico planteado.

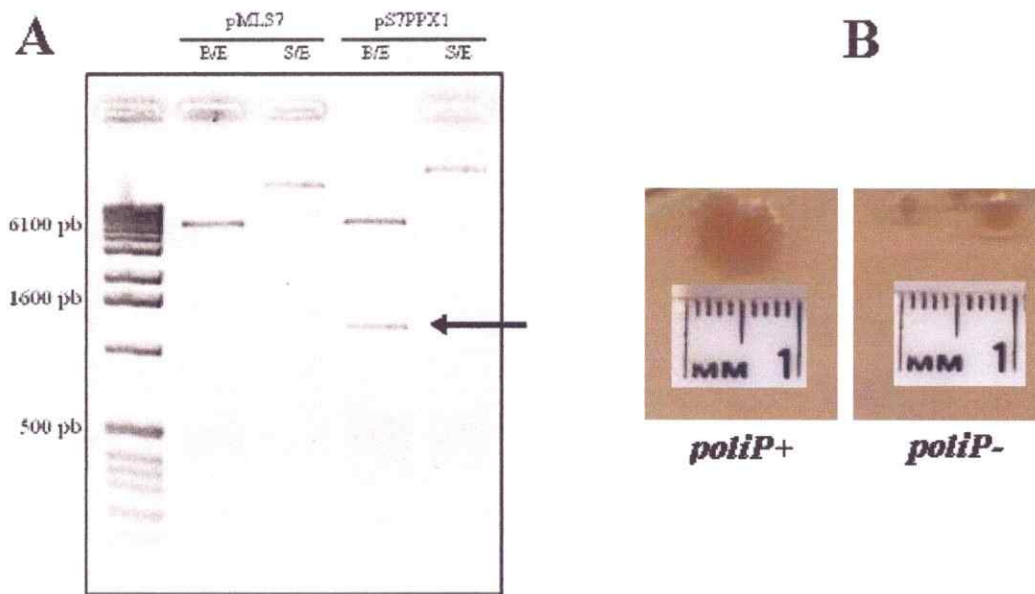


FIGURA 6. A.- Análisis de restricción de los plasmidios *pMLS7* y *pS7PPX1* de *Pseudomonas sp.* B4 con enzimas *Bam*HI y *Eco*RI (B/E) y control sin enzima (S/E). La flecha indica presencia el inserto de 1218 pb correspondiente al gen *ppx1r* en el plasmidio *pS7PPX1*. B.- Análisis visual de las colonias en placas de LB-agar. La cepa poliP(+) presenta colonias grandes sin bordes definidos producto de la motilidad de la bacteria. La cepa poliP(-) presenta colonias pequeñas bien delimitadas.

## 8.2 Condiciones óptimas para la preparación de la muestra para 2D-PAGE

La técnica 2D-PAGE es un método visual simple y rápido para el mapeo de diferencias en el patrón de expresión de las proteínas. No obstante la simpleza y el bajo costo del desarrollo de la técnica, existen ciertas limitaciones al uso universal de esta tecnología, tales como la baja sensibilidad y linealidad del enfoque, la reproducibilidad de los ensayos y baja solubilidad de las proteínas de membrana. Estos inconvenientes, en general pueden soslayarse cuando las muestras de proteínas cumplen con ciertos parámetros que permiten un buen enfoque y una buena sensibilidad; parámetros que son

exclusivos para cada tipo de muestra. Esto último obliga a ajustar las condiciones de preparación de la muestra para cada caso.

Con el objetivo de obtener geles en dos dimensiones de una calidad óptima y reproducibles para realizar el análisis proteómico, se definieron como pasos críticos del protocolo la ruptura celular y la remoción de los contaminantes (componentes no proteicos) desde el extracto.

Se evaluaron dos métodos de ruptura celular: mediante prensa French y por disrupción ultrasónica. Al aplicar ambos métodos no se evidenciaron cambios importantes en la calidad del gel obtenido (datos no mostrados). El método seleccionado fue la disrupción ultrasónica dada la facilidad de manipulación con respecto al uso de la prensa French.

La eliminación de los contaminantes se realizó mediante la concentración y el lavado del extracto de proteínas mediante ultrafiltración con membranas YM-3 (Millipore, USA) de tamaño de exclusión de 3 kDa como se detalló en la sección materiales y métodos. Con el mismo propósito se utilizaron 2 métodos de precipitación de proteínas desde el extracto, precipitación con Cloroformo/Metanol y mediante el sistema Ready-Prep 2D Cleanup® (Bio-Rad, USA), siendo este último el sistema elegido dados los resultados más satisfactorios.

En la tabla siguiente se resumen detallan de manera cualitativa los resultados obtenidos.

**Tabla 1. Condiciones óptimas para la preparación de los extractos de proteínas.**

Combinación de Metodologías	Calidad del gel
YM-3 / Precipitación / Ultrasonido	+++
YM-3 / Precipitación / Prensa French	+++
YM-3 / Ultrasonido	++
YM-3 / Prensa French	++
Precipitación / Ultrasonido	+
Precipitación / Prensa French	+
Sin Precipitación / Prensa French o Ultrasonido	-

A la izquierda, la combinación de los métodos de eliminación de los contaminantes y de la ruptura celular. La columna de la derecha indica calidad del gel obtenido en el cual +++ es un gel muy bueno y - uno muy malo. La calidad mínima de un gel para poder ser utilizado en el análisis es ++.

En resumen, para lograr una alta reproducibilidad y sensibilidad de la técnica, el uso de las membranas de ultrafiltración YM-3 es vital en la obtención de geles de poliacrilamida en dos dimensiones de buena calidad, complementado con un sistema de precipitación apropiado, en este caso el sistema comercial Ready-Prep 2D Cleanup®.

### **8.3 Proteómica Diferencial mediante 2D-PAGE**

Una vez determinadas las condiciones óptimas de trabajo, se realizó un análisis diferencial del subproteoma extracelular y del proteoma total entre la cepa poliP(-) y la control poliP(+) mediante 2D-PAGE. Ejemplos de los geles obtenidos en este trabajo se muestran en las figuras 7 y 8.

Se analizaron muestras preparadas a partir de cultivos líquidos y en placas de agar, en fase exponencial (sólo los cultivos líquidos) y estacionaria de crecimiento. El subproteoma extracelular se obtuvo sólo a partir de cultivos líquidos. En total, se encontraron 81 proteínas de interés diferencialmente expresadas en las cepas poliP(+) y poliP(-) de *Pseudomonas sp.* B4, las cuales se analizaron por espectrometría de masas para su identificación.

Debido a que el genoma del microorganismo no se encuentra secuenciado y a la presencia de más de una proteína dentro de una misma mancha (por punto isoeléctrico y masa molecular similares), el empleo de la huella peptídica no fue eficiente como método de identificación. Ante esta situación, la aproximación experimental utilizada fue LC-ESI-MS/MS, como se indicó en los materiales y métodos. Los resultados de la espectrometría se analizaron mediante el motor de búsqueda Mascot, sobre las bases de datos de los genomas anotados del género *Pseudomonas*.

De las 81 proteínas analizadas por espectrometría se seleccionaron aquellos resultados con la puntuación (Mascot score) más alta y con mayor porcentaje de cobertura. Por otro lado, se verificó que los puntos isoeléctricos y las masas moleculares teóricas se correspondieran con los experimentales obtenidos en la migración en los geles bidimensionales. Las proteínas seleccionadas desde cultivos en placa se tomaron desde tres experimentos independientes y las de cultivos líquidos desde dos, además se realizaron réplicas técnicas de las muestras (ver anexo 1). Con todas estas consideraciones, 33 proteínas (Figuras 9 y 10) fueron seleccionadas y agrupadas según las categorías Gene Ontology para procesos biológicos y funciones moleculares. En las tablas 2 y 3 se detallan cada una de las proteínas según nombre, código de acceso NCBI,

masa molecular (teórica y experimental), punto isoeléctrico (teórico y experimental), especie y puntuación.

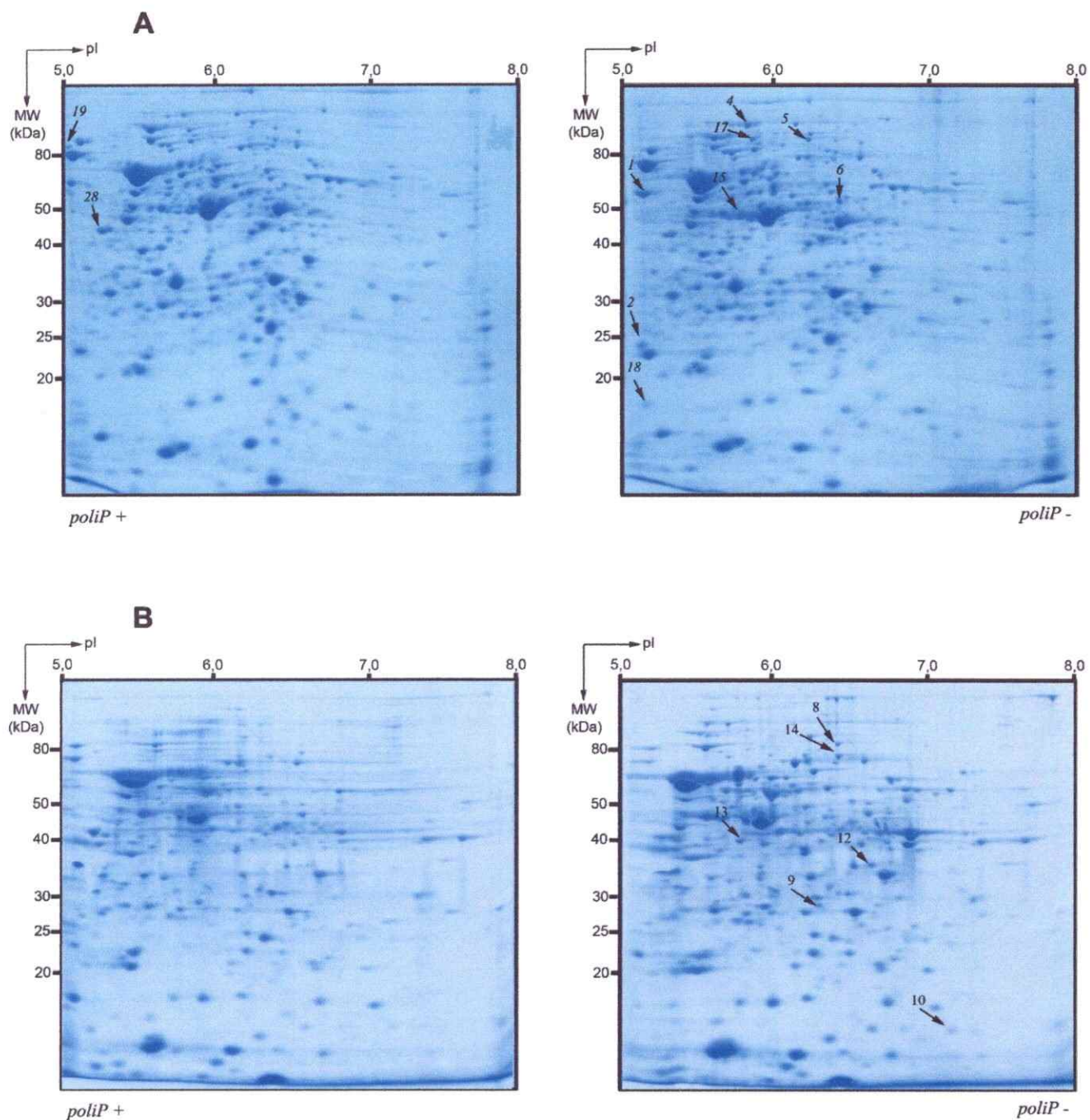


FIGURA 7. 2D-PAGE al 12,5% rango de pI 5-8 de extractos totales de proteínas de *Pseudomonas sp. B4* poliP(+) y poliP(-) crecidas medio LB líquido hasta fase exponencial (A) y estacionaria (B). Los números indican las proteínas diferencialmente expresadas que fueron seleccionadas y secuenciadas mediante MS. Detalle en tablas 2, 3 y figuras 9, 10.



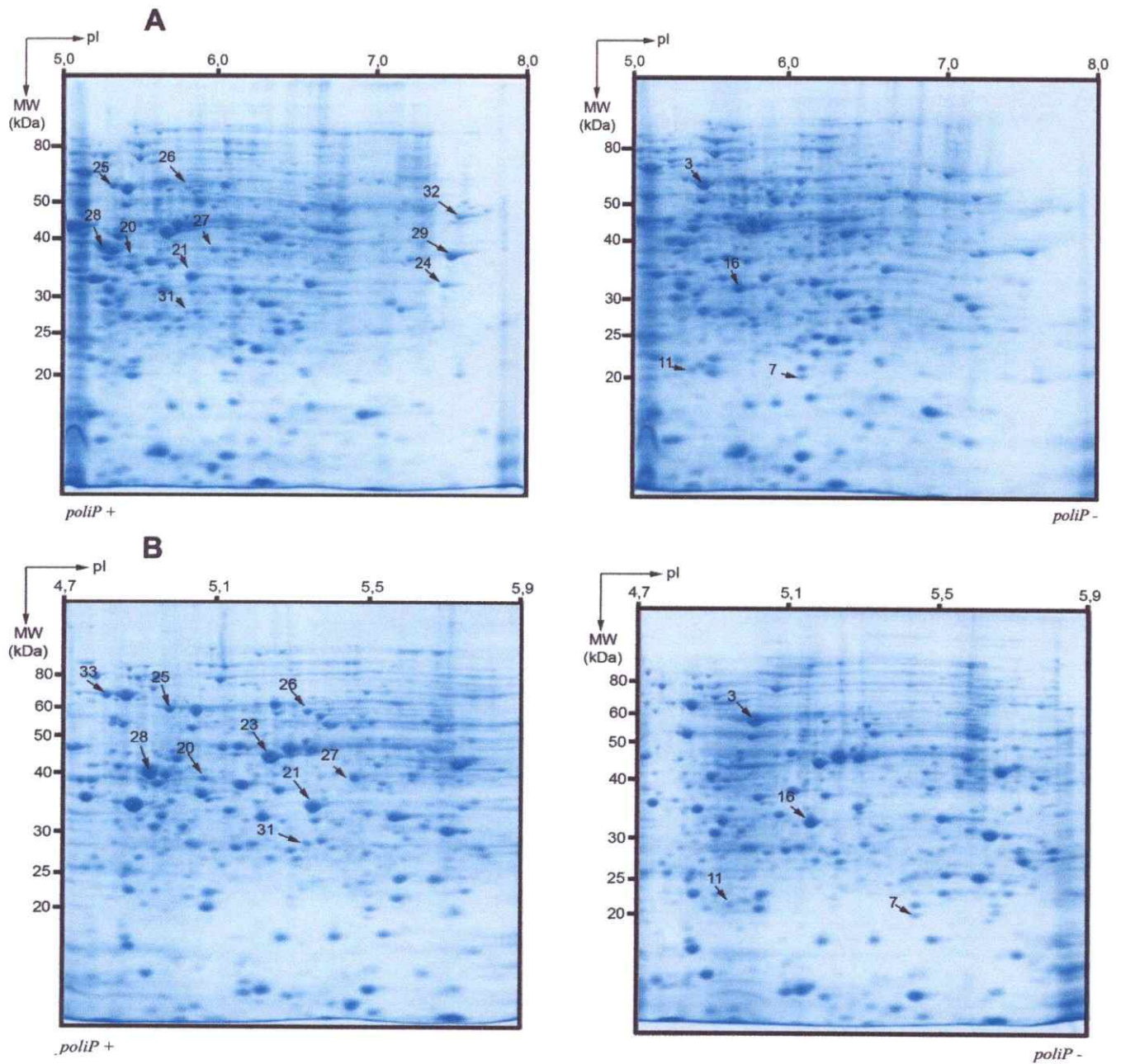


FIGURA 8. 2D-PAGE al 12,5% rango de pI 5-8 (A) y 4,7-5,9 (B) de extractos totales de proteínas de cepas de *Pseudomonas sp.* B4 poliP(+) y poliP(-) crecidas medio LB-agar hasta fase estacionaria. Ejemplo de réplica técnica. Los números indican las proteínas diferencialmente expresadas que fueron seleccionadas y secuenciadas mediante MS. Detalle en tablas 2, 3 y figuras 9, 10.

*Proteínas con niveles aumentados en la cepa de Pseudomonas sp. B4 deficiente de polifosfatos*

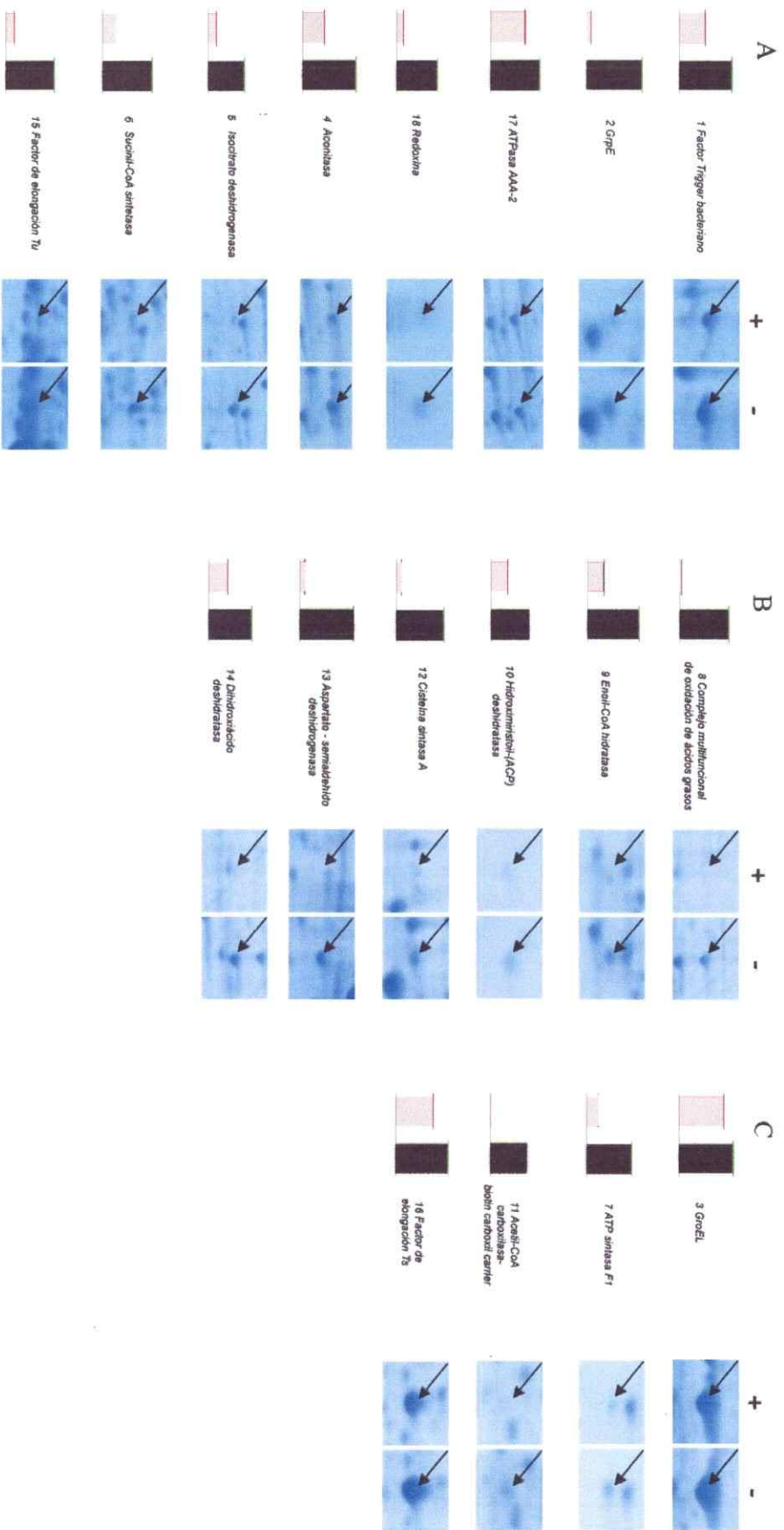


FIGURA 9. Proteínas con niveles aumentados en la cepa de *Pseudomonas sp. B4* deficiente de polifosfatos (poliP-)A.- Cultivo en medio LB líquido, fase exponencial. B.- Cultivo en medio LB líquido, fase estacionaria. C.- Cultivo en placa LB-agar, fase estacionaria. Las barras indican cuantificación digital de la intensidad de la proteína en la fotografía adjunta. Barra gris y (+) corresponden a cepa poliP+; Barra negra y (-) corresponden a cepa poliP-. Tinción CBB G-250. Anexo 1 muestra gráficos de los promedios y SD de las réplicas analizadas.

**Tabla 2**

**Proteínas con niveles aumentados en la cepa de *Pseudomonas sp.B4* deficiente de polifosfatos**

GO: Terminología Gene Ontology; Fases de crecimiento (e: exponencial; st: estacionaria); Medio cultivo LB (l: líquido; s: sólido)

GO (descripción)	Spot	Nombre	Nº Acceso NCBI	Teor. MW (kDa) / PI	Exp. MW (kDa) / PI	Especie / Cobertura Secuencia	Mascot Score
<b>Proceso Biológico</b>							
Transporte de proteínas (chaperona)	1 e, l	Factor Trigger bacteriano	gi: 145575278	48,3 / 4,78	55 / 5,1	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 44%	1359
Plegamiento de proteínas (chaperona)	2 e, l	Factor de intercambio de nucleótido GrpE	gi: 60548562	20,4 / 4,9	24 / 5,1	<i>Pseudomonas putida</i> / 29%	267
Plegamiento de proteínas (chaperona)	3 st, s	Chaperona GroEL	gi: 146308703	58,6 / 5,02	55 / 5,2	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 35%	674
Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos (metabolismo energético)	4 e, l	Aconitasa	gi: 145575602	94,2 / 5,24	95 / 5,8	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 32%	1715
Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos (metabolismo energético)	5 e, l	Isocitrato deshidrogenasa, NADP-dependiente	gi: 146307420	82,1 / 5,63	90 / 6,3	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 24%	1130
Ciclo de Ácidos Tricarboxílicos (metabolismo energético)	6 e, l	Succinil-CoA sintetasa subunidad beta	gi: 146307523	41,6 / 5,5	49 / 6,5	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 34%	654
Síntesis de ATP acoplada al transporte de protones	7 st, s	ATP sintasa F1, subunidad delta	gi: 146308623	19 / 5,87	20 / 5,6	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 40%	310
Catabolismo de ácidos grasos (beta oxidación)	8 st, l	Complejo multifuncional de oxidación de ácidos grasos subunidad alfa	gi: 146306611	77,5 / 5,58	70 / 6,5	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 51%	159
Catabolismo de ácidos grasos (beta oxidación)	9 st, l	Enoil-CoA hidratasa	gi: 146307097	29,8 / 5,67	27 / 6,3	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 54%	61

**Tabla 2. Continuación**

**Proteínas con niveles aumentados en la cepa de *Pseudomonas sp.B4* deficiente de polifosfatos**

GO: Terminología Gene Ontology; Fases de crecimiento ( e:exponencial; st: estacionaria); Medio cultivo LB (l: líquido; s: sólido)

GO (descripción)	Spot	Nombre	N° Acceso NCBI	Teor. MW (kDa) / PI	Exp. MW(kDa) / PI	Especie / Cobertura Secuencia	Mascot Score
<b>Proceso Biológico</b>							
Biosíntesis de ácidos grasos	10 st, l	Hidroximristoíl-(ACP) deshidratasa	gi: 146306083	16,6 / 6,3	15 / 7,5	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 67%	106
Biosíntesis de ácidos grasos	11 st, s	Acetil-CoA carboxilasa- biotín carboxil carrier	gi: 26987297	16,2 / 4,95	20 / 4,8	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 / 20%	415
Biosíntesis de cisteína	12 st, l	Cisteína sintasa A	gi: 146306621	34,4 / 5,89	37 / 6,5	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 32%	451
Biosíntesis de aminoácidos	13 st, l	Aspartato - semialdehído deshidrogenasa	gi: 146307742	40,6 / 5,33	40 / 6	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 63%	128
Biosíntesis de aminoácidos ramificados	14 st, l	Dihidroxiácido deshidratasa	gi: 146309219	66,2 / 5,69	60 / 6,5	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 44%	114
Elongación Traduccional	15 e, l	Factor de elongación Tu	gi: 146306925	43,9 / 5,38	45 / 5,8	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 43%	647
Elongación Traduccional	16 st, s	Factor de elongación Ts	gi: 146306073	30,5 / 5,22	30 / 5,2	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 52%	695
<b>Función Molecular</b>							
Unión a ATP (ATPasa multifuncional)	17 e, l	ATPasa AAA-2	gi: 146306654	95 / 5,32	90 / 5,9	<i>Pseudomonas mendocina ymp</i> / 40%	2404
Actividad Oxidorreductasa ( Respuesta a estrés oxidativo)	16 e, l	Redoxina	gi: 119860085	17,6 / 5,02	17 / 5,1	<i>Pseudomonas putida</i> W619 / 24%	149

## Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de *Pseudomonas* sp. B4 deficiente de polifosfatos

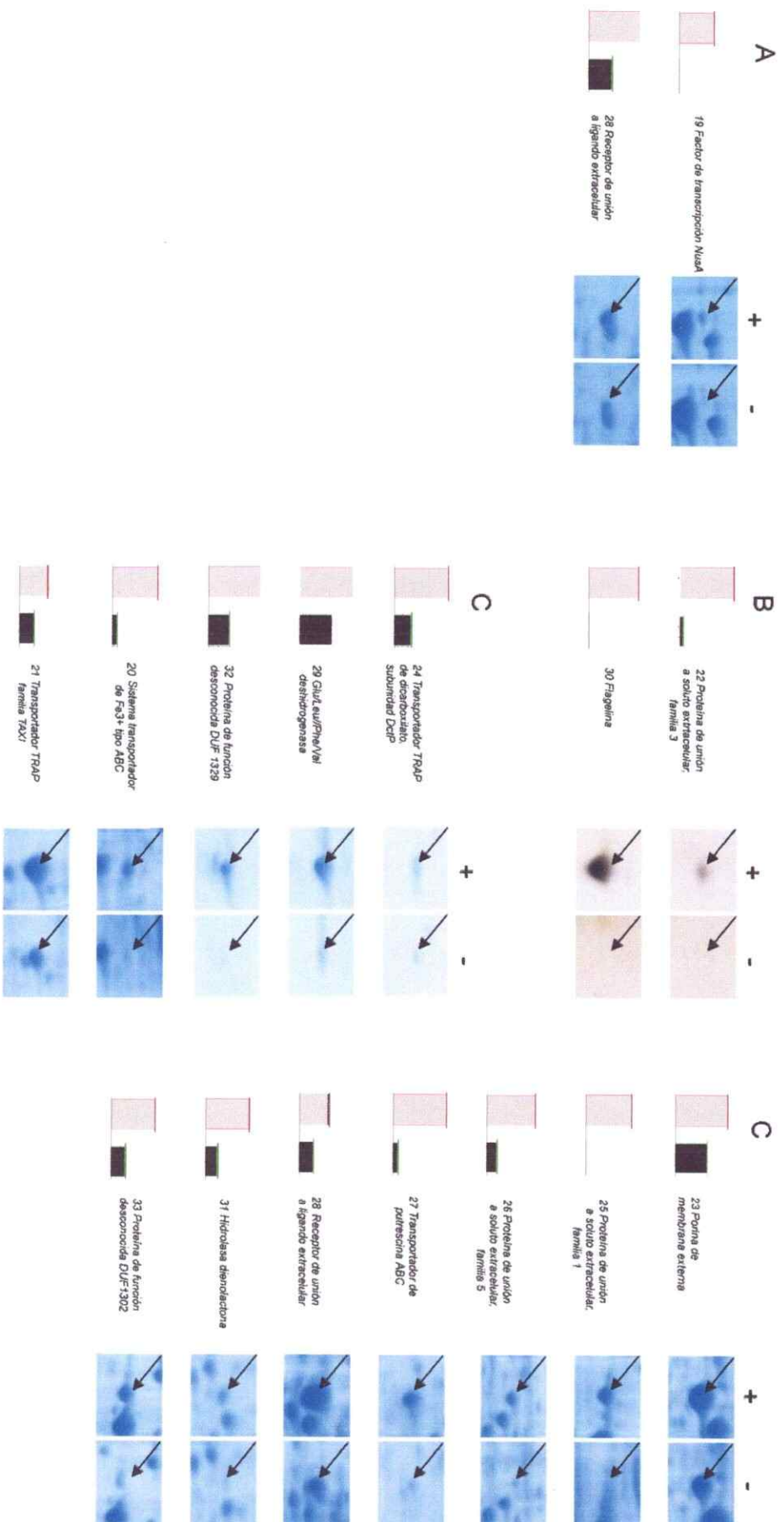


FIGURA 10. Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de *Pseudomonas* sp. B4 deficiente de polifosfatos (poliP-). A.- Cultivo en medio LB líquido, fase exponencial. B.- Cultivo en medio LB líquido, fase estacionaria (proteínas extracelulares, tinción argéntica). C.- Cultivo en placa LB-agar, fase estacionaria. Las barras indican cuantificación digital de la intensidad de la proteína en la fotografía adjunta. Barra gris y (+) corresponden a cepa poliP+.; Barra negra y (-) corresponden a cepa poliP-. Tinción CBB G-250. Anexo 1 muestra gráficos de los promedios y SD de las réplicas analizadas.

**Tabla 3**

**Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de *Pseudomonas sp.B4***  
**deficiente de polifosfatos**

GO: Terminología Gene Ontology; Fases de crecimiento ( e: exponencial; st: estacionaria); Medio cultivo LB (l: líquido; s: sólido)

GO (descripción)	Spot	Nombre	Nº Acceso NCBI	Teor. MW (kDa) / PI	Exp. MW (kDa) / PI	Especie / Cobertura Secuencia	Mascot Score
<b>Proceso Biológico</b>							
Factor de terminación de la transcripción	19 e, l	Factor de transcripción NusA	gi : 146308624	54,6 / 4,52	70 / 5,0	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 16%	508
Transporte	20 st, s	Sistema transportador de Fe <sup>3+</sup> tipo ABC	gi : 146306364	38,1 / 5,27	38 / 5,3	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 50%	627
Transporte	21 st, s	Receptor de soluto transportador TRAP, familia TAXI	gi : 146309574	33,3 / 5,74	35 / 6	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 26%	808
Transporte	22 st, l	Proteína de unión a soluto extracelular, familia 3	gi : 146309284	27,6 / 4,79	27 / 5	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 66%	545
Transporte	23 st, s	Porina de membrana interna	gi : 146309320	46,6 / 6,03	45 / 5,2	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 22%	411
Transporte	24 st, s	Transportador TRAP de dicarboxilato, subunidad DctP	gi : 146307449	37,6 / 7,04	35 / 7,5	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 30%	292
Transporte	25 st, s	Proteína de unión a soluto extracelular, familia 1	gi : 146307075	64,8 / 4,98	60 / 5	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 44%	1060
Transporte	26 st, s	Proteína de unión a soluto extracelular, familia 3	gi : 146305880	59,3 / 5,72	55 / 5,3	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 16%	354

**Tabla 3. Continuación**

**Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de *Pseudomonas sp.B4***  
**deficiente de polifosfatos**

GO: Terminología Gene Ontology; Fases de crecimiento ( e: exponencial; st: estacionaria); Medio cultivo LB (l: líquido; s: sólido)

GO (descripción)	Spot	Nombre	Nº Acceso NCBI	Teor. MW (kDa) / PI	Exp. MW (kDa) / PI	Especie / Cobertura Secuencia	Mascot Score
<b>Proceso Biológico</b>							
Transporte	27 st, s	Transportador de putrescina ABC	gi : 78730568	42,1 / 6,67	40 / 5,4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5 / 14%	122
Transporte	28 e/l, st/s	Receptor de unión a ligando extracelular	gi : 146306419	39,4 / 5,12	40 / 5,3	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 20%	565
Metabolismo de aminoácidos (desaminación)	29 st, s	Glu/Leu/Phe/Val deshidrogenasa	gi : 146307897	37,1 / 5,85	40 / 7,5	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 21%	366
Motilidad flagelar	30 st, l	Flagelina	gi : 146307857	49,9 / 5,04	50 / 5	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 6%	280
<b>Función Molecular</b>							
Actividad hidrolasa	31 st, s	Hidrolasa dienolactona	gi : 146307513	27,8 / 5,45	30 / 5,3	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 24%	411
Sin Función conocida	32 st, s	Proteína de función desconocida DUF1329	gi : 146308674	51,4 / 8,3	50 / 8	<i>Pseudomonas mendocina</i> ymp / 50%	1200
Sin Función conocida	33 st, s	Proteína de función desconocida DUF1302	gi : 77457132	64,1 / 5,15	65 / 4,9	<i>Pseudomonas fluorescens</i> PfO-1 / 13%	340

## **9 DISCUSIÓN**

### **9.1 Determinación de las condiciones óptimas de preparación de las muestras de proteínas**

En la preparación de las muestras de las proteínas para el análisis con la técnica 2D-PAGE, el ultrafiltrado y el lavado de la muestra mediante las membranas de ultrafiltración YM-3 permiten la eliminación de las sales, aminoácidos, nucleótidos y azúcares menores que 3 kDa de masa molecular. Todos estos componentes impiden la migración correcta de las proteínas a lo largo del gel de isoelectroenfoque, ya sea por la obstrucción del paso de las proteínas (las partículas sin carga) o por aumento de la corriente durante la corrida de la muestra (partículas cargadas). Esta etapa es crítica en el enfoque correcto de las proteínas en la primera dimensión, mientras que la precipitación de las proteínas no asegura una limpieza óptima de la muestra ya que junto con ellas también precipitan los azúcares y otras impurezas. Es por esto que la precipitación de las proteínas sólo se utilizó para eliminar el exceso de sales en una etapa posterior a la de ultrafiltración. Las proteínas que se pierden en el filtrado no constituyen una limitante de la técnica, puesto que la concentración de poliacrilamida utilizada en la segunda dimensión no permite discriminar proteínas menores de 3 kDa. Además, la cuantificación de las proteínas presentes en el filtrado revela que la pérdida de proteínas es despreciable (datos no mostrados).



## **9.2 Proteómica diferencial en *Pseudomonas sp.* B4 deficiente de poliP**

Como se resume en las tablas 2 y 3, en la cepa poliP(-) se encontraron 18 proteínas con niveles aumentados y un total de 15 disminuidas en diferentes condiciones de cultivo y estadios de crecimiento. Los procesos celulares aumentados representados corresponden al estrés celular (chaperonas moleculares), el metabolismo energético (ciclo de Krebs y beta oxidación), la biosíntesis de los aminoácidos y ácidos grasos y la traducción. Por otra parte, los factores disminuidos están principalmente asociados al transporte, la motilidad y la transcripción.

Estos resultados confirman el papel de los poliPs como una molécula relevante como reserva de ATP y de respuesta al estrés celular. Por un lado, se evidencia el déficit energético provocado por la disminución del polímero en el incremento de los factores que compensan esa carencia; por otro, su efecto en la expresión de factores involucrados en procesos vitales como el plegamiento de las proteínas. Coherentemente con lo anterior, se produce una respuesta compensatoria al déficit energético mediante la disminución de procesos que consumen energía.

### **9.2.1 Proteínas con niveles aumentados en la cepa de *Pseudomonas sp.* B4 deficiente de polifosfatos (poliP(-))**

#### **9.2.1.1 Metabolismo energético/Ciclo de Krebs**

En los cultivos líquidos con bajos niveles de poliPs, durante la fase exponencial se encontraron sobreexpresadas dos proteínas pertenecientes al ciclo de Krebs: la aconitasa y la succinil-CoA sintetasa. La primera cataliza la transformación reversible del citrato en isocitrato, mientras que la succinil-CoA sintetasa permite la

formación de succinato y GTP (Figura 11) [Lehninger y col., 1995]. Además, en los cultivos en placa, aumentaron los niveles de la ATP sintasa F1, la cual sintetiza ATP acoplada con un gradiente de protones electroquímico formado durante la cadena respiratoria [Nakanishi-Matsui y col., 2007].

Las enzimas identificadas, indicarían una respuesta de aumento de la producción de la energía vía síntesis de ATP, GTP y NADH, este último compuesto finalmente provee de ATP mediante la fosforilación oxidativa. El aumento del flujo en el ciclo de Krebs podría ser una respuesta compensatoria a la disminución de los poliPs [Krömer y col., 2008] ante la falta de éste como generador de ATP y GTP mediante la acción de las proteínas *PPK1* y *PPK2*, respectivamente.

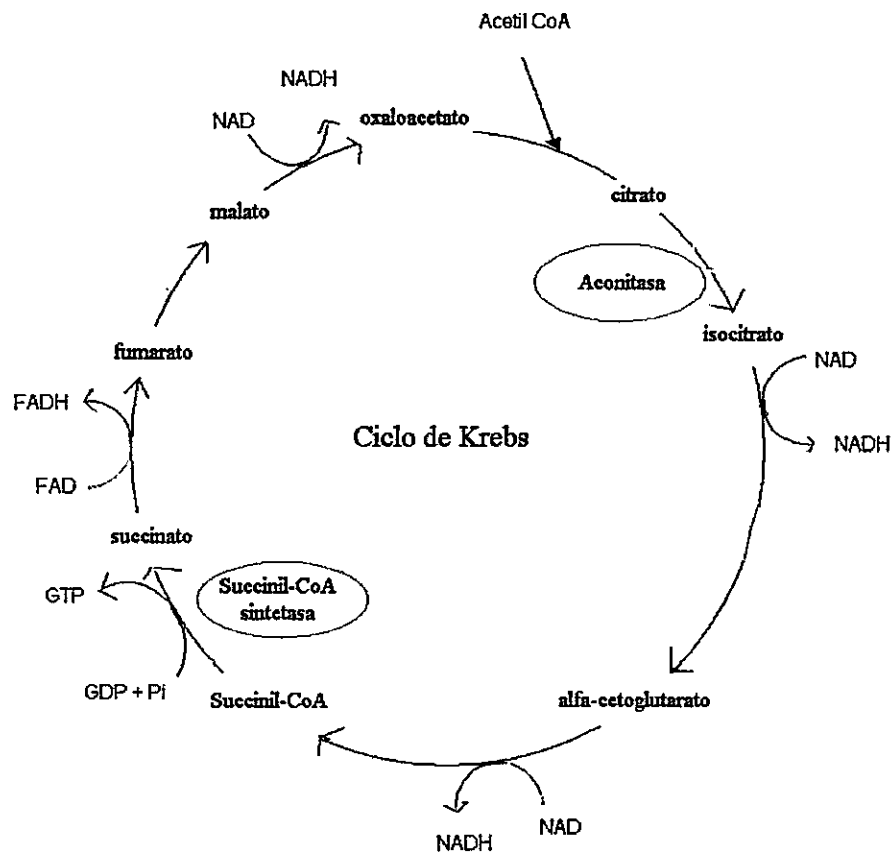


FIGURA 11. Enzimas del ciclo de Krebs sobreexpresadas en cepa poliP(-) durante la fase exponencial (elipses).

### 9.2.1.2 Metabolismo de los ácidos grasos

Durante la fase estacionaria, los cultivos planctónicos deficientes de poliP presentaron niveles aumentados de dos proteínas del complejo multifuncional de oxidación de los ácidos grasos. Estas proteínas, participan en la vía de oxidación de éstos para la generación de los acetil-CoA que ingresan al ciclo de Krebs. Estas son, la enoil-CoA hidratasa y la 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Dichas enzimas participan en reacciones sucesivas, la primera de las cuales ingresa una molécula de agua al doble enlace del trans-enoil-CoA para formar el 3-hidroxiacil-CoA. Mientras que la segunda produce una deshidrogenación del hidroxiacil-CoA formado en la reacción anterior [Lehninger y col., 1995]. Los sustratos de ambas enzimas se encuentran relacionados con la biosíntesis de polyhidróxialcanoatos (PHA), polímero de reserva que se sintetiza en condición de carencia de fosfatos y que cumple una función importante en la supervivencia bacteriana y durante los procesos de estrés. En este punto, se conecta directamente la vía de oxidación de ácidos grasos con la de síntesis de PHA [Aldor y Keasling, 2003]. Por su parte, la vía de síntesis de PHA se encuentra aumentada durante la fase anaeróbica en los cultivos de microorganismos acumuladores de poliP, en la cual se degradan los poliPs mientras se acumula PHA [Wilmes y col., 2008]. La incapacidad de acumular poliP podría dar paso a una acumulación de PHA como una estrategia metabólica alternativa. No obstante, la sobreexpresión de la enoil-CoA hidratasa podría ser sólo una consecuencia de la activación de la beta oxidación con el objetivo de generar especies acetil-CoA para la síntesis de ATP y NADH, como una medida compensatoria ante la escasez energética.

Por otro lado, en este mismo cultivo aumentan los niveles de la proteína hidróximiristoil-(ACP) deshidratasa (*FabZ*), que corresponde a la primera deshidratasa que participa en los ciclos de elongación durante la síntesis de ácidos grasos que forman la membrana fosfolipídica en bacterias (vía de síntesis tipo II) [Freiberg y col., 2004]. Cabe destacar que el 3-hidróximiristoil-(ACP), sustrato de esta enzima, está situado en un punto de bifurcación de una vía que también sintetiza el lípido A (factor de virulencia) por acción de la proteína *LpxA* [Jeanton y col., 2008]. Cepas mutantes de *fabZ*, que poseen una reducción de la actividad deshidratasa, se han reportado como supresores de mutaciones del gen *lpx*, hecho para el cual se ha propuesto que la acumulación de 3-hidróximiristoil-(ACP) revertiría la mutación por acción de masas [Mohan y col., 1994]. Se ha observado una alteración estructural del lipopolisacárido (LPS) en las recombinantes de *Pseudomonas sp.* B4 deficientes de poliP [Varela y col., manuscrito en preparación] y posiblemente la sobreexpresión de *FabZ* produciría una disminución en los niveles del sustrato de *LpxA*, lo que podría dar cuenta de la alteración descrita en el LPS y la atenuación de la virulencia en otros casos.

En los cultivos en medio sólido, aumentan los niveles de la acetil-CoA-carboxilasa, que cataliza el primer paso en la biosíntesis de los ácidos grasos. Esta enzima sintetiza malonil-CoA a partir de acetil-CoA. No obstante la diferencia de medios de cultivo, en fase estacionaria ambos cultivos presentaron aumentada la vía de síntesis de ácidos grasos precursores de los lípidos de membranas. Un descenso en los niveles de poliP desencadena la disminución de un gran número de transportadores de membrana, esto generaría un cambio estructural importante que podría

compensarse con una renovación de los lípidos de la membrana, lo cual explicaría el aumento de los factores que los sintetizan.

El poliP actúa como reserva energética y regula los niveles de ATP celular en combinación con la fosforilación oxidativa. Los datos obtenidos por proteómica diferencial sugieren que el poliP es un componente importante en la regulación energética y, específicamente, en la homeostasis del ATP. Cuando los niveles de poliP son bajos, la célula regula los niveles de ATP aumentando los niveles de los factores de las vías que lo generan, estas son la  $\beta$ -oxidation, el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa (Figura 12).

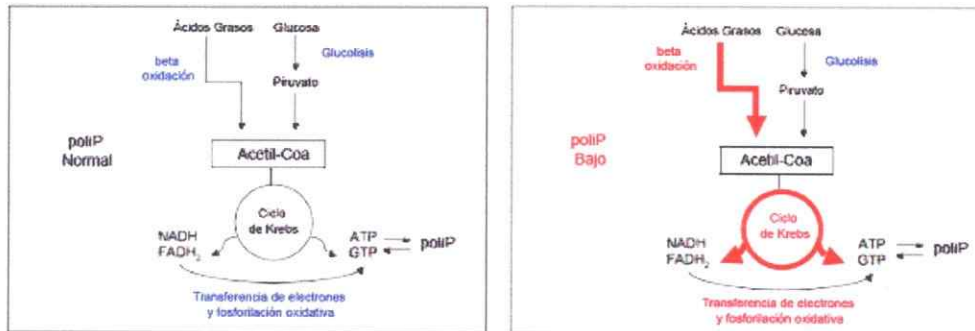


FIGURA 12. Modelo propuesto para el ajuste metabólico bacteriano ante niveles bajos de poliP. En rojo se indican las vías metabólicas aumentadas.

### 9.2.1.3 Plegamiento de las proteínas y respuesta al estrés

En la cepa con niveles deficientes de poliPs se encontraron sobreexpresadas cuatro proteínas involucradas en el plegamiento de las proteínas y la respuesta ante situaciones de estrés. Durante la fase exponencial de crecimiento y en medio líquido

las proteínas sobreexpresadas fueron el factor trigger, *GrpE* y *ClpB*; mientras que en fase estacionaria y medio sólido se sobreexpresó *GroEL*.

Todas corresponden a proteínas del tipo chaperonas, que impiden las interacciones intra e intermoleculares inapropiadas mediante la unión a regiones hidrofóbicas de las proteínas no plegadas. Esto favorece el plegamiento y el ensamble correcto entre éstas; por otro lado, impide la agregación y constituye una red funcional aparentemente jerarquizada [Deuerling y Bukau, 2004]. Muchas de las proteínas que funcionan como chaperonas moleculares fueron descritas como proteínas de estrés térmico (Hsp). No obstante, no todas corresponden a proteínas de termotolerancia, son esencialmente de respuesta a estrés (osmótico, lumínico, oxidativo), promueven el plegamiento de algunas proteínas e impiden la agregación de otras [Lee y Tsai, 2005].

Por su parte, el factor trigger es una chaperona bacteriana asociada al ribosoma, la cual inicia el plegamiento de las proteínas nacientes de manera independiente de ATP [Merz y col., 2008]; mientras que *GrpE* es una cochaperona que funciona como un intercambiador de nucleótidos que promueve el intercambio de ADP por ATP y controla el flujo de los polipéptidos no plegados hacia adentro y afuera del surco de unión al sustrato del dominio de *DnaK*, otra chaperona [Harrison, 2003]. Por otro lado, *ClpB* corresponde a una proteína de la superfamilia de las ATPasas AAA+; y a diferencia de las chaperonas convencionales rescata a las proteínas dañadas por estrés desde el estado agregado, ya que promueve el desensamble y desplegamiento de las proteínas sustrato, proceso en el que se requiere la participación del sistema *DnaK-GrpE* [Lee y Tsai, 2005]. La chaperona *GroEL* interactúa con las proteínas recién sintetizadas una vez que son liberadas desde el ribosoma y contribuye también

en el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas en directa interacción con *DnaK* [Deuerling y Bukau, 2004]. El polifosfato ha sido relacionado con las vías de señalización de la respuesta al estrés, puesto que algunos factores esenciales en la sobrevivencia de largo término en *Mycobacterium tuberculosis* durante la privación de nutrientes actúan en conjunto con la *PPK1* y el poliP en las reacciones de fosforilación [Primm y col., 2000; Sureka y col., 2007; Sureka y col., 2008].

La carencia de poliP genera un estado de estrés que la célula enfrenta con el aumento de estos factores descritos como medida protectora. Esto podría deberse a que la deficiencia de poliP celular desencadenaría la activación de las vías de señalización de respuesta al estrés dependientes del poliP [Sureka y col., 2007]; y/o a que esta condición no permitiría el plegamiento correcto de las proteínas, posiblemente por una falta de sustrato energético (ATP).

Durante la fase exponencial de crecimiento, se sobreexpresa una peroxirredoxina, enzima que reduce peróxidos ( $H_2O_2$  y ROOH) a agua o los alcoholes respectivos. Actúa como un sistema conjunto con NADH-oxidasa y utiliza NADH como donante de electrones (sistema NADH oxidasa-Prx), lo que evita el daño ante el estrés oxidativo en las bacterias. El sistema está ampliamente distribuido en las bacterias que crecen aeróbicamente en carencia de una cadena respiratoria o catalasa; y además de proteger del daño oxidativo es un sistema efectivo de regeneración de NAD con el fin de mantener el balance oxidativo y reductor [Niimura, 2007]. Además, en la cepa poliP(-) se encuentra aumentado el nivel de la proteína isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente, que sintetiza NADPH, molécula que provee un ambiente reductor esencial para la actividad celular normal. Esta enzima se encuentra aumentada en bacterias del género *Pseudomonas* sometidas a estrés oxidativo [Singh

y col.,2007]. Por otro lado, una fuente importante de estrés oxidativo corresponde al NADH, principalmente producido en las reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos [Jezek y Hlavata, 2005], vía que se encuentra aumentada como consecuencia de la disminución de los poliPs.

Tanto el sistema NADH oxidasa-Prx como la isocitrato deshidrogenasa NADP-dependiente funcionan acoplados a las reacciones del ciclo de Krebs y a la cadena respiratoria, que generan estrés oxidativo [Nishiyama y col., 2001; Seib y col., 2006]. Adicionalmente, se encuentra reportado que un desbalance en la relación NADH/NADPH promueve disfunciones celulares importantes [Singh y col., 2007].

Como ya se discutió, es posible que el déficit de poliP como sustrato energético active la producción de ATP desde el ciclo de Krebs, siendo necesaria la sobreexpresión de factores que eviten el daño producido por las especies reactivas de oxígeno generadas. Por su parte, un desbalance en la relación NADH/NADPH podría ser la responsable de las alteraciones múltiples reportadas ante la disminución de los niveles de poliPs.

#### **9.2.1.4 Biosíntesis de los aminoácidos**

Tres proteínas pertenecientes a las vías de biosíntesis de los aminoácidos aumentan sus niveles en los cultivos planctónicos durante la fase estacionaria: la cisteína sintasa A, la aspartato-semialdehído deshidrogenasa y la dihidroxiácido deshidratasa. La primera de ellas, *CysK*, cataliza la reacción del sulfuro con la o-acetilserina para dar cisteína. Además de esta función, es un regulador negativo global involucrado en el metabolismo del azufre. Mutantes de *cysK* en *Bacillus subtilis* son revertidas fenotípicamente al crecer en presencia de metionina, puesto que a partir de ella puede



sintetizar cisteína vía homocisteína [Albanesi y col., 2005] [Hullo y col., 2007]. Por otro lado, mutantes de *cysK* en *P. putida* KT2440 no sobreviven al estrés por frío [Reva y col., 2006].

La segunda proteína, oxida el aspartil-fosfato a aspartato semialdehído, componente de la vía común de síntesis de lisina, treonina, glicina y metionina a partir del aspartato. Dicha vía, además sintetiza el ácido diaminopimélico, componente integral de la pared celular bacteriana y se ha demostrado que las cepas mutantes para el gen que la codifica son letales [Fondi y col., 2007] [Blanco y col., 2003].

La última de estas tres proteínas, es codificada por el gen *ilvD* y se encuentra involucrada en la vía de síntesis de isoleucina, valina y leucina. En *B. subtilis* esta vía se encuentra regulada por el operón *ilv-leu* según la disponibilidad de leucina. Éste disminuye su expresión ante la presencia de casaminoácidos y es regulado por el represor *CodY*, factor activo ante altos niveles de GTP. Este regulador mantiene reprimidos varios genes de fase estacionaria temprana, alguno de los cuales se activan durante la respuesta a la escasez de nutrientes de la fase estacionaria o ante la depleción de GTP, como es el caso de *ilvD* [Mäder y col., 2003]. La escasez de poliP, sustrato de la *PPK2* para la síntesis de GTP, podría disminuir los niveles de este último puesto que la reacción se favorecería en el sentido contrario, y se sintetizaría poliP a expensas del GTP. Los bajos niveles de GTP podría semejar a un estado energético disminuido lo cual desencadenaría la desrepresión del factor transcripcional homólogo *GntR* de *Pseudomonas* [Kazakov y col., 2009]. Lo anterior podría explicar el aumento en los niveles de la dihidroxiácido deshidratasa y una posible activación de la vía de síntesis de los aminoácidos ramificados.

La mayoría de los aminoácidos son sintetizados a partir de los intermediarios provenientes de rutas involucradas en el metabolismo energético como la glucólisis y el ciclo de Krebs [Lehninger y col., 1995]. En total, durante la fase estacionaria y ante niveles deficientes de poliP se encontraron aumentados factores involucrados en las rutas de biosíntesis que involucran a ocho aminoácidos en las diferentes condiciones de cultivo. Como ya vimos, algunas enzimas del ciclo del ácido cítrico se encuentran sobreexpresadas posiblemente como una estrategia de compensación ante la reducción del nivel de poliP, lo cual podría disminuir los sustratos necesarios para la síntesis de aminoácidos; por otro lado, la gran disminución de los transportadores de membrana ante los bajos niveles de poliP impediría el ingreso de nutrientes y/o precursores de aminoácidos, lo cual derivaría en una situación de privación metabólica que activaría los factores ya mencionados.

#### **9.2.1.5 Factores traduccionales**

En las cepas poliP(-) se encontraron aumentados factores de elongación de la traducción, durante la fase exponencial el factor de elongación Tu (EF-Tu) y en la fase estacionaria el factor de elongación Ts (EF-Ts). El EF-Tu es una proteína de unión a GTP y a aminoacil-tRNA en un complejo ternario que se une al sitio A del ribosoma durante la traducción de las proteínas [Mukhopadhyay y col.,1997]. El EF-Ts realiza el intercambio de nucleótidos mediante la unión al complejo GDP-EF-Tu para dar GTP-EF-Tu [Dahl y col., 2006]. El aumento de estos factores de elongación ha sido descrito como un mecanismo de defensa ante situaciones de estrés en condiciones ácidas en *E. coli* y a la presencia de cobalto en *P. fluorescens*. Además, se han descrito una función en el plegamiento de las proteínas para EF-Tu (de

manera similar a las chaperonas) y de resistencia a la agregación ante estrés para el EF-Ts [Sharma y col., 2006] [Han y col., 2007] [Huang y col., 2007]. Como se discutió en el caso de la sobreexpresión de las chaperonas, el déficit de poliPs mantendría un estado de estrés en donde el plegamiento de proteínas estaría alterado, las vías de señalización de respuesta al estrés dependientes del poliP activadas y se sobreexpresarían los factores involucrados en dicho proceso como una manera de revertirlo.

## **9.2.2 Proteínas con niveles disminuidos en la cepa de *Pseudomonas sp.* B4 deficiente de polifosfatos (poliP(-))**

### **9.2.2.1 Proteínas transportadoras**

El descenso en los niveles de poliPs en *Pseudomonas sp.* B4 produce una disminución de la expresión de algunas proteínas involucradas en procesos de transporte de diversas moléculas. De un total de 15 proteínas seleccionadas en esta condición, 10 se relacionaron con dicha función, independiente de la fase de crecimiento y del medio utilizado. Éstas son las responsables del transporte de diversos solutos tales como  $\text{Fe}^{3+}$ , azúcares, péptidos, poliaminas, aminoácidos por medio de transportadores tipo ABC; dicarboxilatos tales como el malato y el succinato por transportador tipo TRAP; y aminoácidos con carga positiva por el transportador *AotJ*. Por último, también se encontró disminuida la proteína de membrana externa *OprE* (porina) involucrada en unión a fibronectina y virulencia [Jaouen y col., 2006]. La *PPK1* se encuentra asociada a la membrana posiblemente con la función de abastecer de energía a los procesos de transporte activo que allí ocurren. Ante el déficit energético producto de los bajos niveles de poliPs, la disminución de la síntesis de los transportadores de membrana podría ser una estrategia de ahorro ante esta condición.

### **9.2.2.2 Motilidad**

Extractos de las proteínas extracelulares y totales de los cultivos deficientes de poliP evidencian una disminución drástica de los niveles de la proteína flagelina (*FliC*), lo cual es consistente con el hecho de que esa cepa posee una motilidad reducida; no

obstante, posee la ultraestructura flagelar intacta al microscopio electrónico, en concordancia con lo previamente descrito para mutantes de *ppk1* [Candon y col., 2007; Fraley y col., 2007; Chávez y col., 2009]. Esta situación podría deberse a modificaciones post-traduccionales distintas que ubicarían a la proteína en otra coordenada del gel bidimensional, evento que a simple vista no ocurre en un rango amplio de punto isoelectrónico (i.e., 3-10). En este aspecto se evidencia una contradicción, puesto que una ausencia de flagelina debiese provocar, en teoría, una ausencia de flagelo. Otras explicaciones podría ser que una vez sintetizada la estructura flagelar, la cepa poliP(-) dejaría de producir la flagelina como medida de ahorro y ésta no se encontraría disponible en el medio; la motilidad se vería disminuida por la falta de un abastecimiento energético y/o un posible mal plegamiento de las proteínas que componen el flagelo dada la condición de estrés. Por otro lado, el déficit de poliP podría influir en la fosforilación de proteínas claves en el funcionamiento del aparato flagelar y producir un flagelo visiblemente intacto pero inactivo.

### **9.2.2.3 Otras proteínas y proteínas de función desconocida**

Niveles bajos de los poliPs provocan una disminución de los niveles de la región de dimerización de la Glu/Leu/Phe/Val deshidrogenasa en medio sólido durante la fase estacionaria. Esta deshidrogenasa cataliza la reacción de desaminación oxidativa reversible durante la degradación de los aminoácidos. La disminución en la expresión de los transportadores ante la baja de los niveles de poliP podría impedir el ingreso de algunos sustratos al interior de la célula. El descenso en las tasas de degradación y el aumento de las vías de síntesis de los aminoácidos ya descritas

asegurarían un abastecimiento de dichos sustratos que no estarían disponibles y corresponde a la estrategia a la que recurriría la bacteria como parte de la respuesta global a la carencia de poliP.

Los cultivos en medio sólido con niveles bajos de poliP disminuyen los niveles de un factor llamado dienolactona hidrolasa, que se encuentra involucrado en el metabolismo aerobio de la degradación de los compuestos aromáticos, específicamente la vía de los clorocatecoles [Cámara y col., 2008]. Este descenso en la expresión de la proteína podría deberse a una disminución de los factores pertenecientes a las vías de degradación como estrategia de ahorro energético; también podría deberse a que el sustrato no estaría ingresando a la célula como producto de la disminución de su transportador respectivo, y no se lograría la inducción de la vía de degradación.

En sustrato sólido, la cepa poliP(+) presenta sobreexpresadas dos proteínas de función desconocida anotadas como DUF1329 y DUF1302. Mediante la herramienta psi-BLAST de la base de datos del NCBI. La primera de ellas no arrojó resultados para ninguna proteína conocida. La segunda de ellas entregó un score de 1082 (e-value 0.0) para una lipoproteína putativa de *P. fluorescens* Pf-5, de la cual no se encontró información relevante.

## 10 CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

i.- Mediante el desarrollo de este seminario de Título se determinó un protocolo exitoso de extracción de las proteínas (extractos totales y proteínas extracelulares) desde la bacteria *Pseudomonas sp.* B4 para ser analizadas por 2D-PAGE basado en la ultrafiltración y lavado de la muestra mediante membranas de 3 kDa y posterior precipitación con métodos comerciales y convencionales.

ii.- La carencia de poliPs produce la sobreexpresión de factores que indican un déficit energético a nivel celular, lo que afectaría los procesos biológicos tales como la síntesis de proteínas, la motilidad y el transporte. Ante esta condición, la bacteria sobreexpresa enzimas de las vías metabólicas que permiten mantener el suministro energético alternativo al poliP, tales como el ciclo de Krebs y la beta oxidación. En los procesos que consumen gran cantidad de energía como la motilidad y el transporte se ven disminuidas las proteínas que participan en ellos, posiblemente como una medida de ahorro de energía.

iii.- Por otro lado, dichas alteraciones podrían deberse a una falla en la fosforilación como producto del déficit de poliP, lo que desregularía la señalización celular. La disminución de los transportadores a nivel de la membrana plasmática produciría un cambio estructural evidenciado por el aumento de la síntesis de lípidos

de membrana que podría relacionarse con la pérdida de la virulencia en las cepas mutantes para la polifosfato quinasa.

iv- Estudios a futuro debiesen enfocarse en los cambios estructurales que se producen a nivel del LPS y el flagelo a partir del déficit de poliP y determinar su efecto en los procesos de virulencia en cepas patógenas del género *Pseudomonas*. Por otro lado es necesario determinar el efecto que dicha condición tiene sobre los niveles de ATP, GTP, NADH/NADPH y los niveles de Pi extracelular de manera cuantitativa.

v.- Las proyecciones de este estudio debiesen apuntar a determinar de manera exacta las alteraciones metabólicas que se producen ante la carencia de poliP y hacia la búsqueda de las condiciones o los compuestos que tengan un efecto similar para ser utilizados como atenuantes de la virulencia o con efectos antimicrobianos alternativos a los existentes. Una vez conocidos los actores moleculares involucrados, el modelamiento matemático de las vías metabólicas relacionadas con los poliPs se vislumbra como una herramienta poderosa en la predicción del comportamiento fisiológico de un organismo, todo esto complementado con estudios de microarreglos de ADN.



**ANEXO 1**  
**Detalle estadístico para cada proteína identificada**

Spot	% volumen <sup>c</sup> poliP(+)	SD % vol poliP(+)	% volumen <sup>c</sup> poliP(-)	SD % vol poliP(-)	Tasa de cambio promedio <sup>d</sup>
1 <sup>a</sup>	0,45	0,03	0,91	0,26	2,04
2 <sup>a</sup>	0,03	0,00	0,38	0,19	11,97
3 <sup>b</sup>	0,67	0,04	1,37	0,43	2,02
4 <sup>a</sup>	0,19	0,06	0,47	0,15	2,42
5 <sup>a</sup>	0,04	0,00	0,19	0,02	4,34
6 <sup>a</sup>	0,08	0,05	0,26	0,07	3,43
7 <sup>b</sup>	0,04	0,01	0,17	0,05	4,65
8 <sup>a</sup>	0,01	0,00	0,17	0,02	23,43
9 <sup>a</sup>	0,06	0,00	0,18	0,06	3,03
10 <sup>a</sup>	0,06	0,00	0,13	0,03	2,31
11 <sup>b</sup>	0,00	0,00	0,20	0,01	*
12 <sup>a</sup>	0,04	0,02	0,33	0,12	9,17
13 <sup>a</sup>	0,03	0,01	0,28	0,18	11,31
14 <sup>a</sup>	0,10	0,02	0,23	0,01	2,26
15 <sup>a</sup>	0,09	0,01	0,51	0,22	5,57
16 <sup>b</sup>	0,62	0,08	0,88	0,11	1,42
17 <sup>a</sup>	0,22	0,01	0,40	0,01	1,85
18 <sup>a</sup>	0,04	0,00	0,21	0,12	5,69
19 <sup>a</sup>	0,12	0,09	0,00	0,00	*
20 <sup>b</sup>	0,22	0,14	0,03	0,01	-7,57
21 <sup>b</sup>	1,03	0,08	0,51	0,22	-2,01
22 <sup>a</sup>	0,67	0,26	0,04	0,00	-15,62
23 <sup>b</sup>	0,73	0,11	0,44	0,09	-1,67
24 <sup>b</sup>	0,22	0,12	0,03	0,01	-7,57
25 <sup>b</sup>	0,37	0,20	0,10	0,00	-3,49
26 <sup>b</sup>	0,25	0,02	0,05	0,02	-4,69
27 <sup>b</sup>	0,66	0,38	0,07	0,05	-9,88
28 <sup>b</sup>	0,79	0,27	0,44	0,00	-1,79
29 <sup>b</sup>	0,91	0,12	0,55	0,07	-1,66
30 <sup>a</sup>	3,54	1,03	0,00	0,00	*
31 <sup>b</sup>	0,15	0,03	0,04	0,00	-3,48
32 <sup>b</sup>	0,36	0,10	0,14	0,02	-2,50
33 <sup>b</sup>	0,39	0,02	0,13	0,05	-2,99

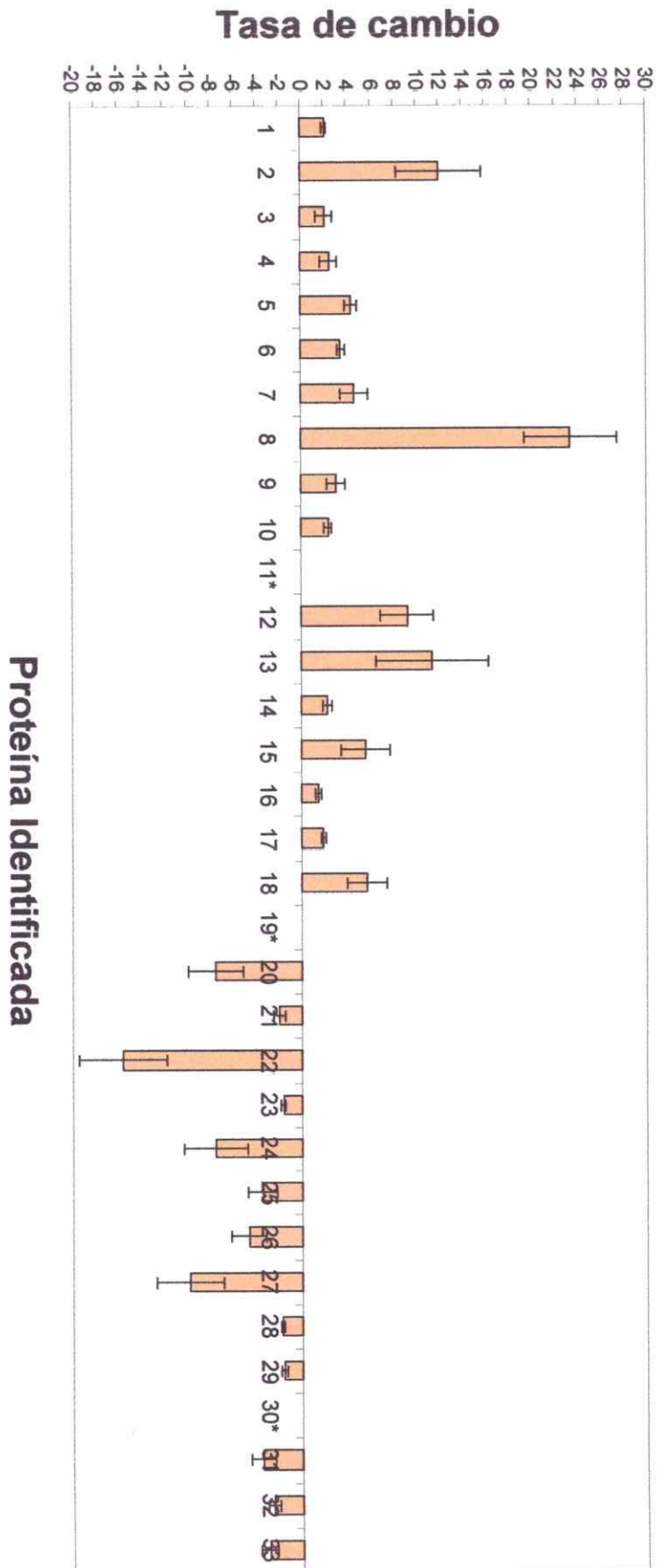
a.- valores para dos réplicas biológicas y una réplica técnica.

b.- valores para tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas.

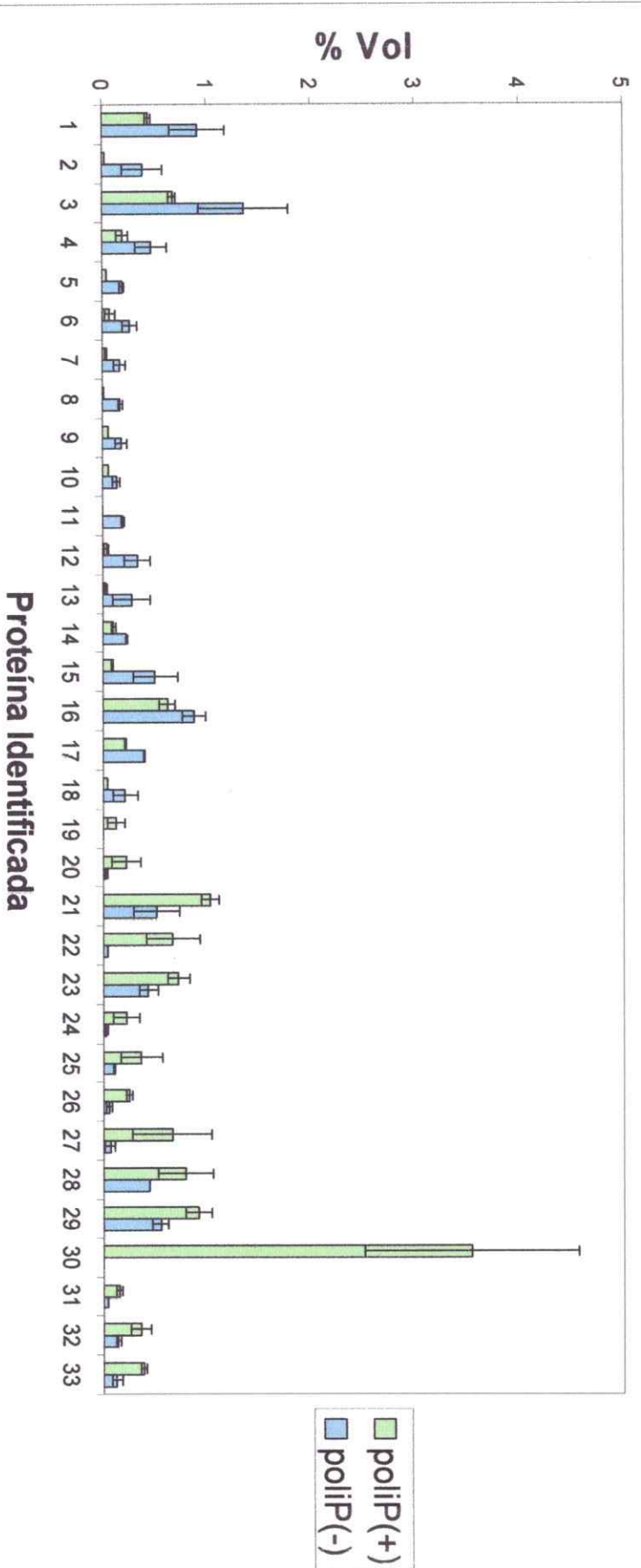
c.- intensidad (%) de la mancha seleccionada en relación al total de manchas presentes en el gel.

d.- tasa de cambio de la proteína en la cepa poliP(-) en relación con la cepa poliP(+), los valores positivos indican número de veces de aumento del nivel, valores negativos indican disminución (\* tasa de cambio infinita).

## Tasa de cambio del nivel de cada proteína en cepa polIP(-)



## Intensidad de cada proteína (%)



## ANEXO 2

Este trabajo fue presentado en la sección paneles de la XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile

**27. ESTUDIO DE PROTEÓMICA DIFERENCIAL EN *Pseudomonas* sp. B4 CON NIVELES DEFICIENTES DE POLIFOSFATOS**  
(Differential proteomic studies in *Pseudomonas* sp. B4 containing low levels of polyP) Varela, C.<sup>1</sup>, Jerez, C.A.<sup>1</sup>, Chávez, F.P.<sup>1</sup> Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Depto. Biología, Facultad de Ciencias e ICDB, Universidad de Chile.<sup>1</sup>

**XXXI REUNION ANUAL  
SOCIEDAD DE BIOQUIMICA  
Y BIOLOGIA MOLECULAR DE CHILE**

23-26 de Septiembre de 2008  
Termas de Chillán  
CHILE

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, K., Kornberg, A.** 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265:11734-11739.
- Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A.** 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. J. Biol. Chem. 268:633-639.
- Albanesi, D., Mansilla, M.C., Schujman, G.E., de Mendoza, D.** 2005. *Bacillus subtilis* cysteine synthetase is a global regulator of the expression of genes involved in sulfur assimilation. J. Bacteriol. 187:7631-7638.
- Aldor, I.S., Keasling, J.D.** 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. Curr. Opin. Biotechnol. 14:475-483.
- Ault-Riché, D., Fraley, C.D., Tzeng, C., Kornberg, A.** 1998. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180:1841-1847.
- Bartels, F., Backhaus, S., Moore, E.R., Timmis, K.N., Hofer, B.** 1999. Occurrence and expression of glutathione-S-transferase-encoding *bphK* genes in *Burkholderia sp.* strain LB400 and other biphenyl-utilizing bacteria. Microbiology 145: 2821-2834.
- Blanco, J., Moore, R.A., Viola, R.E.** 2003. Capture of an intermediate in the catalytic cycle of L-aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:12613-12617.
- Bode, G., Mauch, F., Ditschuneit, H., Malfertheiner, P.** 1993. Identification of structures containing polyphosphate in *Helicobacter pylori*. J. Gen. Microbiol. 139:3029-3033.
- Bolesch, D., Keasling, J.** 2000. Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. J. Biol. Chem. 275:33814-33819.

- Bonting, C.F., Kortstee, G.J., Zehnder, A.J.** 1991. Properties of polyphosphate: AMP phosphotransferase of *Acinetobacter* strain 210A. *J. Bacteriol.* 173:6484-6488.
- Brown, M.R.W., Kornberg, A.** 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 16085–16087.
- Cámara, B., Marín, M., Schlömann, M., Hecht, H.J., Junca, H., Pieper, D.H.** 2008. trans-Dienelactone hydrolase from *Pseudomonas reinekei* MT1, a novel zinc-dependent hydrolase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376: 423–428.
- Cardona, S., Chávez, F., Jerez, C.A.** 2002. The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in *Archaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4812–4819.
- Chávez, F.P., Lünsdorf, H., Jerez, C.A.** 2004. Growth of polychlorinated-biphenyl-degrading bacteria in the presence of biphenyl and chlorobiphenyls generates oxidative stress and massive accumulation of inorganic polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3064–3072.
- Chávez, F.P., Gordillo, F., Jerez, C.A.** 2006. Adaptive responses and cellular behaviour of biphenyldegrading bacteria toward polychlorinated biphenyls. *Biotechnol. Adv.* 24:309-320.
- Chávez, F.P., Mauriaca, C., Jerez, C.A.** 2009. Constitutive and regulated expression vectors to construct polyphosphate deficient bacteria. *BMC Res. Notes.* 2:50.
- Dahl, L.D., Wieden, H.J., Rodnina, M.V., Knudsen, C.R.** 2006. The importance of P-loop and domain movements in EF-Tu for guanine nucleotide exchange. *J. Biol. Chem.* 281:21139-21146.
- Deuerling, E., Bukau, B.** 2004. Chaperone-assisted folding of newly synthesized proteins in the cytosol. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39:261-277.
- Deinema, M.H., van Loosdrecht, M., Scholten, A.** 1985. Some physiological characteristics of *Acinetobacter* spp. accumulating large amounts of phosphate. *Wat. Sci. Techn.* 17:119-125.
- Elrick, M.M., Walgren, J.L., Mitchell, M.D., Thompson, D.C.** 2006. Proteomics: recent applications and new technologies. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98:432-441.
- Fondi, M., Brillì, M., Fani, R.** 2007. On the origin and evolution of biosynthetic pathways: integrating microarray data with structure and organization of the Common Pathway genes. *BMC Bioinformatics.* 8:Suppl 1:S12.

**Fraleay, C.D., Rashid, M.H., Lee, S.S., Gottschalk, R., Harrison, J., Wood, P.J., Brown, M.R., Kornberg, A.** 2007. A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104:3526-3531.

**Freiberg, C., Brunner, N.A., Schiffer, G., Lampe, T., Pohlmann, J., Brands, M., Raabe, M., Häbich, D., Ziegelbauer, K.** 2004. Identification and characterization of the first class of potent bacterial acetyl-CoA carboxylase inhibitors with antibacterial activity. J. Biol. Chem. 279:26066-26073.

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

**Han, K.Y., Song, J.A., Ahn, K.Y., Park, J.S., Seo, H.S., Lee, J.** 2007. Enhanced solubility of heterologous proteins by fusion expression using stress-induced *Escherichia coli* protein, *Tsf*. FEMS Microbiol. Lett. 274:132-138.

**Harrison, C.** 2003. *GrpE*, a nucleotide exchange factor for *DnaK*. Cell Stress Chaperones. 8:218-224.

**Hengge-Aronis, R.** 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (*RpoS*) subunit of RNA polymerase. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66(3):373-395.

**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.

**Huang, Y.J., Tsai, T.Y., Pan, T.M.** 2007. Physiological response and protein expression under acid stress of *Escherichia coli* O157:H7 TWC01 isolated from Taiwan. J. Agric. Food Chem. 55:7182-7191.

**Hullo, M.F., Auger, S., Soutourina, O., Barzu, O., Yvon, M., Danchin, A., Martin-Verstraete, I.** 2007. Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. J. Bacteriol. 189:187-197.

- Imsiecke, G., Munkner, J., Lorenz, B., Bachinski, N., Muller, W.E.G., Schroder, H.C.** 1996. Inorganic polyphosphates in the developing freshwater sponge *Ephydatia muelleri*: effect of stress by polluted waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15:1329-1334.
- Jaouen, T., Coquet, L., Marvin-Guy, L., Orange, N., Chevalier, S., Dé, E.** 2006. Functional characterization of *Pseudomonas fluorescens* *OprE* and *OprQ* membrane proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346:1048-1052.
- Jeamton, W., Mungpakdee, S., Sirijuntarut, M., Prommeenate, P., Cheevadhanarak, S., Tanticharoen, M., Hongsthong, A.** 2008. A combined stress response analysis of *Spirulina platensis* in terms of global differentially expressed proteins, and mRNA levels and stability of fatty acid biosynthesis genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 281:121-131.
- Jezek, P., Hlavata, L.** 2005. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37:2478-2503.
- Kazakov, A.E., Rodionov, D.A., Alm, E., Arkin, A.P., Dubchak, I., Gelfand, M.S.** 2009. Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. *J. Bacteriol.* 191:52-64.
- Keasling, J.D., Hupf, G.A.** 1996. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:743-746.
- Kornberg, A.** 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177:491-496.
- Kornberg, A., Rao, N., Ault-Riché, D.** 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125.
- Krömer, J.O., Bolten, C.J., Heinzle, E., Schröder, H., Wittmann, C.** 2008. Physiological response of *Corynebacterium glutamicum* to oxidative stress induced by deletion of the transcriptional repressor *McbR*. *Microbiology.* 154:3917-3930.
- Kulaev, I., Vagabov, V., Kulakovskaya, T.** 1999. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J. Biosci. Bioeng.* 88:111-129.
- Kumble, K.D., Kornberg, A.** 1996. Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. *J. Biol. Chem.* 271:27146-27151.
- Kuroda, A., Kornberg, A.** 1997. Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:439-442.



- Lee, S., Tsai, F.T. 2005. Molecular chaperones in protein quality control. *J. Biochem. Mol. Biol.* 38:259-265.
- Lee, S.J., Lee, Y.S., Lee, Y.C., Choi, Y.L. 2006. Molecular characterization of polyphosphate (PolyP) operon from *Serratia marcescens*. *J. Basic Microbiol.* 46:108-115.
- Lefebvre, M., Valvano, M. 2002. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5956-5964.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 1995. Bioenergética y metabolismo. En *Principios de Bioquímica*. pp 359-787. Segunda edición. Ediciones Omega S.A., Barcelona.
- Liebler, D.C. 2002. Proteomics and the New Biology. En *Introduction to proteomics: tools for the new biology*. pp 3-13. Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- Mäder, U., Hennig, S., Hecker, M., Homuth, G. 2004. Transcriptional organization and posttranscriptional regulation of the *Bacillus subtilis* branched-chain amino acid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* 186:2240-2252.
- Marengo, E., Robotti, E., Antonucci, F., Cecconi, D., Campostrini, N., Righetti, P. 2005. Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: A review of commercial software and home-made systems. *Proteomics.* 5:654-666.
- Merz, F., Boehringer, D., Schaffitzel, C., Preissler, S., Hoffmann, A., Maier, T., Rutkowska, A., Lozza, J., Ban, N., Bukau, B., Deuerling, E. 2008. Molecular mechanism and structure of Trigger Factor bound to the translating ribosome. *EMBO J.* 27:1622-1632.
- Miyake, T., Shiba, T., Kameda, A., Ihara, Y., Munekata, M., Ishige, K., Noguchi, T. 1999. The gene for an exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Res.* 6:103-108.
- Mohan, S., Kelly, T.M., Eveland, S.S., Raetz, C.R., Anderson, M.S. 1994. An *Escherichia coli* gene (*FabZ*) encoding (3R)-hydroxymyristoyl acyl carrier protein dehydrase. Relation to *fabA* and suppression of mutations in lipid A biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269:32896-32903.
- Monteoliva, L., Albar, J.P. 2004. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 3:220-239.

**Mukhopadhyay, S., Shankar, S., Walden, W., Chakrabarty, A.M.** 1997. Complex formation of the elongation factor Tu from *Pseudomonas aeruginosa* with nucleoside diphosphate kinase modulates ribosomal GTP synthesis and peptide chain elongation. *J. Biol. Chem.* 272:17815-17820.

**Nakanishi-Matsui, M., Kashiwagi, S., Ubukata, T., Iwamoto-Kihara, A., Wada, Y., Futai, M.** 2007. Rotational catalysis of *Escherichia coli* ATP synthase F1 sector. Stochastic fluctuation and a key domain of the beta subunit. *J. Biol. Chem.* 282:20698-20704.

**Niimura, Y.** 2007. The NADH oxidase-Prx system in *Amphibacillus xylanus*. *Subcell. Biochem.* 44:195-205.

**Nishiyama, Y., Massey, V., Takeda, K., Kawasaki, S., Sato, J., Watanabe, T., Niimura, Y.** 2001. Hydrogen peroxide-forming NADH oxidase belonging to the peroxiredoxin oxidoreductase family: existence and physiological role in bacteria. *J. Bacteriol.* 183:2431-2438.

**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.

**Phillips, C.I., Bogyo, M.** 2005. Proteomics meets microbiology: technical advances in the global mapping of protein expression and function. *Cell Microbiol.* 8:1061-1076.

**Primm, T.P., Andersen, S.J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., Barry, C.E.** 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* 182:4889-4898.

**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., Kornberg, A.** 2009. Inorganic polyphosphate: Essential for growth and survival. *Annu. Rev. Biochem.* 78:35.1-35.43.

**Rashid, M.H., Rao, N.N., Kornberg, A.** 2000. Inorganic Polyphosphate Is Required for Motility of Bacterial Pathogens. *J. Bacteriol.* 182:225-227.

- Rashid, M.H., Kornberg, A.** 2000 Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:4885-4890.
- 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. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:4176-4180.
- Reusch, R.N., Huang, R., Bramble, L.L.** 1995. Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels in the plasma membranes of *Escherichia coli*. Biophys. J. 69:754-766.
- Reva, O.N., Weinel, C., Weinel, M., Böhm, K., Stjepandic, D., Hoheisel, J.D., Tümmler, B.** 2006. Functional genomics of stress response in *Pseudomonas putida* KT2440. J. Bacteriol. 188:4079-4092.
- Sambrook J, Russell DW.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
- Seib, K.L., Wu, H.J., Kidd, S.P., Apicella, M.A., Jennings, M.P., McEwan, A.G.** 2006. Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:344-361.
- Sharma, S., Sundaram, C.S., Luthra, P.M., Singh, Y., Sirdeshmukh, R., Gade, W.N.** 2006. Role of proteins in resistance mechanism of *Pseudomonas fluorescens* against heavy metal induced stress with proteomics approach. J. Biotechnol. 126:374-382.
- Schevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. 68: 850-858.
- 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.
- Sureka, K., Ghosh, B., Dasgupta, A., Basu, J., Kundu, M., Bose, I.** 2008. Positive Feedback and Noise Activate the Stringent Response Regulator Rel in *Mycobacteria* PLoS ONE. 3:e1771.

- Tanaka, S., Lee, S.O., Hamaoka, K., Kato, J., Takiguchi, N., Nakamura, K., Ohtake, H., Kuroda, A.** 2003. Strictly polyphosphate-dependent glucokinase in a polyphosphate-accumulating bacterium, *Microtholunatus phosphovorius*. J. Bacteriol. 185:5654-5656.
- Tinsley, C.R., Manjula, B.N., Gotschlich, E.C.** 1993. Purification and Characterization of Polyphosphate Kinase from *Neisseria meningitidis*. Infect. Immun. 61: 3703-3710.
- Ugochukwu, E., Lovering, A.L., Mather, O.C., Young, T.W., White, S.A.** 2007. The crystal structure of the cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the basis for substrate specificity. J. Mol. Biol. 371:1007-1021.
- 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.
- 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. Appl. Environ. Microbiol. 74:1829-1835.
- Wilmes, P., Wexler, M., Bond, P.L.** 2008. Metaproteomics provides functional insight into activated sludge wastewater treatment. PLoS ONE. 3:1778.
- Wurst, H., Kornberg, A.** 1994 A Soluble Exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. J. Biol. Chem. 269: 10996-11001.
- Wurst, H., Shiba, T., Kornberg, A.** 1995. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 177:898-906.
- Zago, A., Chugani, S., Chakrabarty, A.M.** 1999. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. Appl. Environ. Microbiol. 65:2065-2071.
- Zhang, H., Ishige, K., Kornberg, A.** 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:16678-16683.
- Zhang, H., Rao, N.N., Shiba, T., Kornberg, A.** 2005a. Inorganic polyphosphate in the social life of *Myxococcus xanthus*: motility, development, and predation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102:13416-13420.
- Zhang, H., Gómez-García, M.R., Brown, M.R., Kornberg, A.** 2005b. Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: influence on development, sporulation, and predation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102:2731-2735.

**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., Xu, W.** 2005. Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO Rep.* 6:681-687.