

**Efecto de la carencia de polifosfatos y
de la presencia de cobre (II) en la
formación de biopelículas en *Sulfolobus
solfataricus***

Tesis

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

Doctor en Biotecnología Molecular

Facultad De Ciencias

Por

Alejandra Recalde Carballo

Enero, 2020

Director de Tesis Dr. Carlos A. Jerez

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

Alejandra Recalde Carballo

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 22 de enero de 2020.

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Víctor Cifuentes (Presidente)

Dr. Nicolas Guiliani

Dr. Mario Vera Veliz

Dr. Omar Orellana

"Era el mejor de los tiempos, era el peor de los tiempos, la edad de la sabiduría, y también de la locura; la época de las creencias y de la incredulidad; la era de la luz y de las tinieblas; la primavera de la esperanza y el invierno de la desesperación."

Historia de dos ciudades- Charles Dickens

Biografía



Me llamo Alejandra Recalde Carballo. Nací en Asunción, Paraguay el 28 de junio de 1989 hija de Aurora Carballo Morales y Luciano Miguel Angel Recalde Llano. Mayor de 4 hermanos (eso me marcó profundamente): David, Benjamín y Gabriela me enseñaron todo el espectro de sentimientos y juntos construimos ciudades y exploramos el espacio en el patio de nuestra casa en San Lorenzo.

Hice el jardín en “Pimpollitos” y la primaria en la “Asociación Cristiana de Jóvenes” o YMCA como se conoce, quizás más conocido por el tema de Village People. Al empezar la Escolar Básica me mudé al Colegio María Auxiliadora, donde 6 años después me recibí de Bachiller Humanístico en

Ciencias Sociales. Todavía recuerdo las clases de Filosofía del Prof. Gabriel, las de Ciencias de la Prof. Emilia, las de matemáticas de la Prof. Mercedes, Física con la Prof. Teresa y Química con el Prof. Gilberto. De ahí tengo muchos amigos cercanos que me acompañan hasta hoy. Hice de todo un poco: capitana de equipo, chrolera, abanderada, actriz de teatro, cantante y bailarina ocasional. Deportes no tanto. Siempre fui indecisa, pero siempre tuve claro que cuando grande quería ser científica.

Terminado el colegio sabía que la carrera de Bioquímica y el ADN me esperaban, así que postulé a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Asunción, donde terminé 6 años después con dos títulos de grado: Bioquímica y Bioquímica Clínica. Fui vicepresidenta y presidenta de la Asociación de Estudiantes de Bioquímica del Paraguay y capitana del equipo de ajedrez. La facultad me obligó a luchar por tener luz propia pero me regaló muchas personas sinceras que se mantuvieron a lo largo del camino.

Mientras terminaba el segundo grado académico enseñé la cátedra de Biología General y Biología Molecular en mi alma mater. Trabajé de analista químico en el Laboratorio de Calidad de aguas del CEMIT-UNA y en el laboratorio clínico del Centro Médico La Costa. Hoy esos días parecen lejanos pero cada persona contribuyó al camino transitado.

Siempre viví en San Lorenzo pero con la cabeza en el mundo. Finalmente, para el post grado postulé fuera de ese pedazo de tierra y terminé en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en el programa de Doctorado en Biotecnología Molecular, de donde hoy me estoy titulando. Formamos una familia con algunos compañeros de primer año y de laboratorio, con otros becarios paraguayos y gente que me fue adoptando y que me ayudó a sobrevivir el techaga'u (“añoranza del hogar” en guaraní).

El siguiente paso para mí es un post doctorado en Alemania. Miles de anécdotas se quedan aquí: entre la cordillera y el Pacífico, pero muchas más tenemos por delante tanto mis amigos como yo.

Creo que es difícil escribir sin sonar algo poética y filosófica en estas instancias. Escribir en general sin desbordarme me es difícil. Este pedazo de hoja que no es académico, es donde soy la Ale de debajo de la bata, la de las rondas de terere o de chelas. La que tiene un pie en el suelo y la cabeza en las nubes, (aunque a veces todo mi cuerpo está en las nubes, a decir verdad). La que tiene complejo de Mujer Maravilla pero también toneladas de ansiedad e inseguridades. En fin, una persona común y corriente tratando de dejar su huella en el universo.

Agradecimientos

A mi familia, por ser el faro que se mantiene quieto en el muelle durante las tormentas.
A mi mamá y mi papá, yo soy ustedes.

Al Dr. Carlos Jerez, por estos años de formación, por ser un apoyo constante y ejemplo a seguir. Sin Usted, hoy no estaría culminando esta etapa y esperando con ansias la siguiente. Espero que muchos proyectos y experimentos más vean la luz exitosamente en su laboratorio y que siga formando científicos con la misma pasión.

A Marilia, Ely, Shirley, Oscar y tía Pilar, por darme una familia en Santiago.

A los Fantastic4: Laura, Fabian y Javier, por darme una familia en el doctorado. Espero nos volvamos a juntar en IC en unos años y que nada y todo haya cambiado.

A Jazmín por hacer del 402 un hogar y enseñarme tantas cosas sobre Dios, la psicología y la vida. Voy a extrañar nuestras conversaciones larguísimas cuando invadías mi dormitorio, pero más simplemente estar en silencio una al lado de la otra.

A mi dúo Rocío: abrazamena. A Claudelina. Al funguicida Cristian, al sol Pauli, a Lujan "Carrie B", a Isa jaguane, a Diego V. y a Lari, mi Lari. Que les digo mas que les quiero... si esto no es una despedida, es un gracias por estar siempre. Nos vemos pronto.

A Vinzenz. Bergauf, mein Antreib und Schwung, du bist en Papallacta y en los últimos meses. Even if we're running out of gas, I know that we'll be safe and sound. Rohayhu.

A José, Mai, Javi, Rodrigo, Nia, Diego, Cony, Nice, Javier, Gaby y todos los que pasaron por el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología. Por los viernes coquetos y los miércoles de falda. Por las tardes de Gilda y el quiosco time. Por todas las galletas.

En especial, a Javi Ramos por acompañarme en el mejor viaje de mi vida...y no hablo solo de las Torres.

A José por ser el heredero del Dominio Arquea. Gracias por estos meses de compañía y amistad. Espero que el doctorado sea un éxito para ti, confía en tu capacidad, pero trabaja duro. ¡Escribe el proyecto y nos vemos en Alemania!

A Claudio por los consejos en todos los ámbitos. Admiro y respeto tu trabajo científico, pero más que nada tu calidad de persona, apoyando a todos los que coincidimos en algún mesón contigo ¡Que sigan sonando las alarmas por muchos años mas!

A Alejandro Araneda, por preocuparse siempre que todo este en orden en el laboratorio, y por los té de hojas de palta cuando me sentía enferma.

A los compañeros de laboratorio de la Universidad de Freiburg por hacerme sentir bienvenida y ayudarme con los experimentos, en especial a Megha y Marleen. A Max.

A Lorena Saragoni de la Unidad de Equipamiento Mayor por toda la ayuda con las microscopias.

Al Prof. Belfor Olivera y Salvador, por su ayuda en los análisis de las tablas de proteómicas.

A la Dra. Sonja Albers por permitirme realizar una pasantía en su laboratorio y abrirme las puertas a continuar el camino allí. Este trabajo y mi formación sin duda se vieron enriquecidos con los experimentos y las discusiones de los meses bajo su tutela.

A todos los profesores que me inspiraron desde que era pequeña.

Finalmente, a la Comisión revisora de la tesis, profesores Dr. Mario Vera, Dr. Nicolas Guiliani, Dr. Victor Cifuentes y Dr. Omar Orellana, por las correcciones, sugerencias y discusiones que ayudaron a que este trabajo vea la luz de la mejor forma posible.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	xix
ABSTRACT	xxiii
1. INTRODUCCIÓN	1
Arqueas en el proceso de biominería.....	1
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2
Biopelículas en arqueas.....	2
Adherencia a superficies.....	3
Exopolisacáridos de la matriz.....	5
Regulación del cambio de estado de vida.....	6
Biopelículas y respuesta a metales.....	8
La capa S y la glicosilación de proteínas extra celulares.....	9
Los polifosfatos.....	10
Polifosfatos y biopelículas.....	13
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	15
General.....	15
Específicos.....	15

4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Cepas y medios de cultivo.....	16
4.1.1 Cepas y medios de cultivo de <i>Sulfolobus</i> sp.	16
4.1.2 Cepas y medios de cultivo de <i>E. coli</i>	16
4.2 Técnicas de biología molecular	17
4.2.1 Extracción de ADN genómico	17
4.2.2 Cuantificación de ADN.....	17
4.2.3 Extracción de ARN.....	18
4.2.4 Transcripción reversa	20
4.2.5 PCR cuantitativo en tiempo real.....	20
4.2.6 Construcción de los plásmidos pSVA12800 y pSVA12801 para generar mutantes del metabolismo de PoliP en <i>S. acidocaldarius</i>	21
4.2.7 Generación de células competentes de <i>S. acidocaldarius</i>	23
4.2.8 Transformación de <i>S. acidocaldarius</i>	24
4.3 Ensayos de biopelículas.....	25
4.3.1 Crecimiento de biopelículas en placas de poliestireno.....	25
4.3.2 Eficiencia de formación de biopelículas. Ensayos con cristal violeta	25
4.4 Ensayos de adherencia a superficie de vidrio.....	26
4.5 Microscopía de Epifluorescencia y Confocal Laser de biopelículas	26
4.6 Ensayos de movilidad en placa semi sólida.....	27
4.7 Métodos de extracción y purificación de polifosfato (PoliP).....	28
4.7.1 Extracción de PoliP.....	28
4.7.2 Cuantificación de PoliP	28
4.8 Métodos para el análisis de proteínas	29
4.8.1 Preparación de extractos proteicos totales	29
4.8.2 Cuantificación de proteínas.....	30

4.8.3	Análisis de proteínas por iTRAQ	31
4.8.4	Electroforesis en mini geles de poliacrilamida-SDS.....	32
4.8.5	Detección de la cola de histidina de la PPX por Western blot	32
4.9	Concentración Mínima Inhibitoria de Cobre (CMI).....	33
4.10	Determinación de ATP, ADP y razón ADP/ATP.....	34
4.11	Análisis bioinformáticos y estadísticos.....	35
5.	RESULTADOS	36
5.1	Efecto de la ausencia de PoliP en la formación de biopelículas por <i>S. solfataricus</i>	36
5.1.1	Ensayo de la formación de biopelículas en <i>S. solfataricus</i>	36
5.1.3	Microscopía de epifluorescencia de biopelículas de <i>S. solfataricus</i>	38
5.1.4	Microscopía Confocal Laser de biopelículas de <i>S. solfataricus</i>	41
5.1.5	Ensayos de adherencia de <i>S. solfataricus</i> a superficie de vidrio	43
5.1.6	Medición de los niveles de transcrito del gen de la arqueolina por qRT-PCR.	45
5.1.7	Ensayos de movilidad en placa semisólida en <i>S. solfataricus</i>	46
5.1.8	Medición de los niveles de transcrito de genes relacionados con el cambio de estilo de vida por qPCR en células PoliP (-) versus WT.....	47
5.1.8.1	Búsqueda en <i>S. solfataricus</i> de genes homólogos a los reguladores de formación de biopelículas de <i>S. acidocaldarius</i>	47
5.1.8.2	Análisis por qPCR de reguladores transcripcionales Lrs14 en <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) y WT.....	50
5.2	Generación de mutantes del metabolismo de polifosfato en <i>S. acidocaldarius</i> y experimentos en biopelículas y fenómenos relacionados.....	51
5.2.1	Generación de una cepa de <i>S. acidocaldarius</i> que carece de PoliP	52
5.2.2	Generación de una mutante de <i>S. acidocaldarius</i> que acumula PoliP	53
5.2.3	Ensayos de formación de biopelícula por <i>S. acidocaldarius</i>	55

5.2.4 Microscopías de epifluorescencia y Confocal Laser de biopelículas de <i>S. acidocaldarius</i>	56
5.2.5 Ensayos de adherencia a superficie de vidrio en <i>S. acidocaldarius</i>	58
5.2.6 Expresión transcripcional del arqueolo, el pili adhesivo y un regulador de biopelícula en la cepa PoliP (-) de <i>S. acidocaldarius</i>	60
5.2.7 Ensayos de movilidad de <i>S. acidocaldarius</i>	61
5.2.8 Concentración Mínima Inhibitoria de Cu	62
5.3 Proteómica iTRAQ de células sésiles y plantónicas en las cepas WT y PoliP (-) de <i>S. solfataricus</i>	63
5.3.1 Preparación de muestras para la proteómica iTRAQ.....	63
5.3.2 Resultados.....	63
5.3.2.1 Proteómica iTRAQ células plantónicas en las cepas PoliP (-) versus WT..	65
5.3.2.2 Proteómica iTRAQ células sésiles en las cepas PoliP - versus WT.....	75
5.3.3 Comparación proteómica <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) versus WT, en células sésiles y plantónicas.....	90
5.4 Niveles de PoliP en biopelícula de <i>S. solfataricus</i>	95
5.5 Niveles de ATP y ATP/ADP en células plantónicas PoliP (-) y WT de <i>S. solfataricus</i>	95
5.6 Efecto del Cu ²⁺ sobre la formación de biopelículas y la síntesis de exopolisacáridos de la matriz en <i>S. solfataricus</i>	97
5.6.1 Efecto del cobre sobre el crecimiento de biopelículas.....	97
5.6.2 Análisis de los niveles de transcrito mediante qRT-PCR de genes seleccionados en <i>S. solfataricus</i> WT crecido en presencia de cobre	98
5.6.3 Microscopía Confocal Laser de biopelículas de <i>S. solfataricus</i> expuesto a Cu.....	102
5.7 Proteómica iTRAQ en células sésiles y plantónicas con y sin Cu en las cepas PoliP (-) y WT	105
5.7.1 Diseño de proteómica con Cobre.....	105

5.7.2 Resultados.....	105
5.7.3 Proteómica iTRAQ de células WT plantónicas versus sésiles, ambas con Cu.....	106
5.7.3 Comparación de proteómicas con y sin cobre de células plantónicas versus sésiles	114
6. DISCUSION.....	117
6.1 Efecto de la ausencia de PoliP durante la formación de biopelículas y fenómenos relacionados en <i>S. solfataricus</i> y <i>S. acidocaldarius</i>	117
6.1.1 Metabolismo de PoliP en Sulfolobus y cepas utilizadas en el estudio	117
6.1.2 Formación de biopelículas en <i>S. solfataricus</i> y <i>S. acidocaldarius</i> en carencia de PoliP	118
6.1.3 Adherencia a superficies de <i>S. solfataricus</i> y <i>S. acidocaldarius</i> en carencia de PoliP. Expresión de las estructuras de adhesión y funcionalidad del arqueolo.....	120
6.1.4 Estudio de reguladores transcripcionales relacionados a la formación de biopelícula	123
6.1.5 Modelo de formación de biopelículas en ausencia de PoliP en <i>S. acidocaldarius</i>	125
6.1.6 Perfil metabólico de <i>S. solfataricus</i> en ausencia de PoliP en modo de vida sésil y plantónico	127
6.2 Efecto del cobre durante la formación de biopelículas en <i>S. solfataricus</i>	128
6.1.1 Formación de biopelículas en presencia de Cu.....	128
6.1.2 Respuesta del sistema Cop al Cu en la forma de vida biopelícula	129
6.1.3 Perfil transcriptómico y proteómico global de respuesta a Cu en células plantónicas vs. sésiles	130
6.1.4 Respuesta de la cepa PoliP (-) al Cu en la forma de vida biopelícula	132
7. CONCLUSIONES.....	134

8. FINANCIAMIENTO	135
9. BIBLIOGRAFÍA	136
10. ANEXOS	146
ANEXO 1. Verificación de cepa.....	146
ANEXO 2. Lista de partidores utilizados en esta tesis	147
ANEXO 3. Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas.....	149
ANEXO 4. Imágenes de Microscopía Confocal Laser de biopelículas	152
ANEXO 5. Tablas de proteómicas.....	159
ANEXO 6. Comparación de los resultados de proteómica ITRAQ e ICPL de <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) versus WT en células plantónicas.....	185
ANEXO 7. Cálculos de las mediciones de ATP, ADP y razón ADP/ATP	188

Índice de Figuras

Figura 1. Operón y estructura ensamblada del archaeo en <i>S. solfataricus</i>	4
Figura 2. Operón y estructura del Pili Inducible por UV (Ups) en <i>S. solfataricus</i>	5
Figura 3. Posible papel de los PoliP y el sistema PitA/Pho84 en la resistencia a metales en arqueas.....	12
Figura 4. Parámetros de formación de biopelículas en <i>S. solfataricus</i> M16 y M16-PPX frente a diferentes inductores a los 2 y 3 días.....	37
Figura 5. Microscopía de epifluorescencia de biopelículas de 3 días de <i>S. solfataricus</i> M16 y M16-PPX teñidas con ConA y DAPI.....	39
Figura 6. Promedio de la intensidad de señal de cada imagen obtenida por microscopía de epifluorescencia de las biopelículas de <i>S. solfataricus</i>	40
Figura 7. A. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de <i>S. solfataricus</i> WT y PoliP (-) teñidas con DAPI, ConA e IB4.....	42
Figura 8. A. Microscopía de Epifluorescencia de células adheridas a superficie de vidrio de <i>S. solfataricus</i> WT y PoliP (-).....	44
Figura 9. Expresión génica relativa del gen de la arqueína en células sésiles y planctónicas de <i>S. solfataricus</i> WT y PoliP (-).....	45
Figura 10. Movilidad de <i>S. solfataricus</i> WT y PoliP (-) en placas semisólidas.....	47
Figura 11. Alineamiento de proteínas pertenecientes a la familia Lrs14-like de reguladores transcripcionales de <i>S. solfataricus</i> y <i>S. acidocaldarius</i>	48
Figura 12. Expresión génica relativa de algunos reguladores de transcripción de la familia Lrs14-like en <i>S. solfataricus</i> WT y PoliP (-) en biopelícula y estado planctónico.....	50
Figura 13. Obtención de una cepa de <i>S. acidocaldarius</i> que sobreexpresa su propia enzima PPX y carece de PoliP	52

Figura 14. Diagrama representativo del plásmido pSVA12800 utilizado para la delección del gen <i>saci_2018</i> en <i>S. acidocaldarius</i>	53
Figura 15. Parámetros de formación de biopelículas en <i>S.s acidocaldarius</i> MW001 y MW001-PPX frente a diferentes inductores a los 3 días tras inoculación.....	55
Figura 16. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de <i>S. acidocaldarius</i> WT y PoliP (-) teñidas con DAPI, ConA e IB4.	56
Figura 17. Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas de <i>S. acidocaldarius</i> WT y PoliP (-) de 4 días de maduración.....	58
Figura 18. Microscopía de Epifluorescencia de células de <i>S. acidocaldarius</i> WT y PoliP (-) adheridas a superficie de vidrio.....	59
Figura 19. Niveles de expresión transcripcional de genes relacionados a biopelículas en <i>S.</i> <i>acidocaldarius</i>	60
Figura 20. Western blot con anti flaB en células de <i>S. acidocaldarius</i> WT y PoliP (-) en condiciones de hambruna.....	61
Figura 21. Ensayo de movilidad en placas semi-sólidas de gelrite/medio Brock de <i>S. acidocaldarius</i> WT y PoliP (-)	61
Figura 22. Concentración Mínima Inhibitoria de Cobre en <i>S. acidocaldarius</i> WT y PoliP (-)	62
Figura 23. Categorías funcionales de las proteínas que expresan cambios en la proteómica iTRAQ PoliP (-) versus WT en células plantónicas.....	65
Figura 24. Rutas metabólicas afectadas por la ausencia de polifosfato en células plantónicas de <i>S. solfataricus</i>	68
Figura 25. Categorías funcionales de las proteínas que expresan cambios en la proteómica iTRAQ PoliP (-) versus WT en células sésiles.....	75
Figura 26. Rutas metabólicas afectadas por la ausencia de polifosfato en células sésiles de <i>S. solfataricus</i>	77
Figura 27. Proteínas del metabolismo de bases nitrogenadas expresadas diferencialmente en células sésiles de <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) vs WT.....	80
Figura 28. Metabolismo de tiorredoxinas y proteínas diferencialmente expresadas en células sésiles de <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) versus WT.....	88
Figura 29. Gráfico de barras comparando el porcentaje de proteínas correspondiente a cada categoría funcional en las proteómicas PoliP (-) versus WT, en células plantónicas y sésiles.	91

Figura 30. Comparación de los cambios generales observados en las principales categorías metabólicas de interés en las proteómicas de células PoliP (-) versus WT en estado de vida planctónico y sésil.....	93
Figura 31. Niveles de PoliP en biopelícula de <i>S. solfataricus</i> M16 a lo largo de varios días de desarrollo.....	94
Figura 32. Niveles de ATP, ADP y razón ATP/ADP en células planctónicas de <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) y WT.....	96
Figura 33. Parámetros de formación de biopelículas en células expuestas a diferentes concentraciones de sulfato de cobre (II).....	98
Figura 34. Expresión génica relativa de SSO1101 y SSO3006 en células sésiles y planctónicas WT y PoliP (-) expuestas a cobre.....	99
Figura 35. Expresión génica relativa de <i>flaB</i> (SSO2323) en células planctónicas PoliP (-) y WT expuestas a cobre durante 1 y 24 h.....	100
Figura 36. Expresión génica relativa de <i>copA</i> en células sésiles y planctónicas de <i>S. solfataricus</i> WT y PoliP (-) en presencia de CuSO ₄	101
Figura 37. Efecto del cobre en la formación de biopelículas en <i>S. solfataricus</i> M16 (WT).....	103
Figura 38. Efecto del cobre en la formación de biopelículas en <i>S. solfataricus</i> M16-PPX [PoliP (-)].....	104
Figura 39. Categorías funcionales de las proteínas que expresan cambios en la proteómica iTRAQ células planctónicas versus sésiles en cepa M16 con Cu.....	106
Figura 40. Rutas metabólicas afectadas por el Cu al comparar células planctónicas vs. sésiles de <i>S. solfataricus</i> WT.....	109
Figura 41. Proteínas que coinciden al comparar las proteómicas sin Cu y con Cu, en células planctónicas versus sésiles.....	115
Figura 42. Posible modelo del rol de PoliP en la formación de biopelículas en <i>S. acidocaldarius</i>	126

Índice de Tablas

Tabla 1. Proteínas identificadas y proteínas expresadas diferencialmente, ya sea aumentadas o disminuidas en el experimento de proteómica cuantitativa iTRAQ.....	64
Tabla 2. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Metabolismo, Producción y conversión de energía.....	67
Tabla 3. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Metabolismo, transporte y metabolismo de carbohidratos.....	71
Tabla 4. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Modificaciones postraduccionales, recambio proteico y chaperonas.....	73
Tabla 5. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Proteínas pobremente caracterizadas: Función desconocida.....	73
Tabla 6. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Metabolismo, Producción y conversión de energía.....	76
Tabla 7. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Metabolismo, Transporte y metabolismo de nucleótidos.....	79
Tabla 8. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Metabolismo, Transporte y metabolismo de iones inorgánicos.....	81
Tabla 9. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesos celulares y señalización. Mecanismos de transducción de señal.....	82
Tabla 10. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesos celulares y señalización. Mecanismos de defensa.....	83
Tabla 11. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesamiento y almacenamiento de la información. Transcripción.....	84
Tabla 12. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesamiento y almacenamiento de la información. Modificaciones post traduccionales, recambio proteico y chaperonas.....	86
Tabla 13. Resultados de la proteómica iTRAQ con Cu.....	105
Tabla 14. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Metabolismo: Producción y conversión de energía.....	107

Tabla 15. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Metabolismo, Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	108
Tabla 16. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Metabolismo.....	110
Tabla 17. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Procesos y señalización celular: Mecanismos de transducción de señal.....	111
Tabla 18. Selección de las tablas S5 y S6, categoría: Procesamiento y almacenamiento de información: Replicación, recombinación y reparación.....	112
Tabla 19. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Procesamiento y almacenamiento de información: Modificaciones postraduccionales, recambio proteico y chaperonas.....	113
Tabla 20. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Proteínas pobremente caracterizadas.....	114

Material suplementario

Figuras suplementarias

Figura S1. Confirmación de cepa mediante medición de niveles de PoliP ante diferentes inductores.....	146
Figura S2. Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas de 3 días de <i>S. solfataricus</i> M16 (WT).....	150
Figura S3. Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas de 3 días de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX [PoliP (-)].....	151
Figura S4. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de <i>S. solfataricus</i> M16 (WT).....	153
Figura S5. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX [(PoliP (-)].....	154
Figura S6. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de <i>S. acidocaldarius</i> MW001 (WT).....	155
Figura S7. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de biopelículas de 3 días de <i>S. acidocaldarius</i> MW-001-PPX [PoliP (-)].....	156
Figura S8. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de <i>S. solfataricus</i> M16 en presencia de 0,5 mM Cu.....	157
Figura S9. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de <i>S. solfataricus</i> M16-PPX en presencia de 0,5 mM Cu.	158
Figura 10S. Numero de proteínas en las que se detectan cambios por los métodos de proteómica iTRAQ, ICPL o ambos.....	185
Figura S11. Estado general de las vías metabólicas al comparar células PoliP (-) versus WT de <i>S. solfataricus</i> por proteómica iTRAQ e ICPL.....	187

Tablas suplementarias

Tabla S1. Lista de partidores utilizados para qPCR.....	147
Tabla S2. Lista de partidores utilizados para clonamiento.....	147
Tabla S3. Lista de partidores utilizados para secuenciamiento.....	148
Tabla S4: Proteínas aumentadas en <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) versus WT en células plantónicas.....	160
Tabla S5: Proteínas disminuidas en <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) versus WT en células plantónicas.....	163
Tabla S6: Proteínas aumentadas en <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) versus WT en células sésiles.....	167
Tabla S7: Proteínas disminuidas en <i>S. solfataricus</i> PoliP (-) versus WT en células sésiles.....	170
Tabla S8: Proteínas aumentadas en <i>S. solfataricus</i> M16 con Cu, en células sésiles versus planctónicas.....	175
Tabla S9: Proteínas disminuidas en <i>S. solfataricus</i> M16 con Cu, en células sésiles versus planctónicas.....	183
Tabla S10. Identidad de las proteínas con cambios significativos en ambas metodologías de proteómica: iTRAQ e ICPL.....	186
Tabla S11. Valores de luminiscencia de los ensayos de ATP (UL), ADP (UL) y de proteína (mg) para las cepas PoliP (-) y WT de <i>S. solfataricus</i> en estado plantónico.....	188

Lista de abreviaturas

ADN	: Acido desoxirribonucleico
ADP	: Adenosín difosfato
Ara	: Arabinosa
ARN	: Ácido ribonucleico
ATP	: Adenosín trifosfato
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BSA	: Seroalbúmina de bovino
CMI	: Concentración Mínima Inhibitoria
ConA	: Concavalina A
Cu	: Cobre
DAPI	: 4 ',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	: Dietilpirocarbonato
dNTP	: Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	: Densidad óptica
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	: Azúcares Poliméricos Extracelulares
GITC	: Isotiocianato de guanidina
iTRAQ	: Marcaje Isobárico para cuantificación relativa y absoluta
LB	: Luria-Bertani
MCL	: Microscopía Confocal Laser
ON	: Toda la noche
pb	: Pares de bases
PBS	: Solución amortiguadora de fosfato
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
Pi	: Ortofosfato inorgánico
Pit	: Transportador de fosfato inorgánico
PolIP	: Polifosfatos
PPK	: Polifosfato quinasa
PPX	: Exopolifosfatasa
rARN	: Ácido ribonucleico ribosomal
RLU	: Unidades Relativas de Luminiscencia
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	: Electroforesis denaturante en gel de poliacrilamida
SSO / Sso	: Sulfolobus solfataricus
SACI / Saci	: Sulfolobus acidocaldarius
TA	: Temperatura ambiente

RESUMEN

Los polifosfatos (PoliP) son polímeros de ortofosfato inorgánico que desempeñan varias funciones en las células procariontes y eucariontes. Por ejemplo, tienen un papel protector frente al estrés oxidativo y en la resistencia a metales, pueden ser como sustituto de ATP en algunas reacciones con quinasas, entre otras. En bacterias también se han relacionado con la formación de biopelículas, movilidad y virulencia.

Las biopelículas ayudan a resistir diversos tipos de estrés, como la presencia de metales, los que en algunos casos, inducen la formación de éstas. En estudios previos hemos encontrado que la presencia de Cu^{2+} en células de *Sulfolobus solfataricus* en estado plantónico, produce un aumento en los niveles de expresión de un regulador transcripcional que se ha relacionado con la formación de biopelículas. Los estudios sobre biopelículas en arqueas aún son escasos y los mecanismos que regulan el paso desde el estilo de vida plantónico al de estado sésil parecen ser diferentes a los de las bacterias. No se ha analizado el posible rol de los polifosfatos en la formación de biopelículas en este dominio de la vida.

En esta tesis, analizamos el posible efecto de la ausencia de los PoliP en la formación de biopelículas y fenómenos relacionados en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* y el efecto del Cu^{2+} en las de biopelículas de *S. solfataricus*. Ambos microorganismos son arqueones termoacidófilos modelo.

Mediante ensayos de formación de biopelículas en placas y Microscopía Confocal Laser detectamos una reducción en la formación de biopelículas en la cepa de *S. solfataricus* PoliP

(-) comparada con la WT. Estas células presentaron una menor movilidad, lo cual se vio reflejado en el halo de nado en placas de gelrite semisólidas. Adicionalmente, mediante tinción con DAPI de células adheridas durante 24 h a láminas de vidrio, estas mostraron una menor adherencia a esta superficie.

Se generó además una cepa PoliP (-) en *S. acidocaldarius*, la cual se comportó de manera similar a la cepa PoliP (-) de *S. solfataricus*, presentando menores niveles de resistencia a Cu, poca adherencia a superficies de vidrio, menor formación de biopelícula y menor movilidad en placas semisólidas, aunque expresó el arqueolo en mayor cantidad que la cepa WT.

Los resultados de proteómica cuantitativa con *S. solfataricus* nos indicaron que existen otras diferencias a nivel metabólico. En el estado de vida plantónico se observó un aumento de las proteínas involucradas en la producción de ATP por fosforilación oxidativa, mientras que, en el estado de vida sésil se vio una preferencia por la producción de ATP a través de fosforilación a nivel de sustrato, cuando se compararon las cepas PoliP (-) versus WT. Este último comportamiento podría explicarse porque mediante la fosforilación a nivel de sustrato se genera una menor cantidad de ATP, lo que correspondería con el modo de vida en biopelícula donde la célula tendría un menor requerimiento energético. Al mismo tiempo, la generación de una menor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) por esta vía compensaría el efecto de la falta de PoliP que también interviene en la detoxificación de ROS en la célula. Sin embargo, al medir los niveles de ATP, ADP y la razón ADP/ATP, éstos se mantuvieron casi constantes en las cepas PoliP (-) y WT en estilo de vida planctónico.

Al estudiar el efecto de la presencia de Cu en *S. solfataricus* WT, se observó un aumento en la formación de biopelículas a diferentes concentraciones del metal, llegándose a un máximo a 0,5 mM de Cu. Al comparar mediante qRTPCR y proteómica cuantitativa la respuesta a Cu

de las células plantónicas versus las sésiles, se observó en el estilo de vida plantónico una mayor expresión del gen *copA*, relacionado a resistencia al metal, y de proteínas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo, la cadena de transporte de electrones y aquellas del ciclo de Krebs. Estos resultados sugieren que el estado de vida sésil protegería a las células de la toxicidad de los metales pesados.

Finalmente, en la cepa PoliP (-) no se pudo inducir la formación de biopelículas a 0.5 mM de Cu, probablemente porque se trata de una concentración más cercana a la CMI en estas células.

Los resultados de esta tesis constituyen la primera evidencia de que los PoliP influyen en la formación de biopelículas y otros fenómenos relacionados en arqueas, específicamente en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*, y de que este estilo de vida ayuda a la resistencia a Cu en *S. solfataricus*.

ABSTRACT

Polyphosphates (PolyP) are polymers of inorganic orthophosphate with many functions among prokaryotic and eukaryotic cells. For example, they have a protective role against oxidative stress and in heavy metal resistance. They can also act as substitute of ATP in some kinase reactions, among others. In bacteria, polyP has also been related to biofilm formation, motility and virulence.

Cells living in biofilms are able to stand better diverse kinds of stresses, such as the presence of metals, which in some cases, can induce biofilm formation. Our previous preliminary studies with planktonic *Sulfolobus solfataricus* cells showed that the presence of Cu^{2+} stimulated an increase of expression levels of a transcriptional regulator related to biofilm formation. Knowledge related to biofilms in archaea are still scarce, and the mechanisms underlying the change from planktonic to sessile lifestyle seems to be different from those of bacteria. Furthermore, the possible role of PolyP in biofilm formation in archaea is unknown.

In the present Thesis work, the effect of the lack of PolyP in biofilm formation and related phenomena was studied both in *S. solfataricus* and *S. acidocaldarius*, model hyperthermoacidophiles archaea. In addition, the effect of Cu^{2+} in *S. solfataricus* biofilm generation was also analyzed.

By using titrate plates biofilm formation assays and confocal laser microscopy, a reduction in biofilm formation was seen in PoliP (-) *S. solfataricus* when compared to the WT strain. These cells lacking PolyP also showed a decreased motility, as seen by measuring the swimming

ratio in semi solid gelrite plates. Additionally, PolyP (-) cells showed less glass surface adhesion after 24 h as detected by DAPI staining.

A PolyP (-) *S. acidocaldarius* strain was also generated. Even though this strain expressed more archaeum than WT strain, it behaved similarly to *S. solfataricus* PolyP (-) strain, since it also showed lower Cu resistance levels, decreased adherence to glass surface and less biofilm formation and motility in semi solid plates.

iTRAQ quantitative proteomic analysis of planktonic *S. solfataricus* PolyP (-) versus WT strains showed increased levels of proteins related to stress response and those involved in ATP generation through oxidative phosphorylation. On the other hand, sessile lifestyle cells showed a preference for ATP production via substrate-level phosphorylation, when PolyP (-) versus WT strains were compared. A possible explanation for this behaviour is that substrate-level phosphorylation generates less ATP, which would be in agreement with biofilm lifestyle. where cells would have lower energetic requirement. On the other hand, the lower levels of reactive oxygen species (ROS) generated via substrate-level phosphorylation could compensate for the effects of the lack of PolyP, which is also involved in detoxification of cells from ROS. Nevertheless, levels of ATP, ADP and the ADP/ATP ratio remained constant in PolyP (-) and WT strains in planktonic lifestyle.

A raise in biofilm formation was seen in *S. solfataricus* WT grown at different copper concentrations, reaching a maximum quantity at 0.5 mM Cu. In addition, planktonic and sessile *S. solfataricus* WT cells responded to Cu by increasing their levels of *copA* gene expression and CopA protein levels as respectively determined by qRTPCR and quantitative proteomics. Furthermore, these microorganisms also showed a higher expression of proteins related to oxidative stress response, electronic transport chain and Krebs cycle in planktonic

lifestyle. These results strongly suggest that sessile lifestyle may protect cells from heavy metal toxicity.

Finally, biofilm formation could not be induced as a response to 0,5 mM Cu in *S. solfataricus* PolyP (-) strain most likely because this metal concentration is very close to their Copper Minimal Inhibitory Concentration.

Altogether, these results show for the first time the effect of the lack of PolyP in biofilm formation, adhesion and motility in archaea, specifically *S. solfataricus* and *S. acidocaldarius*, and suggest that biofilm lifestyle is a possible Cu resistance mechanism in *S. solfataricus*.

1. INTRODUCCIÓN

Arqueas en el proceso de biominería

El proceso de biolixiviación se lleva a cabo gracias a la acción de microorganismos que permiten la extracción de los metales pesados a partir de sus minerales. Estas bacterias y arqueas oxidan los compuestos insolubles, generalmente sulfuros metálicos, y liberan los metales, en especial oro y cobre. Este procedimiento ofrece ventajas frente a la lixiviación convencional ya que genera un menor impacto ambiental, a la vez que permite aprovechar minerales de baja ley, cuya explotación por métodos tradicionales se hace costosa (Orell y col., 2010).

Gracias a sus características de resistir bajos pH (1-3) y altas temperaturas (65-80°C), las arqueas termoacidófilas, especialmente las de los géneros *Sulfolobus*, *Acidianus* y *Metallosphaera*, se utilizan como parte de consorcios biomineros en bioreactores, en etapas que requieren altas temperaturas (Norris, 2013; Harrison, 2005). Pero una característica esencial para que sean útiles en el proceso es su resistencia a altas concentraciones de metales. Para ello, poseen la capacidad de recuperarse del daño producido por los metales o de limitar la concentración celular efectiva de los mismos. Algunas de las estrategias de resistencia a Cu de las arqueas son similares a las de las bacterias acidófilas. Por ejemplo, llevar los metales a un estado de oxidación menos tóxico ($\text{Cu}^{+1} \rightarrow \text{Cu}^{+2}$), transportar el metal fuera de la célula vía ATPasas de tipo P como el sistema *cop*, conservado en varias *Crenarchaeotas* (*Sulfolobus*) y *Euryarchaeotas* (Ettema y col., 2006). En el caso de S.

solfatarius, una proteína transportadora de Cu^{2+} CopA, una chaperona de metales CopM y un factor de regulación transcripcional CopT, componen el sistema CopTMA que responde a los niveles de Cu intracelular, y, adicionalmente, un segundo transportador llamado CopB que se expresa en forma constitutiva (Ettema y col., 2006; Völlmecke y col., 2012). Adicionalmente estos microorganismos pueden acomplejar los cationes metálicos con los polifosfatos (PoliP) ya que estos poseen carga negativa (Martínez-Bussenius y col., 2016; Wheaton y col., 2016). Posiblemente, así como ocurre en bacterias, las biopelículas ayuden a ofrecer una mayor resistencia a metales.

Sulfolobus solfataricus

S. solfataricus es un arqueón perteneciente al reino Crenarchaeota. Aerobio estricto, termoacidófilo que se desarrolla a temperaturas de entre 60 y 92°C (óptimo 80°) y a pH entre 2 y 4 (Ulas y col, 2012). Puede crecer de manera heterotrófica o mixta (Golyshtina y col, 2016) y litoautotrófica (Ulas y col, 2012).

S. solfataricus es uno de los organismos modelo para el dominio arquea. Esto se debe a su gran abundancia global, su facilidad de cultivo en diferentes medios y el desarrollo de herramientas que permiten modificarlo genéticamente para su mejor estudio (Brouns y col, 2005).

Biopelículas en arqueas

Las biopelículas son posiblemente el modo de vida más común entre los microorganismos. Estas consisten en células adheridas a una superficie (que puede ser o no sustrato para el microorganismo), embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares secretada por ellas mismas, formada por lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos extracelulares y proteínas (Fröls, 2013; Zhang y col., 2015). Son comunidades dinámicas donde las células

pueden liberarse y dispersarse en el fluido, para vivir en estado móvil o planctónico o volver a adherirse a otra región de la superficie para colonizarla (Koechler y col., 2015). La primera biopelícula descrita en el dominio Archaea fue la del euryarchaeon hipertermófilo *Thermococcus litoralis* (Rinker y Kelly, 1996).

Las biopelículas son importantes porque, similar a lo que ocurre en bacterias, protegen a las arqueas frente a diversos tipos de estrés ambiental, como cambios de pH, desecación, radiación UV, altas concentraciones de sales y de metales (Fröls, 2013; Laplagia y Hartzell, 1997). En *Sulfolobus*, los cambios de pH y temperatura incluso inducen la formación de biopelículas (Koerdt y col., 2010).

En años recientes se ha logrado estandarizar un método para crecer biopelículas del género *Sulfolobus* sobre placas de Petri (Koerdt y col, 2010; Koerdt y col, 2011). Este método consiste en crecer a *Sulfolobus* en medio Brock ajustado a pH 3 y a 76°C, en placas de Petri con superficie hidrofóbica durante 3 a 6 días sin agitación. En este modelo, se determinó que al día seis se obtiene una biopelícula madura, según su densidad celular (Koerdt y col., 2010). Las etapas de formación de las biopelículas incluyen: 1. Cambio de una adherencia reversible a una irreversible, 2. Formación de microcolonias, 3. Maduración y dispersión (van Wolferen y col., 2018).

Adherencia a superficies

El primer paso del proceso de formación de biopelículas es la adherencia de la célula plantónica a una superficie (Fröls, 2013). En especies del género *Sulfolobus* se ha demostrado que participan estructuras celulares similares a flagelos, denominados “arquelos”, que guardan relación estructural con los pili tipo IV de las bacterias. Otra estructura similar es el Pili Inducible por radiación UV (Ups), que se expresa altamente tras el daño con radiación UV, ocasionando la agregación de las células y el intercambio de ADN (van Wolferen y col., 2018).

Se ha observado que mutantes de *S. solfataricus* que carecen de arquelina, uno de los componentes del operón *fla* (que codifica para los componentes del arquel) (Fig. 1), o que carecen de los componentes del Ups (Fig. 2), no se adhieren a superficies como la pirita o el vidrio (Zolghadr y col., 2010). *Sulfolobus acidocaldarius* posee una tercera estructura de superficie implicada en la adherencia, el Pili Adhesivo Arqueal (Aap). En este organismo, el arquel no influye en la adherencia a superficies de vidrio, pero sí en la maduración de la biopelícula; y son el Aap y el Ups los implicados en la adherencia (Henche y col., 2012).

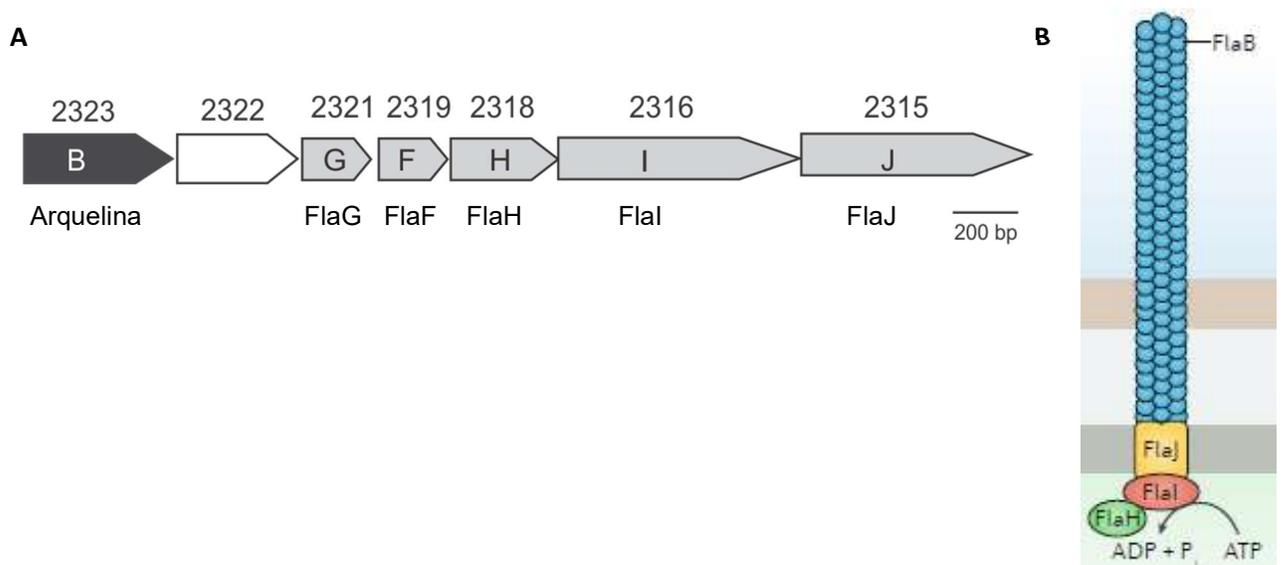


Figura 1. Operón y estructura del arquel en *S. solfataricus*.

A. Operón *fla* (arquel). La arquelina está marcada en color negro. En gris, los genes de proteínas accesorias predichas. En blanco, un gen solamente descrito en *Sulfolobus* spp. En *S. solfataricus* P2, el gen SSO2321 se encuentra interrumpido por un elemento de inserción, que no es estable en condiciones de laboratorio. **B. Estructura del arquel.**

Modificado de: Szábo y col., 2007 y van Wolferen y col., 2018.

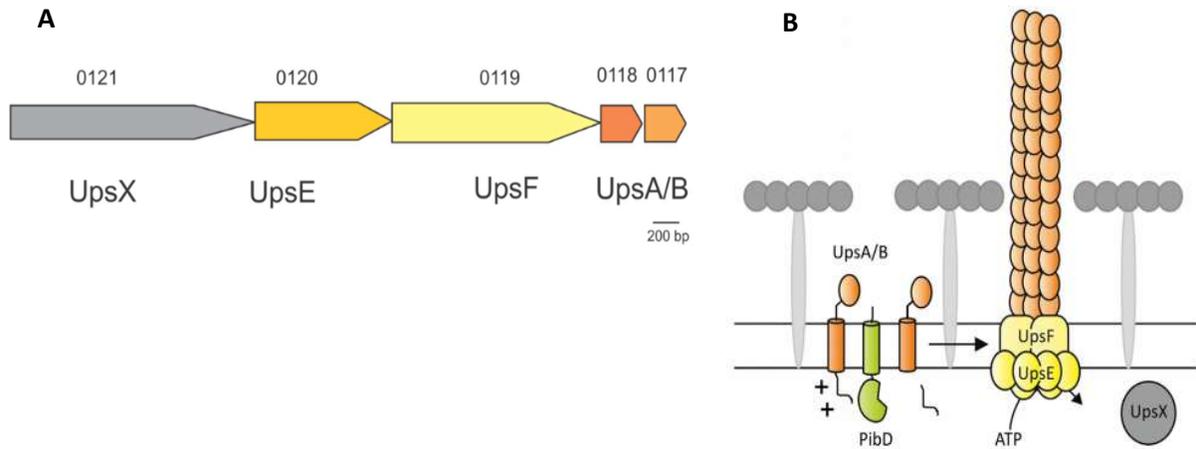


Figura 2. Operón y estructura del Pili Inducible por radiación UV (Ups) en *S. solfataricus*.

A. Operón *Ups*. **B.** Estructura del Ups. Los colores de los ORF se corresponden con los colores de la estructura.

Modificado de: van Wolferen y col., 2013

Exopolisacáridos de la matriz

Una vez adheridas a la superficie, las células empiezan a secretar exopolisacáridos extracelulares (EPS). Se ha determinado que en el género *Sulfolobus*, los residuos de azúcares que componen las EPS son manosa, galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y/o ácido N-acetilneuramínico (Fröls, 2013). La composición de los exopolisacáridos cambia conforme al desarrollo de la biopelícula. Así, en *S. solfataricus*, *S. tokodaii* y *S. acidocaldarius*, los residuos de azúcares el día tres son mayormente glucosa y manosa, mientras que en el día seis se ve un aumento de galactosa y N-acetil-glucosamina. (Koerdt y col., 2012). No se ha descrito la vía de síntesis de exopolisacáridos en arqueas (Fröls, 2013).

Empleando una mutante espontánea de *S. solfataricus* que carece de cerca de 50 genes (específicamente desde el SSO3004 al SSO3050), entre los que se encuentran varios que codifican para proteínas que metabolizan y transportan azúcares, se encontró que la enzima α -manosidasa estaría involucrada en la regulación de la síntesis de los exopolisacáridos. Esta mutante forma microcolonias que excretan exopolisacáridos en mayor cantidad que la cepa

silvestre P2 (Koerdt y col., 2012). Al medir en la cepa silvestre mediante qRT-PCR los niveles de transcrito del gen de la α -manosidasa (SSO3006), se encontró una expresión aumentada en células sésiles en comparación con las células planctónicas. Al complementar la cepa mutante con el gen de la α -manosidasa, se restauró el fenotipo silvestre de formación de biopelículas (Koerdt y col., 2012).

Regulación del cambio de estado de vida

En las bacterias, el cambio de vida planctónica a sésil está regulado por mecanismos de Quorum Sensing, mediante moléculas pequeñas llamadas autoinductores (AI). Los AI se secretan y se acumulan hasta un nivel umbral en el que desencadenan cambios en los niveles de expresión de genes que, de manera coordinada, gatillan el crecimiento en estado de biopelícula (Orell y Guiliani, 2016). En *E. coli*, se ha determinado que la síntesis de autoinductores de tipo 2 (AI-2) podría inducirse por la hidrólisis de los PoliP, lo que a su vez induciría la formación de biopelículas en la fase estacionaria de crecimiento (Grillo-Puertas y col, 2012).

Si bien se han detectado moléculas de AI-1 con estructura química de acil homoserina lactonas (AHL) y proteínas involucradas en su síntesis en metanoarqueas y haloarqueas mesófilas, no se han encontrado homólogos a estas proteínas en el genoma de organismos termófilos o hipertermófilos (Nichols y col., 2013). En el hipertermófilo *Pyrococcus furiosus*, se han detectado furanonas similares a AI-2, sin embargo no se han determinado las enzimas involucradas en su síntesis (LuxS o Pfs). No se sabe si estos AI-2 están implicados en los procesos de formación de biopelículas en *P. furiosus*. En *Sulfolobus* spp., no se encontraron AI ni moléculas similares de ningún tipo (Orell y col., 2013a). *S. solfataricus* y *S. islandicus* producen lactonasa, enzimas que degradan los AHL, y que podrían estar involucradas en la competencia por nichos ecológicos (Orell y Giuliani, 2016).

Otra molécula involucrada en la formación de biopelículas en bacterias es el segundo mensajero c-di-GMP. Generalmente, los niveles altos de esta molécula llevan a una reducción de la movilidad celular y la consecuente formación de biopelículas. Los mecanismos de QS y el c-di-GMP actúan coordinadamente para promover el estilo de vida sésil, y los mecanismos por los cuales lo hacen pueden ser muy variados (Jenal y Malone, 2006). Hasta la fecha, no se ha encontrado evidencia de c-di-GMP o de enzimas involucradas en su metabolismo en arqueas (Orell y col., 2013a), por lo que se propone que serían otros los mecanismos involucrados en la regulación del modo de vida sésil.

El c-di-AMP es otro segundo mensajero que estaría involucrado en la formación de biopelículas. Niveles altos de este compuesto inducen la formación de las mismas en *Staphylococcus aureus* (Corrigan y col., 2011). En el genoma de arqueas se han encontrado genes de proteínas con dominio diadenil ciclasa, que sintetizarían c-di-AMP y sugieren la presencia de la molécula en arqueas (Orell y Giuliani, 2016).

Recientemente se compararon los proteomas de células sésiles versus planctónicas en tres especies de *Sulfolobus*: *S. tokodaii*, *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* (Koerdt y col., 2011). Se encontraron respuestas especie-específicas; y sólo algunas proteínas que variaban en las tres especies a la vez. Entre éstas se destaca un regulador transcripcional tipo Lrs14, cuyos niveles se encontraron aumentados en las tres especies (Koerdt y col., 2011). No se conocen los genes regulados por Lrs14.

En estudios posteriores en *S. acidocaldarius*, se encontraron seis homólogos de Lrs14, tres de los cuales influenciaban positiva o negativamente la formación de biopelículas y la movilidad del microorganismo (Orell y col., 2013b). Uno de estos homólogos, la proteína AbfR1 (Saci_0446), funcionaría como represor de la formación de biopelículas, ya que su delección favoreció la producción de EPS (Orell y col., 2013b). Mutantes de delección de esta proteína en

S. acidocaldarius poseían niveles disminuidos de la expresión de los genes del arqueolo (*fla*), y por tanto las mutantes no eran móviles, pero poseían niveles aumentados de expresión los genes *aap* (adherencia a superficies). Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* se comprobó la unión de la proteína AbfR1 a las regiones promotoras de los genes *fla* y el propio *abfR1* (Orell y col., 2013b). Además de eso, AbfR1 también está regulada por fosforilación. Se vio que su fosforilación inhibe su función de regulador negativo, permitiendo que las células formen biopelícula (Li y col., 2017).

Además de los reguladores transcripcionales Lrs14-like, existen otros niveles de regulación del cambio de estilo de vida, como la presencia de sRNA no codificantes, glicosilación del pili y del arqueolo, etc. (van Wolferen y col., 2018).

Biopelículas y respuesta a metales.

Las biopelículas ayudan en la resistencia a diversos tipos de estrés, entre ellos la presencia de metales pesados. Sin embargo, éstos pueden influir de diferente manera en la formación de biopelículas.

Las biopelículas actúan de dos maneras en la resistencia a metales. De manera pasiva, pueden atrapar metales, inmovilizándolos o incluso precipitándolos, ya que la mayoría de los componentes de la matriz extracelular de las biopelículas son de carácter aniónico (Koechler y col., 2015). Pero también actúan de manera que influyen los patrones de expresión génica y el metabolismo de las células que lo componen (Koechler y col., 2015).

En los microorganismos, los metales pueden o no inducir el estado de vida sésil. Hay casos en que las bacterias expuestas a metales responden promoviendo los procesos de adherencia, y aumentando la formación y mantención de las biopelículas. En otros, por el contrario, el cambio de células planctónicas a sésiles es prevenido por la presencia de metales, y para ser

un mecanismo de resistencia ante ellos, las biopelículas ya deben estar formadas al momento de ser expuestas al metal (Koechler y col., 2015). También, se ha descrito que la presencia de estrés genera cambios en la arquitectura de las biopelículas, como en el caso del euryarchaeon *Archaeoglobus fulgidus*, donde las biopelículas en presencia de NaCl están compuestas por cúmulos de células y material fibroso, mientras que un alto pH induce la formación de capas extensas de células (Laplagia y Hartzell, 1997). En *Bacillus subtilis*, cantidades mayores a la concentración mínima bactericida de Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} ocasionan que la estructura de la biopelícula sea más compacta, y por ende, más resistente a erosión (Koechler y col., 2015).

En el género *Sulfolobus*, no se ha estudiado la respuesta a metales en biopelículas. En estudios no publicados de nuestro laboratorio se ha analizado la respuesta de *S. solfataricus* a la presencia de 1 mM de Cu^{2+} , con células en estado planctónico. Se han realizado estudios de proteómica en los que se detectaron cambios en varias proteínas relacionadas con el metabolismo de azúcares y proteínas de respuesta a estrés oxidativo como las peroxirredoxinas. También se detectaron cambios en uno de los homólogos al gen que codifica para el regulador Lrs14 (SSO1101) (Soto, 2012). Esto nos sugiere que el Cu^{2+} podría influenciar (promoviendo o evitando) la formación de biopelículas en *S. solfataricus*, aunque se necesitan más estudios al respecto.

La capa S y la glicosilación de proteínas extra celulares

La capa S es una estructura que se encuentra en arqueas y que en algunos casos reemplaza a la pared celular, aunque en algunas especies coexisten.

En *Sulfolobus* spp., la capa S está compuesta por dos proteínas, la SlaB que es una proteína integral de membrana y que ancla esta capa a la membrana; y la SlaA, que se une a la SlaB

y se encuentra en el exterior de la célula cubriendo su superficie (Peyfoon y col., 2010). SlaA posee varios sitios de glicosilación.

La glicosilación de proteínas extracelulares en arqueas es de mucha importancia ya que, por ejemplo, la delección de una enzima involucrada en la glicosilación del arqueolo en *S. acidocaldarius* evita que esta estructura pueda ensamblarse de manera correcta (Meyer y col., 2013), causando defectos en la movilidad.

Varias otras proteínas extracelulares en *Sulfolobus* son glicosiladas, como el citocromo *b_{558/566}*, el arqueolo (Meyer y col., 2011) e incluso proteínas de unión a azúcares. También se ha observado que ante el estrés, algunas arqueas son capaces de modificar la glicosilación de la capa S; por ejemplo, *Haloferax volcanii* modifica estos patrones al crecer en presencia de altas concentraciones de NaCl (Guan y col., 2012), lo que probablemente le permita adaptarse a este desafío. No se ha estudiado si existen cambios en estos patrones de glicosilación en presencia de Cu u otros metales.

Los polifosfatos

Los PoliP son polímeros lineales de decenas a centenas de residuos de ortofosfato inorgánico (Pi) unidos por enlace fosfoanhídrido covalente de alta energía (Kornberg y col., 1999). Se encuentran en todo tipo de organismos: bacterias, plantas, hongos, protistas, animales y arqueas. En bacterias, se sintetizan principalmente por la enzima polifosfato quinasa (PPK) a partir de ATP en una reacción reversible, sin embargo, en Crenarchaeotas no se ha identificado aún una enzima con función similar. Tanto en bacterias como en Crenarchaeotas, la enzima responsable de su degradación es la exopolifosfatasa (PPX) (Cardona y col., 2002; Alvarez y Jerez, 2004; Orell y col., 2012; Wheaton y col., 2016).



Estos polímeros cumplen variadas funciones en las células: como reservorio de fosfato, sustituto de ATP en reacciones con quinasas, quelante de metales, o participando como reguladores de genes del sistema de respuesta global SOS ante distintos tipos de estrés (Kornberg y col., 1999). Más recientemente, se ha determinado que los PoliP podrían actuar como chaperonas inorgánicas de proteínas en *Escherichia coli* protegiéndolas del daño ocasionado por especies reactivas de oxígeno (Gray y col., 2014; Gray y Jakob, 2015). El papel de los PoliP como chaperonas no se ha reportado aún en arqueas.

La fig. 3 resume la participación de los PoliP en la resistencia a metales. Estos tendrían tres mecanismos por los cuales actuarían: 1) por su carácter aniónico quelarían metales directamente, evitando que ejerzan su toxicidad; 2) en presencia de metales, los polímeros se degradarían por la enzima PPX, generando Pi que a su vez se uniría a los metales actuando de contraión y juntos serían expulsados de la célula por un transportador de Pi en la membrana, donde estarían involucrados sistemas como PitA y análogos a Pho84 (Alvarez y Jerez, 2004; Orell y col., 2010; Orell y col., 2012; McCarthy y col., 2014; Rivero y col., 2018); y 3) actuando como reservorio de Pi para la síntesis de ATP, lo que ayudaría a la célula a sobreponerse al estrés (Orell y col., 2012). Además, la función de chaperona de proteínas recientemente descrita en *E. coli* (Gray y col., 2014; Gray y Jakob, 2015), podría estar relacionada con esta respuesta, evitando que se agreguen las proteínas por el daño ocasionado por la formación de radicales libres mediante la reacción de Fenton generada por el Cu (Cabiscol y col., 2000; Pham y col., 2013).

En los microorganismos se ha visto una correlación entre los niveles de los PoliP que poseen y su resistencia a metales. En arqueas por ejemplo, *S. metallicus*, que acumula PoliP, posee una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 200 mM de Cu²⁺. Por el contrario, *S. solfataricus*, que no acumula PoliP, tiene una CMI de entre 2-5 mM Cu²⁺. Cuando las células

acumuladoras de gránulos de PoliP se exponen a Cu^{2+} , se observa mediante microscopía electrónica la desaparición gradual de los gránulos y el rápido descenso en la concentración intracelular de PoliP a medida que aumenta la concentración de Cu^{2+} (Remonsellez y col., 2006; Orell y col., 2010). Este mismo comportamiento se había observado anteriormente en una bacteria con alta resistencia a Cu^{2+} que también acumula PoliP: *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Alvarez y Jerez, 2004).

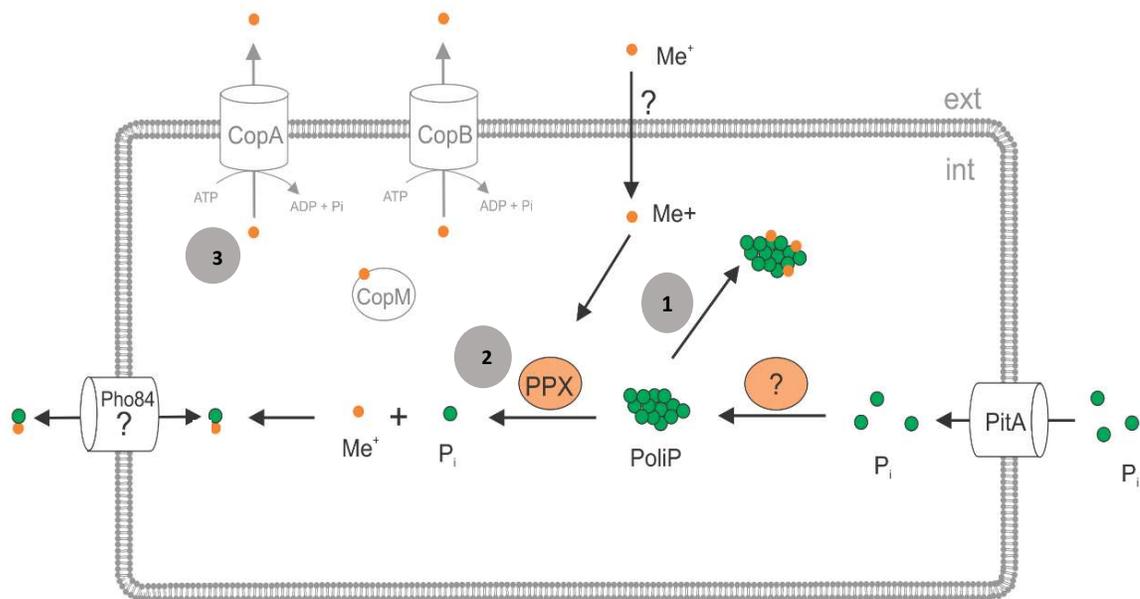


Figura 3. Posible papel de los PoliP y el sistema PitA/Pho84 en la resistencia a metales en arqueas.

En gris: El sistema *copMTA* posee una ATPasa transportadora de cobre, CopA, y una chaperona de unión a cobre, CopM (no se esquematiza el regulador transcripcional CopT). Adicionalmente, en *S. solfataricus* se encontró otro transportador CopB con función similar a CopA.

En colores: PitA facilitaría el transporte de fosfatos inorgánicos (Pi) al interior de la célula. La hidrólisis de PoliP por PPX aumenta en presencia de metales. Proteínas homólogas a Pho84 intervendrían en la expulsión hacia el exterior de los cationes metálicos unidos a Pi. Además, PoliP puede quelar metales directamente.

Esquema basado en trabajos previos: Remonsellez y col. (2006); Ettema y col. (2006); McCarty y col. (2014); Rivero y col. (2018).

Polifosfatos y biopelículas

Se ha descrito el rol de los PoliP no sólo en la formación de biopelículas, sino también en la movilidad celular, esporulación y virulencia de bacterias como *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Drozd y col., 2014; Rashid y col., 2000; Shi y col., 2004). En general se ha visto que la falta de PPK, la enzima que sintetiza PoliP, conlleva a que las cepas mutantes en dicho gen sean deficientes en los procesos mencionados. Las mutantes Δppk de *P. aeruginosa* son ineficientes en la adherencia a superficies y en la posterior maduración de la biopelícula, presentando menor virulencia en modelos murinos (Rashid y col., 2000). Todos estos defectos desaparecen al complementar la cepa con el gen *ppk*. Sin embargo, en *C. jejuni*, se ha visto lo contrario, que las mutantes Δppk forman más biopelículas que la WT (Drozd y col., 2014). En todos los organismos coincide que la arquitectura de la biopelícula es diferente al comparar las mutantes WT con las que carecen de PoliP.

En *E. coli*, se han estudiado mutantes Δppk y Δppx , y se ha relacionado la hidrólisis del polímero con la promoción de la formación de biopelículas, siendo esta hidrólisis necesaria para el inicio del proceso (Grillo-Puertas y col., 2012).

En arqueas no se ha estudiado la influencia de los PoliP en la formación de biopelículas. Para estudiar el papel de los PoliP en arqueas, en nuestro laboratorio se ha desarrollado una cepa de *S. solfataricus* M16, llamada M16-PPX, que es incapaz de acumular PoliP ya que sobreexpresa su propia proteína PPX, cuya síntesis es inducida por D-arabinosa (Soto y col., 2019).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a Cu^{2+} de la cepa M16-PPX es de 0,75 mM, mientras que a CMI de la cepa WT es de 2 mM. También se observó un aumento de la expresión transcripcional del gen *copA* del sistema *copTMA* de resistencia a Cu en M16-PPX

comparado con el observado en la cepa M16 en presencia del metal (Soto y col., 2019). Estos resultados sugieren que el PoliP participa en la resistencia a Cu en *S. solfataricus*.

Además, en nuestro laboratorio se han realizado estudios preliminares de proteómica en presencia y ausencia de Cu^{2+} en células planctónicas de las cepas M16 y M16-PPX (Soto y col., 2019). En estos resultados resalta principalmente que algunas de las enzimas de las vías centrales del metabolismo de azúcares cambian sus niveles, sugiriendo que ocurre una mayor síntesis de ATP y de poder reductor en la célula para responder al Cu^{2+} en ausencia de PoliP. Además se observó un aumento de los niveles de proteínas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo (Soto, tesis de Bioquímica, 2012). Tanto en la cepa M16 como en la M16-PPX en presencia de Cu^{2+} , se observó el aumento de la proteína codificada por el gen SSO1101 (homólogo a Lrs14 y relacionado a la formación de biopelículas).

En base a los antecedentes mencionados y continuando con el análisis de la cepa M16-PPX, se propone el estudio de la formación de biopelículas en arqueas, y cómo influyen la presencia de Cu^{2+} y la carencia de PoliP en los procesos de adherencia y síntesis de exopolisacáridos.

2. HIPÓTESIS

La adherencia a superficies y la síntesis de polisacáridos extracelulares durante la formación de biopelículas en *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius*, se ve afectada por la carencia de PoliP. La presencia de Cu^{2+} promueve la formación de biopelículas en *S. solfataricus*.

3. OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto global de la carencia de PoliP en la formación de biopelículas en *Sulfolobus solfataricus* y *Sulfolobus acidocaldarius*, y el efecto del Cu^{2+} sobre las biopelículas de *Sulfolobus solfataricus*.

Específicos

- 1) Estudiar el efecto de la ausencia de PoliP en la adherencia y formación de biopelículas en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*.
- 2) Estudiar el efecto del Cu^{2+} en la formación de biopelículas en *S. solfataricus*.
- 3) Analizar los cambios en el proteoma total y genes relacionados con la síntesis de exopolisacáridos y formación de biopelículas en ausencia de PoliP y/o presencia de Cu^{2+} en *S. solfataricus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas y medios de cultivo

4.1.1 Cepas y medios de cultivo de *Sulfolobus* spp.

Las cepas de *S. solfataricus* M16 y M16-PPX y *S. acidocaldarius* MW001 y MW001-PPX se crecieron a 75°C y con agitación orbital a 120 rpm, en medio Brock líquido ajustado a pH 3 con H₂SO₄ (1,3 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,28 g/l KH₂PO₄, 0,25 g/l MgCl₂ x 7 H₂O, 0,07 g/l CaCl₂ x 2 H₂O, 0,02 g/l FeCl₂ x 4 H₂O, 1,8 mg/l MnCl₂ x 4 H₂O, 4,5 mg/l Na₂B₄O₇ x 10 H₂O, 0,22 mg/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,06 mg/l CuCl₂ x 2 H₂O, 0,03 mg/l Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,03 mg/l VoSO₄ x 2 H₂O y 0,01 mg/l CoCl₂ x 6 H₂O), suplementado con 0,1 % (p/v) de N-Z amina (Fukla®) y con 0,2% (p/v) de glucosa, y, en el caso de la M16 y la MW001, con 0,01 mg/ml de uracilo.

Para la inducción de la expresión del gen *ppx* en las cepas M16-PPX y MW001-PPX se utilizó D-arabinosa 0,2% (p/v).

4.1.2 Cepas y medios de cultivo de *E. coli*

Se utilizaron dos cepas de *E. coli*, una para clonar plásmidos y otra para metilarlos. Para el clonamiento de los plásmidos se utilizó TOP-10 (Invitrogen). Para la metilación de los plásmidos se utilizó la cepa ER1821 (NEB) con el plásmido pM.EsaBC4I (NEB) resistente a kanamicina.

Ambas cepas se crecieron en medio Luria Bertani (Tryptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 5 g/L) con el antibiótico correspondiente. Para las placas sólidas se utilizó medio LB con agar al 1%.

4.2 Técnicas de biología molecular

4.2.1 Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico se procedió según indicación del fabricante utilizando el “kit” Genomic Wizard® (Promega). Se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} 0,3-0,6), que se recolectaron mediante centrifugación por 10 min a 4.000 x g. Se lavaron dos veces con Medio Brock basal, se resuspendieron suavemente en 600 μ L de la solución de lisis “Nuclei Lysis Solution” y se incubaron durante 5 min a 80°C para lisar las células. Tras enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 3 μ L de solución conteniendo ARNasa y se invirtió el tubo varias veces. Se incubó el lisado a 37°C durante 30 min y se enfrió a temperatura ambiente antes de agregar 200 μ L de la solución precipitante de proteínas y mezclar por vortex durante 20 s. La mezcla se incubó en hielo por 5 min y luego se centrifugó a 13.000 x g durante 3 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio que contenía 600 μ L de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 13.000 x g durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se lavó con etanol 70% una vez y se dejó evaporar los restos del alcohol durante 10 a 15 min. Finalmente, el ADN genómico obtenido se rehidrató durante toda la noche a 4°C en la solución de rehidratación contenida en el “kit”. El ADN se cuantificó por espectrofotometría y su integridad se observó en un gel de agarosa al 0,8%. El ADN se almacenó a -20°C.

4.2.2 Cuantificación de ADN

La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro multi volúmen Epoch (Biotek, EUA). Se utilizó una relación $1 \text{ DO}_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$. Para la pureza se aceptó una razón $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280} > 1,8$.

4.2.3 Extracción de ARN

Se utilizaron diversas condiciones para el crecimiento de las células para la extracción de ARN. Para las biopelículas, los cultivos se crecieron en placas de Petri 150/25 mm (NEST) por 2 días. Luego se filtró el sobrenadante para eliminar las células no adheridas y se continuó el crecimiento por 24 h más, tras lo cual se realizó la extracción de ARN. En el caso de los ensayos con Cu^{2+} , al cabo de 2 días también se filtraron las células no adheridas del sobrenadante y se añadió el CuSO_4 a las concentraciones necesarias, continuando el crecimiento por 1 o 24 h adicionales antes de realizar la extracción. La recolección de las células sésiles se realizó eliminando el sobrenadante y lavando las células adheridas dos veces con medio Brock basal pH 5. Luego se recolectaron las células en 5 mL de medio Brock basal con ayuda de un cell scraper.

En el caso de las células planctónicas, éstas se crecieron en medio Brock a 75°C sin agitación, por el mismo período de tiempo que las biopelículas,

Para la extracción se procedió como se había descrito anteriormente (Soto y col., 2019). Se pesaron 7 mg de peso húmedo de células, los que se resuspendieron en 60 μL de solución amortiguadora TEN (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl). Se agregaron 60 μL de solución de lisis (TEN, 1,6% Lauryl sarcosyl de sodio, 0,12% Triton X-100) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, tras lo cual, se agregó 1 mL de TRIzol a cada tubo y se incubaron por 5 min más. Se agregaron 200 μL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 30

s, para luego centrifugar a 12.700 x g por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa en tubos de 1,5 mL y se agregaron 250 µL de isopropanol y 250 µL de citrato de sodio 0,8 M. Tras incubar por 15 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron los tubos a 12.700 x g por 15 min a 4°C. Se realizaron dos lavados del precipitado con 500 µL de etanol 70% y se aireó la muestra por 15 min para permitir la evaporación completa del alcohol.

El ARN se resuspendió en 13 µL de agua libre de nucleasas, de los cuales se utilizaron 2 µL para cuantificar y 1 µL para analizar la integridad del ARN mediante electroforesis en un gel de agarosa. Los 10 µL restantes se trataron con “Turbo DNA-free” (Ambion®) según especificaciones del fabricante para eliminar el ADN remanente. Se utilizaron 10 µL de solución tampón 10X, 40 U (2 µL) de enzima DNAsa libre de RNAsa y 10 µL de ARN en un volumen final de 100 µL ajustado con agua tratada con Dietil pirocarbonato (DEPC). Se incubó la reacción por 1 h a 37°C, tras lo cual se agregaron 10 µL de “DNAsa inactivator” y se incubó por 15 min con agitación a temperatura ambiente. Tras una centrifugación a 10.000 x g por 5 min a temperatura ambiente, se recuperó la fase acuosa (aproximadamente 90 µL).

El ARN libre de ADN se precipitó agregando 400 µL de fenol/cloroformo ácido. Se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 13.000 x g. Se recuperó la fase acuosa y se realizaron 2 extracciones más con 400 µL de cloroformo, recuperando siempre la fase acuosa. Finalmente, se precipitó el ARN con 1:10 volúmenes de Acetato de sodio 3M pH 5,2 y 2-3 volúmenes de etanol 100%, incubando toda la noche a -20°C o a -80°C por 2 h. Luego se centrifugó a 13.000 x g por 30 minutos a 4°C y el precipitado se lavó 2 veces con 700 µL de etanol 70% y se secó a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos hasta evaporación total del alcohol. El ARN se resuspendió en 20 µL de agua DEPC.

La cuantificación del ARN se llevó a cabo dos veces: antes del tratamiento con DNAsa y tras la precipitación, empleando un espectrofotómetro multi volumen Epoch (Biotek, EUA). Se

utilizó la relación $1 \text{ DO}_{260} = 40 \mu\text{g ARN/mL}$ para cuantificar el ARN. La pureza del ARN se determinó mediante la razón $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$. Para la síntesis de cADN se utilizó solo ARN con $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ mayor a 1,8.

La integridad del ARN se determinó analizando las muestras por electroforesis en geles de agarosa al 1% por 15 a 20 min a 100 V. Esto se realizó antes y después del tratamiento con DNAsa.

4.2.4 Transcripción reversa

La transcripción reversa se llevó a cabo incubando 0,8 μg de ARN con 0,5 μg de “Random Primers” (Random hexamer primer, Invitrogen®) en un volumen final de 5 μL , ajustado con agua DEPC, durante 5 min a 70°C y luego 5 min en hielo. Luego, se agregaron 15 μL de una mezcla que contenía las siguientes concentraciones finales: amortiguador ImProm-II 1x (Promega®), dNTPs 0,5 mM cada uno, MgCl_2 3 mM y 1 U de transcriptasa reversa ImProm-II (Promega®). La reacción se llevó a cabo con 20 min de alineamiento a 25°C, una etapa de síntesis por 60 min a 42°C, seguida de la inactivación de la enzima a 70°C por 10 a 15 min.

4.2.5 PCR cuantitativo en tiempo real

Se realizó qPCR para analizar cambios en los niveles de transcripto de genes de interés. Se utilizaron dos genes de referencia: 16s y el 30s. Los partidores se diseñaron utilizando el software Primer3. Se realizaron reacciones de PCR de punto final y posterior análisis en geles de agarosa de los amplificadores para obtener la T_m y descartar la presencia de dímeros de partidores y amplificación inespecífica.

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el termociclador “96-well PikoReal-Time PCR System” (Thermo Scientific). Se utilizaron diluciones de cADN de 1:200 para los genes de referencia y 1:20 para los demás genes de estudio. La mezcla de reacción consistió en 0,5 μL

de la correspondiente dilución de cADN, 0,2 µL de cada partidor (10 µM) y 5 µL de KAPA SYBR® qPCR Master Mix (Sigma-Aldrich), en un volumen final de 10 µL ajustado con agua de grado molecular.

Para el cálculo de la expresión relativa, se utilizó la siguiente fórmula ΔCt (Pfaffl, 2001):

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(1 + E)^{\Delta Ct \text{ gen de estudio (condición control- condición experimental)}}}{(1 + E)^{\Delta Ct \text{ gen referencia (condición control- condición experimental)}}$$

La eficiencia de cada par de partidores se calculó en base a la pendiente de una curva de regresión lineal hecha con diluciones seriadas de 10 pg a 10 ng a partir de ADNg de *S. solfataricus*. Se aceptaron eficiencias entre el 90 y 110%. Los valores de Cq (Ciclo de Cuantificación) se calcularon de manera automática por el software del equipo.

4.2.6 Construcción de los plásmidos pSVA12800 y pSVA12801 para generar mutantes del metabolismo de PoliP en *S. acidocaldarius*

4.2.6.1 Construcción del plásmido pSVA12800 (plásmidos para generar mutantes “Knock-out” de *ppx*)

Se utilizó ADNg de *S. acidocaldarius* MW001 para amplificar las regiones río arriba y río abajo del gen *saci_2018* utilizando los partidores 10900 y 10901 para la primera región y 10902 y 10903 para la segunda (Anexo 2) mediante PCR convencional utilizando la enzima “Inhouse Pfusion” (Laboratorio Dra. Albers). Los partidores se diseñaron conteniendo sitios de corte para las enzimas de restricción *NcoI* (región río arriba) y *Apal* (región río abajo) en los extremos y una región de solapamiento para unir ambas regiones. Los productos de PCR sin purificar se utilizaron en una dilución 1:10 cada uno para realizar un PCR de solapamiento consistente

en un PCR sin partidores utilizando un programa de desnaturalización inicial a 98°C por 1 min, luego 6 ciclos con desnaturalización a 98°C por 15 s, alineamiento a 50°C por 20 s y amplificación a 72°C 30 s y finalmente una amplificación final a 72°C por 1 min. A continuación, se agregaron los partidores externos del fragmento (10900 y 10903) y se realizó un PCR convencional. La banda de aproximadamente 1200 Kb se purificó a partir de un gel de agarosa.

El fragmento, conteniendo las regiones río arriba y río abajo del gen blanco, y el plásmido pSVA431 se cortaron primeramente con la enzima *Apal* (NEB) por 30 min a 25°C y luego con *NcoI* (NEB) a a 37°C por 30 min en el buffer CutSmart (NEB). El plásmido se trató adicionalmente con la enzima CIT (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal, NEB) por 30 min a 37°C, para evitar que pueda ligarse consigo mismo. La inactivación de las enzimas se llevó a cabo a 80°C por 20 min.

El fragmento se purificó directamente y el plásmido se purificó a partir de un gel de agarosa utilizando en ambos casos el “FastGene Gel/PCR extraction kit” (Nippon Genetics Co., Alemania). La ligación se llevó a cabo por 1 hora a TA o bien ON a 4°C utilizando la ligasa T4 (NEB), según especificaciones del fabricante, y el plásmido y el fragmento en proporción 2:10 respectivamente. El producto de ligación se transformó en células *E. coli* TOP10 y se seleccionaron colonias en placas con ampicilina. Se seleccionaron colonias positivas realizando PCR de colonia con los partidores 10900 y 10903. Dos de estas colonias se secuenciaron en Eurofins Genomics (Alemania).

Tras comprobar la ausencia de mutaciones, el plásmido proveniente de uno de los clones fue metilado transformándolo en *E. coli* ER1821. El producto purificado se utilizó para transformar *S. acidocaldarius* MW001.

4.2.6.2 Construcción del plásmido pSVA12801 (plásmido para la sobreexpresión de *ppx*)

Se utilizó ADN_g de *S. acidocaldarius* MW001 para amplificar el gen *saci_2018* empleando los partidores 10904 y 10905 citados en el Anexo 2 mediante PCR convencional con la enzima “Inhouse Pfusion”. Los partidores se diseñaron conteniendo sitios de restricción para la enzima *SapI* en ambos extremos. El producto de PCR se purificó a partir de un gel de agarosa con el “FastGene Gel/PCR extraction kit” (Nippon Genetics Co., Alemania). Tanto el plásmido pSVAaraFX-H6 (pSVA1661) como el fragmento se cortaron con la enzima *SapI* por 30 min a 37°C. El plásmido se purificó a partir de gel y el fragmento de manera directa utilizando el “kit” antes mencionado. El plásmido y el fragmento purificados se ligaron por 2 h a TA o 4°C ON con la enzima T4 utilizando una proporción 2:10 de volumen de cada uno respectivamente en 20 µL finales de reacción. Posteriormente, el producto de ligación fue transformado en *E. coli* TOP10 y se seleccionaron colonias a partir de placas de LB ampicilina.

Se realizó PCR con los partidores 10904 y 10905 a partir de algunas colonias para confirmar la presencia del fragmento. Se seleccionaron 2 colonias que se crecieron en medio líquido LB/ampicilina para purificar el plásmido y luego se enviaron a secuenciar ambas hebras utilizando el servicio de Eurofins Genomics (Alemania).

Tras comprobar la ausencia de mutaciones, uno de los plásmidos fue metilado transformándolo en *E. coli* ER1821. El producto purificado fue utilizado para transformar células competentes de *S. acidocaldarius* MW001.

4.2.7 Generación de células competentes de *S. acidocaldarius*

Para generar células competentes se creció *S. acidocaldarius* a 75°C y 150 rpm en medio Brock suplementado con N-Z-amina, glucosa y uracilo, a partir de una solución stock

almacenada en glicerol a -80°C , hasta que alcanzó un crecimiento exponencial (DO_{600} 0,3-0,6). De este cultivo se tomó una alícuota para inocularla en medio Brock suplementado fresco, el cual se creció hasta alcanzar una DO_{600} entre 0,2 y 0,3. El cultivo se enfrió en hielo y las células se cosecharon por centrifugación a $2.500 \times g$ por 20 min. Se trabajó todo el tiempo con las células frías en hielo. Las células se lavaron 2-3 veces con 30 mL de sacarosa 20 mM fría. Luego, el pellet se resuspendió en 1 mL de sacarosa 20 mM, se transfirió a un tubo de 1,5 mL y se centrifugó por 5 min a $2.500 g$. Finalmente las células se resuspendieron a una DO teórica de 20 en sacarosa 20 mM y se almacenaron en alícuotas de 50 μL a -80°C .

4.2.8 Transformación de *S. acidocaldarius*

Para transformar *S. acidocaldarius*, se descongelaron las células competentes en hielo y se agregó 0,5-1 μL de plásmido (aproximadamente 1 μg de ADN plasmidial). Las células se transfirieron a cubetas de electroporación de 1 mm previamente enfriadas y se aplicó un pulso de 2000 V, 600 Ohm y 25 μF . Rápidamente las células se recuperaron en un tubo eppendorf de 1,5 mL con 400 μL de Solución de recuperación consistente en Medio Brock mineral sin ajustar pH (Brock I, II y III,) suplementado con 0,1% N-Z-amina, a 75°C y 300 rpm por 30 min. Luego las células se sembraron en placas de 1ra selección compuestas por 0,6% gelrite y medio Brock suplementadas con glucosa y N-Z-amina y se crecieron a 75°C en una cámara húmeda por 5-7 días.

Se seleccionaron colonias a partir de las placas y se crecieron en medio Brock suplementado con N-Z-amina y glucosa por 2-3 días, tras lo cual, en el caso del plásmido de expresión (pSVA12801), se probó si los clones expresaban la enzima PPX por Western Blot. En el caso de la cepa "knock-out" (pSVA12800), el cultivo líquido se volvió a sembrar, esta vez en una placa de 2da selección consistente en gelrite 0,6%, medio Brock suplementado con N-Z-amina y glucosa, uracilo y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOA (ácido 5-fluoroorótico, Invitrogen). Tras 5 días de

crecimiento en cámara húmeda a 75°C, se seleccionaron colonias para realizar PCR en colonia de la región cromosómica de interés.

4.3 Ensayos de biopelículas

4.3.1 Crecimiento de biopelículas en placas de poliestireno

Para el crecimiento de biopelículas se utilizaron dos tipos de placas de poliestireno estériles: de 96 pocillos y de 12 pocillos, ambas con fondo plano (SPL Life Science Co., Ltd., Korea), para los ensayos con cristal violeta y curvas de crecimiento. Para la obtención de biomasa para la extracción de ARN, proteínas y polifosfatos, se utilizaron placas de Petri de 150/25 mm estériles (NEST).

Para la placa de 96 pocillos se emplearon 250 µL de cultivo, para la de 12 pocillos 3,5 mL y para la placa de Petri, 100 mL. En todos los casos se partió de una DO_{600} inicial de 0,03 para *S. solfataricus* y 0,01 para *S. acidocaldarius* (Koerdt y col., 2010). Las placas se colocaron en una caja de metal (25 cm alto x 20 cm x 20 cm) con aproximadamente 500 mL de agua destilada en el fondo para mantener la humedad y minimizar la evaporación de los medios de cultivo. Además, las placas de 96 y 12 pocillos se recubrieron con una membrana permeable a gases (Breathe-Easy, Diversified, Biotech, Boston, EUA).

4.3.2 Eficiencia de formación de biopelículas. Ensayos con cristal violeta

Para estudiar la dinámica de formación de biopelículas se utilizaron placas de 96 pocillos.

Se incubaron las muestras a 75°C sin agitación y se realizaron mediciones a los 2 y 3 días. Se midió la DO_{600} del sobrenadante de cada pocillo, luego se agregaron 10 µL de una solución de cristal violeta al 0,5% y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Tras eliminar el sobrenadante, se lavó la placa con agua destilada, y se agregaron 200 µL de Ácido Acético al

30% para liberar el cristal violeta retenido por la biopelícula. Se midió la DO₅₇₀ del cristal violeta de cada pocillo. Para calcular la eficiencia de formación de las biopelículas, se calculó el índice entre DO₆₀₀ y DO₅₇₀.

4.4 Ensayos de adherencia a superficie de vidrio

Para los ensayos de adherencia se inocularon las cepas de *S. solfataricus* o *S. acidocaldarius* a una DO₆₀₀ inicial de 0,01 en 40 mL de medio Brock suplementado con N-Z-amina, Glucosa y Uracilo o D-arabinosa, de ser necesario, en un frasco schott conteniendo dentro una lámina estéril de vidrio. Se dejaron crecer las células por 24 h, tras lo cual se retiró la lámina y se lavó con medio Brock pH 5 para remover las células no adheridas. Las células adheridas se fijaron con Formaldehido 4% disuelto en medio Brock pH 5. La tinción de las células se realizó con 6 µL de DAPI (300 µg/mL) y los residuos de azúcar (α-manopiranosil y α-glucopiranosil) con 15 µL ConA (Concavalina A acoplada a fluoresceína, Invitrogen) (5 mg/mL) disueltos en 970 µL de medio Brock pH 5 por 30 min en la oscuridad. Tras esto se lavó el excedente con medio Brock pH 5, se secaron las láminas a temperatura ambiente, se retiraron las células de la cara posterior de la lámina con etanol 70% y se observó la lámina al microscopio con aumento 100X.

4.5 Microscopía de Epifluorescencia y Confocal Laser de biopelículas

Para los ensayos de microscopía se crecieron las células M16 y M16-PPX o MW001 y MW001-PPX en medio Brock suplementado con N-Z amina, Uracilo -en el caso de la M16 y MW001- y D-arabinosa para la inducción de la PPX (en M16-PPX y MW001) o Glu como

condición control. Adicionalmente, para los ensayos con Cu^{2+} se añadió 0,5 mM Cu^{2+} desde el inicio del experimento.

Las biopelículas se crecieron en placas de Petri de 35 mm de alto para microscopía (μ -Dishes; Ibidi, Martinsried). Las placas se colocaron dentro de placas de Petri mas grandes conteniendo agua en su interior para crear una cámara húmeda. El medio de cultivo se renovó cada 24 h. Al cabo de 3 días se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células adheridas con medio Brock pH 5. Luego se colocaron 2 mL del mismo medio de lavado y se añadieron 3,6 μL de una solución acuosa de DAPI (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 15 μL de ConA (5 mg/mL) y 8 μL de IB4 (1 mg/m) (isolectina GS-IB4 de *Griffonia simplicifolia* acoplada a Alexa 568; Invitrogen). Se incubó a TA por 30 min.

Para la microscopía de Epifluorescencia se utilizó el microscopio TIRF Observer 1 de ZEISS, con un objetivo de inmersión en aceite con aumento 100x. El DAPI se observó con una longitud de onda de excitación de 353 nm y 465 nm de emisión, y la fluoresceína con una longitud de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 509 nm. Las imágenes se procesaron con el software Fiji (ImageJ) (Schindelin y col, 2012).

Para la microscopía Confocal Laser se utilizó el microscopio Observer.Z1 de ZEISS y un objetivo de inmersión en aceite con aumento 63x. Para detectar DAPI se utilizó un láser de 488 nm y un filtro de detección de 410-484 nm, para detectar Alexa 568 se utilizó un láser de 543 nm y un filtro de 558-627 nm y para detectar fluoresceína se utilizó un láser de 488 nm y un rango de detección de 493-552 nm. Las imágenes se formaron mediante varios barridos (10 a 40 dependiendo del grosor total de la biopelícula) de 1 μm de grosor en diferentes planos del eje Z. Las imágenes fueron procesadas con el software ZEN 2012 SP1 Black edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania).

4.6 Ensayos de movilidad en placa semi sólida

Se utilizaron placas semi sólidas de gelrite 0,15% y medio Brock suplementado con N-Z-amina (0,001%), uracilo y/o D-arabinosa (0,2%) de ser necesario. Para inocular las placas, se crecieron las cepas de *S. solfataricus* o *S. acidocaldarius* hasta una DO_{600} de 0,5 y se inocularon gotas de 5 μ L en las placas. Se dejaron crecer los inóculos dentro de una cámara húmeda y se midieron los halos de nado formados tras 4 días en el caso de *S. acidocaldarius*, y luego de 4 y 9 días en el caso de *S. solfataricus*

4.7 Métodos de extracción y purificación de polifosfato (PoliP)

4.7.1 Extracción de PoliP

La extracción de PoliP se realizó como se describió anteriormente (Soto y col., 2019). Para extraer los polifosfatos se cultivaron las células en placas de Petri y en tiempos determinados, se recolectaron 5 mL de células del sobrenadante (células planctónicas) eliminándose el resto del sobrenadante. Las placas se lavaron dos veces con medio Brock basal pH 5 dos veces. Luego, se agregaron 5 mL de medio Brock y las células adheridas a la placa (células sésiles) se soltaron con un cell scraper. Posteriormente las células, tanto sésiles como planctónicas, se trataron de la misma manera: se lavaron 2 veces con medio Brock basal pH 5, resuspendieron en buffer de resuspensión (4 M GITC, 50 mM Tris-HCl pH 7,0) y lisaron por calentamiento a 95°C durante 3 min, tras lo cual se añadieron 30 μ L de SDS al 10% y se calentaron por 2 min más. Se utilizó un volumen de 10 μ L para determinar proteínas por el método de Bradford y al resto se le añadió etanol al 60% y perlas de sílice que adhieren los PoliP a su superficie. Se volvieron a calentar a 95°C por 3 min, se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Se lavaron las perlas con buffer "New Wash" (5 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM

NaCl, 5 mM EDTA, 50% Etanol), y luego se trataron por 30 min a 37°C con un buffer conteniendo nucleasas (50 mM TrisHCl pH 7, 5 mM MgCl₂, 5 µg/mL DNasa, 5 µg/mL RNasa). Las perlas se lavaron con buffer “New Wash” y finalmente los PoliP se liberaron en dos rondas agregando 50 µL de agua nanopura y calentando 2 min a 95°C.

4.7.2 Cuantificación de PoliP

La cuantificación se llevó a cabo con “EnzChek Phosphatase Assay kit”. Este método se basa en la hidrólisis ácida de los PoliP y posterior reacción del Pi liberado con el reactivo 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina ribosido (MESG), gracias a la acción de la enzima Purin Nucleósido Fosforilasa, para dar 2-amino-6-mercapto-7-metilpurina, cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 360 nm. La cantidad de PoliP obtenida se normaliza por la cantidad de proteínas.

4.8 Métodos para el análisis de proteínas

4.8.1 Preparación de extractos proteicos totales

Se prepararon extractos de proteínas de *S. solfataricus* en biopelícula y estado planctónico. Para ello, se crecieron las cepas M16 y M16-PPX, en el caso de las células planctónicas, en matraces de 250 mL. En el caso de las células sésiles, las cepas se crecieron en placas de Petri, donde el medio de cultivo se filtró al día 2 para eliminar las células planctónicas y favorecer el crecimiento de la masa de células ya adheridas. En ambos casos, se incubaron las células a 75°C, sin agitación, durante 72 h en medio Brock líquido con N-Z-amina y Glucosa como suplementos, en presencia de D-Arabinosa (0,2%), y uracilo (0,01 mg/mL) en el caso de la M16.

Las células sésiles se obtuvieron eliminando el sobrenadante y lavando las células adheridas dos veces con medio Brock basal pH 5, y soltando las mismas con ayuda de un cell scraper y 10 mL de medio Brock.

Para la proteómica con Cu^{2+} , a las células sésiles se realizó el mismo tratamiento de eliminar las células del sobrenadante a los dos días, y luego se añadió 0,5 mM Cu^{2+} al medio. Para las células planctónicas, se crecieron en las mismas condiciones sin agitación y al cabo de 72 h se añadió 0,5 mM Cu^{2+} . En ambos casos se expusieron las células al metal por 1 h antes de recolectarlas por centrifugación.

Las células planctónicas y sésiles se centrifugaron a 7.700 x g a 4°C durante 15 min y se lavaron dos veces con medio Brock. Los sedimentos se resuspendieron en solución amortiguadora de sonicación (50 mM Tris-HCl pH 8,15, 1 mM EDTA y 100 µg/mg PMSF), a razón de 10 µL de amortiguador por 1 mg peso húmedo de células.

La lisis se realizó por sonicación en hielo con el sonicador "Ultrasonic Liquid Processor, SONICATOR®". Se utilizaron 9 ciclos de 20 seg de sonicación y 30 seg de detención. Luego, las suspensiones se centrifugaron a 9.800 x g por 5 min para eliminar restos celulares y células sin romper. Se recuperó el sobrenadante y se realizó la cuantificación de las proteínas.

Se tomaron 150 µg de proteína por muestra, los que se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y luego se liofilizaron por 48 h a -40°C. Posteriormente se almacenaron a -80°C hasta ser despachadas para el análisis por iTRAQ.

4.8.2 Cuantificación de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, utilizando el reactivo BCA (Pierce®) midiendo la absorbancia a 595 nm usando una curva estándar de seroalbúmina bovina.

4.8.3 Análisis de proteínas por iTRAQ

Los análisis de proteómica cuantitativa mediante iTRAQ (Isobaric tags for relative and absolute quantification) se realizaron en colaboración con el Dr. Alberto Paradela (Laboratorio de Proteómica, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España).

Se realizaron dos experimentos de proteómica: uno correspondiente a las condiciones: M16 sésiles, M16 planctónicas, M16-PPX sésiles y M16-PPX planctónicas (sección 5.3); y otro correspondiente a las condiciones: M16 planctónicas sin Cu, M16 planctónicas expuestas a 0,5 mM Cu²⁺, M16 sésiles expuestas a 0,5 mM Cu²⁺, y M16-PPX planctónicas expuestas 0,5 mM Cu²⁺

Brevemente, se precipitaron 50 µg de cada muestra por el método del fenol/cloroformo, se digirieron y se marcaron con el reactivo iTRAQ-8-plex® (AB SCIEX, Foster City, EUA). Finalmente, las muestras se combinaron antes de ser inyectadas en el equipo.

Las muestras se analizaron con un sistema de cromatografía nano líquida en el equipo 2D-nano LC ESI-MSMS 2 (Eksigent Technologies nano LC Ultra 1D plus, AB SCIEX) acoplado a un espectrofotómetro de masa de alta velocidad con Cuadrupolo Triple TOF 5600 (SCIEX, Foster City, EUA) con fuente tipo Nanospray. Los espectros de masas se analizaron usando OMSSA 2.1.9, X!TANDEM 2013.02.01.1, Myrimatch 2.2.140 y MS-GF+ (Beta v10072), utilizando una base de datos construida a partir de los datos de proteínas de *S. solfataricus* P2 disponibles en UniProt. El intervalo de confidencialidad para la identificación de proteínas fue de un valor $\geq 95\%$ y sólo los péptidos con un ion score sobre el 1% de rango de falso descubrimiento (FDR) se consideraron correctamente identificados. Los análisis de expresión diferencial se hicieron con el software Proteobotics (Madrid, España).

4.8.4 Electroforesis en mini geles de poliacrilamida-SDS

Para corroborar la presencia de proteínas, además de la cuantificación por el método de Bradford, se realizaron electroforesis en mini geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

Para ello, se calentó la muestra de proteínas con amortiguador de carga 4X (Tris-HCl 0,250 M pH 6,8, SDS 8%, Glicerol 40%, β mercapto etanol 20%, Azul de bromofenol 0,1%) durante 5 min a 95°C. Posteriormente se centrifugó la muestra a máxima velocidad para eliminar las proteínas no disueltas.

El gel de SDS-PAGE se preparó al 12,5%. Se sembraron aproximadamente 10 μ g de proteína de cada muestra. La electroforesis se desarrolló a 75 V por 1 h y luego a 200 V hasta que el frente de corrida llegó a la parte inferior del gel. Posteriormente se realizó la fijación de las muestras por 20 min con una solución conteniendo 40% de etanol y 10% de ácido acético. Luego de lavar con agua destilada, se tiñó el gel durante toda la noche con una solución de Azul de Comassie G-250 (0,1% azul de Comassie G-250, metanol 34%, ácido acético 0,5% y Sulfato de amonio 17%). Al día siguiente, se aclaró con agua destilada.

4.8.5 Detección de la cola de histidina de la PPX por Western blot

Para la detección de la cola de histidina de la PPX recombinante, se crecieron las células de *S. acidocaldarius* MW001 y MW001-PPX hasta una DO_{600} de 0,4-0,6. Luego se realizó la inducción con D-arabinosa durante 1,5 y 4 h, tras lo cual se centrifugaron 5 mL de cultivo por 15 min a 4°C y 4500 x g. El pellet celular se resuspendió en buffer PBS 1X hasta una DO teórica de 5, luego se agregó solución amortiguadora de carga de proteínas, se hirvieron las muestras por 5 minutos a 100°C y se centrifugaron brevemente. Se utilizaron 10 μ L para aplicar en un gel de poliacrilamida al 12,5%. La electroforesis se corrió a 75 V por 1 h y luego a 200 V hasta que el frente de corrida llegó a la parte inferior del gel. Luego se removió el gel y se

transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa utilizando buffer de transferencia (50 mM Tris, 40 mM glicina, etanol 20%) y el equipo Trans-blot® Turbo™ Transfer System de Bio Rad (Hercules, California) utilizando 25 V y 1A por 25 min.

Luego la membrana se bloqueó por 2 horas con 0,2% I-Block™ (Invitrogen™) disuelto en PBS-T (580 mM Na₂HPO₄, 170 mM NaH₂PO₄, 680 mM NaCl, pH 7,3, Tween-20 0,1%). Luego se lavó con PBS (580 mM Na₂HPO₄, 170 mM NaH₂PO₄, 680 mM NaCl, pH 7,3) dos veces antes de colocar el anticuerpo anti-His disuelto en PBS. La membrana con el anticuerpo primario se incubaron durante 24 h a 4°C. Luego se lavó la membrana dos a tres veces con PBS y se expuso a un anticuerpo secundario anti conejo unido a HRP (Peroxidasa de rábano) disuelto en PBS. El revelado se realizó por quimioluminiscencia con el reactivo Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad). La detección y documentación se realizó con el equipo iBright Western Blot Imaging Systems (Invitrogen™).

4.9 Concentración Mínima Inhibitoria de Cobre (CMI)

Para ensayar la CMI en las cepas MW001 y MW001-PPX en *S. acidocaldarius*, se utilizaron placas de 24 pocillos donde se inocularon las cepas a una DO₆₀₀ inicial de 0,01 en medio Brock suplementado con N-Z-amina, glucosa y uracilo o D-arabinosa, de ser necesario. Además, se agregó Sulfato de cobre (II) a distintas concentraciones: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 y 0,7 mM Cu²⁺. Las placas se cubrieron con una membrana especial (Breathe-Easy, Diversified, Biotech, Boston, EUA) para evitar la evaporación del medio y se incubó durante 50 h, tiempo en el cual la condición control debiera alcanzar el crecimiento máximo. Se realizaron 2 réplicas biológicas y 3 réplicas técnicas.

4.10 Determinación de ATP, ADP y razón ADP/ATP

Se determinó la razón ADP/ATP mediante el “ADP/ATP Ratio Assay Kit” (Sigma-Aldrich), utilizando las instrucciones proveídas por el fabricante. Brevemente, se tomaron 10 μ L de cada cultivo en fase exponencial de crecimiento en el caso de células planctónicas y se colocaron en una placa negra de fondo claro de 96 pocillos. A cada muestra se le agregaron 90 μ L de una mezcla preparada agregando buffer de ensayo, sustrato, cosustrato y enzima ATP en proporción 95:1:1:1 respectivamente. La reacción se incubó por 1 min a TA tras lo cual se leyó la luminiscencia generada (RLU_A) en el lector de placas Sinergy H1 BioTek (Agilent, EUA), por gentileza del Dr. José Manuel Perez de la Universidad Andrés Bello.

Para la determinación de ADP, se incubaron las muestras por 10 min adicionales, tras lo cual se leyó la luminiscencia residual (RLU_B). Luego se agregaron 5 μ L de una mezcla conteniendo agua y enzima ADP en proporción 5:1, se incubó la reacción por 1 min y se leyó la luminiscencia (RLU_C).

La razón ADP/ATP se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ADP/ATP ratio} = \frac{RLU_C - RLU_B}{RLU_A}$$

Para calcular la cantidad de ATP y ADP, se midió la cantidad de proteína en las muestras mediante el método de Bradford antes descrito. Los valores de luminiscencia se dividieron por la cantidad de proteína contenida en los 10 μ L de muestra. Las cantidades de ATP y ADP se expresaron en UL/mg proteína.

4.11 Análisis bioinformáticos y estadísticos

Para el análisis de categorías funcionales y los ortólogos de las proteínas obtenidas en los análisis iTRAQ se utilizaron la base de datos UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>), EggNOG (<http://eggnogdb.embl.de>) y KEGG Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>). Este último también se utilizó para la reconstrucción de las vías metabólicas. Los gráficos de vías metabólicas fueron hechos en Adobe® Illustrator CC (Adobe, 2018).

Para los análisis de enriquecimiento de vías metabólicas y funciones se utilizó Panther Classification System (<http://pantherdb.org/>). Para los diagramas de Venn de las proteómicas se utilizó la herramienta GeneVenn (<http://mcbc.usm.edu/genevenn/>).

Para el análisis de alineamiento de proteínas se utilizó el programa BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los gráficos y análisis estadísticos de la expresión de genes y formación de biopelículas se hicieron en GraphPad Prims 6 (GraphPad Prims Software, Inc).

Las tablas y los gráficos circulares (“de torta”) se realizaron en Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018).

5. RESULTADOS

a. Efecto de la ausencia de PoliP en la formación de biopelículas por *S. solfataricus*.

Para los ensayos con *S. solfataricus* se utilizaron las cepas M16 y M16-PPX descritas anteriormente (Soto y col., 2019). Primeramente, se procedió a medir los niveles de PoliP en *S. solfataricus* M16-PPX tras 3 horas de inducción con D-Ara para confirmar la ausencia de PoliP en esta cepa. En la fig. S1 del Anexo 1 se observa que en estas condiciones los niveles del polímero son indetectables por la metodología utilizada. Una vez confirmada la identidad de la cepa, se procedió a realizar los experimentos descritos a continuación.

5.1.1 Ensayo de la formación de biopelículas en *S. solfataricus*

Para estudiar la formación de biopelículas por las cepas WT y PoliP (-) de *S. solfataricus*, se utilizaron placas de poliestireno de 12 o 96 pocillos, según la metodología empleada por Koerdt y colaboradores (Koerdt y col., 2010). Se crecieron las biopelículas por 2 o 3 días, al cabo de los cuales se midieron los distintos parámetros de formación de biopelícula como se explica en la sección “Materiales y métodos”.

En la fig. 4 se observa la medición de la DO_{600} del sobrenadante de los pocillos que corresponde a la fracción de células planctónicas (fig. 4A), la DO_{570} del cristal violeta adherido a la biopelícula (fig. 4B) y el índice de ambas mediciones (fig. 4C) para las biopelículas formadas por las cepas M16 y M16-PPX en presencia de Glu, donde los niveles de PoliP se mantienen, o por la cepa M16-PPX inducida con D-Ara, donde hay ausencia de PoliP.

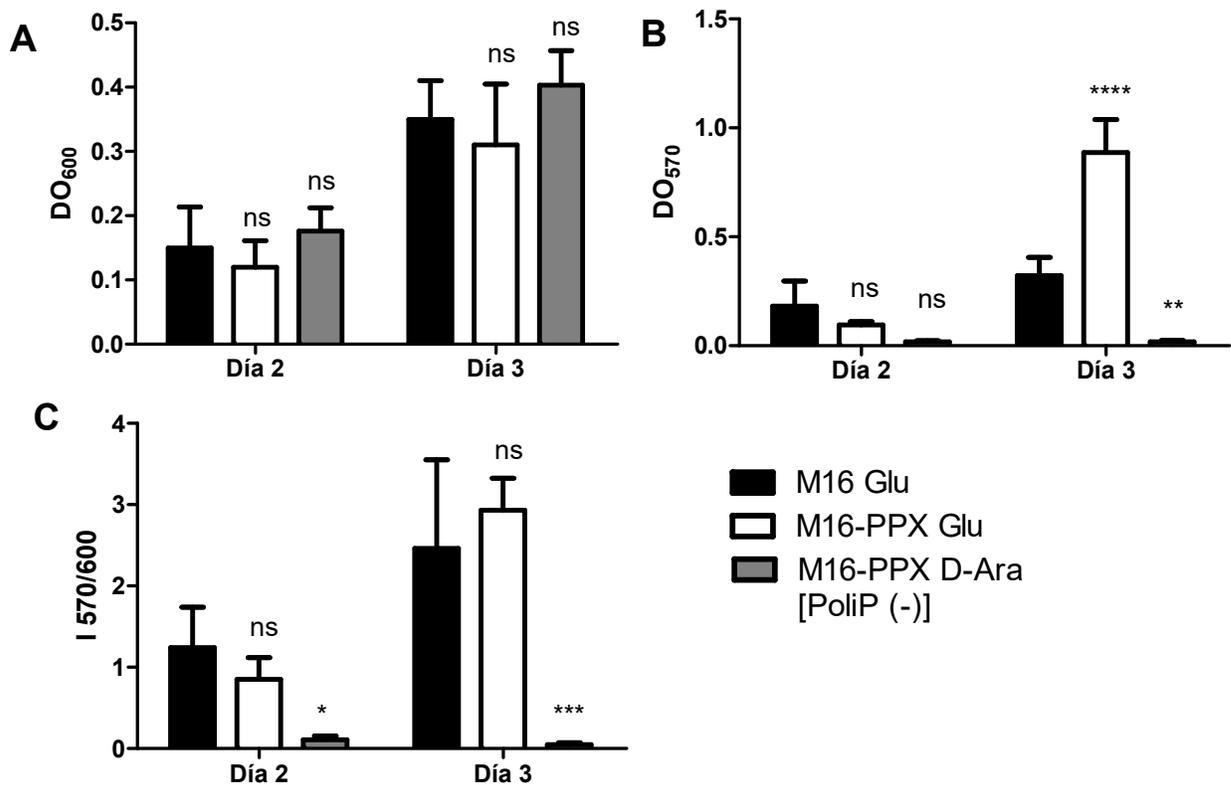


Figura 4. Parámetros de formación de biopelículas en *S. solfataricus* M16 y M16-PPX frente a distintos inductores a los 2 y 3 días. A. Crecimiento de células planctónicas (DO_{600}) **B.** Formación de biopelículas mediante tinción con cristal violeta (DO_{570}) **C.** Índice $DO_{570/600}$. Análisis estadístico ANOVA de doble vía, en donde **** indica $p \leq 0,0001$, *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ y * $p \leq 0,05$.

Como se puede observar, el crecimiento de las células planctónicas es muy similar al comparar todas las condiciones (fig. 4A) por lo que la diferencia no se debería a defectos en el crecimiento de la mutante, lo que también se evidencia en las curvas de crecimiento publicadas anteriormente (Soto y col., 2019) donde no hay una diferencia en el crecimiento entre ambas cepas. Sin embargo, al comparar las absorbancias del cristal violeta (fig. 4B), se observa que las células que no contienen PoliP generan mucha menos masa de biopelícula que aquellas que poseen niveles normales del polímero (fig. 4B). Al observar el Índice 570/600 se nota una clara diferencia entre la formación de biopelículas en las células que carecen de

PoliP y aquellas con niveles normales del polímero, formando las primeras mucha menor cantidad de biopelícula (fig. 4C).

5.1.3 Microscopía de epifluorescencia de biopelículas de *S. solfataricus*

Las biopelículas se crecieron en placas de poliestireno especiales para microscopía que cuentan con una laminilla en el fondo. Se filtró el medio sobrenadante cada 24 h, y tras 3 días de crecimiento se realizó la tinción con DAPI (para detectar ADN) y ConA (para detectar algunos de los exopolisacáridos externos de la célula, específicamente aquellos con residuos α -manopiranosilo y glucopiranosilo). Se observó al microscopio y se tomaron fotografías de 6 campos por replica.

En la fig. 5 se observan imágenes representativas de cada condición. Como puede verse, en las condiciones M16 + Glu (fig. 5A) y M16-PPX + Glu (fig. 5B), correspondientes a células con cantidades normales de PoliP, no se observan diferencias en la cantidad de células a simple vista. En cambio, la condición M16-PPX + D-Ara (fig. 5C), donde se induce la cepa M16-PPX con D-Ara y por tanto carece de PoliP, es la que presenta la menor cantidad de células adheridas a la superficie. Esto concuerda con nuestros resultados anteriores de tinción con cristal violeta (fig. 4).

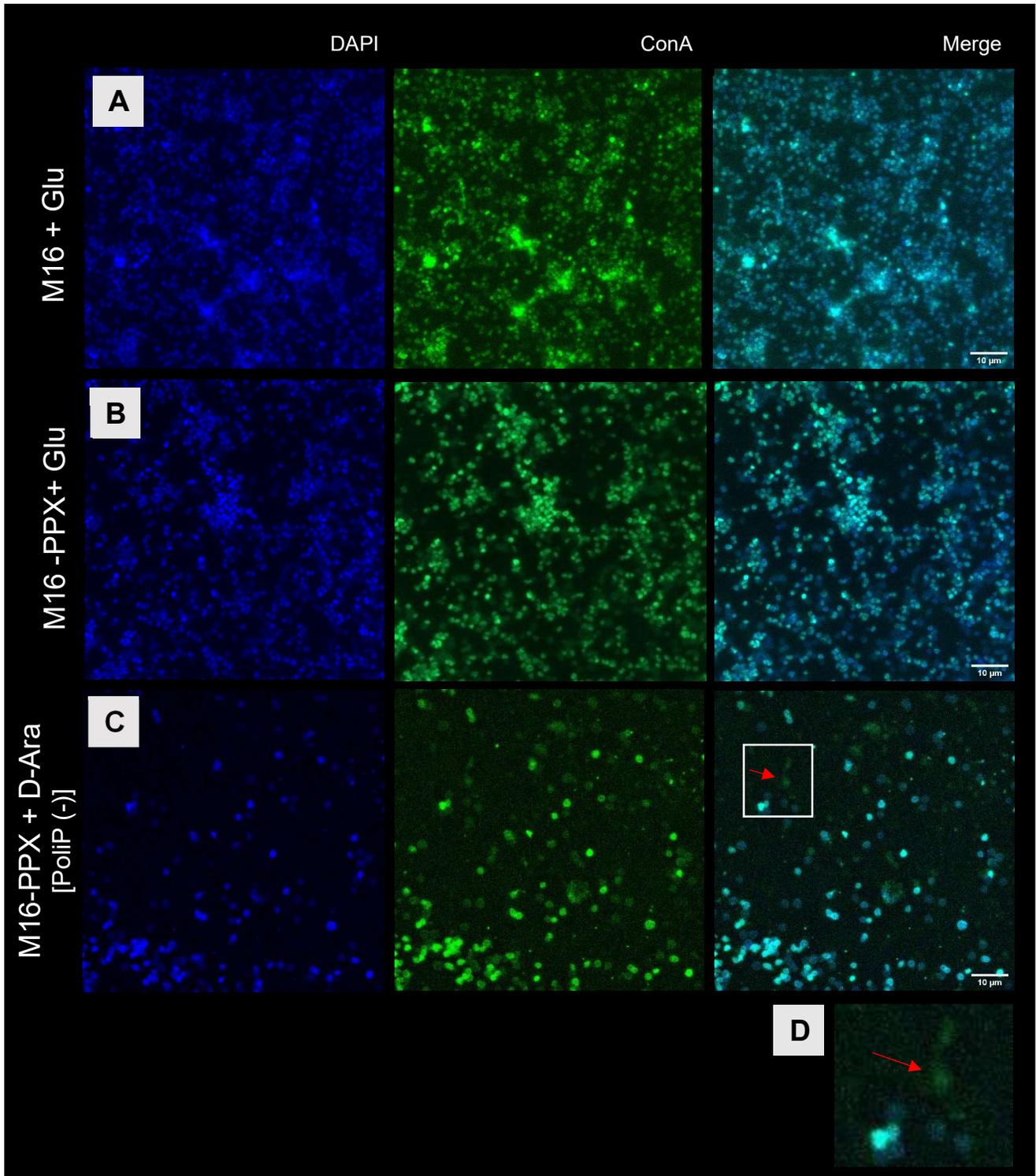


Figura 5. Microscopía de epifluorescencia de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16 y M16-PPX teñidas con ConA y DAPI. Aumento 100x. A. M16 inducida con Glu, **B.** M16-PPX inducida con Glu **C.** M16-PPX inducida con D-ara [PoliP (-)]. **D.** Ampliación de la región de la fig. 6C enmarcada en un cuadrado blanco. La flecha roja indica lo que sería una “huella de azúcar” donde se encontraba adherida una célula anteriormente.

Además, también podemos observar que la cantidad de azúcares (manosa y glucosa extracelular, indicada por la ConA) es menor, como consecuencia directa, quizás, de la poca cantidad de células. La ConA se une no solo a los azúcares excretados para formar la matriz de las biopelículas, sino también a los residuos de azúcar de las proteínas glicosiladas en la superficie celular como aquellas de la capa S, el arqueo o los pilis (Koerdt y col., 2010; Meyer y Albers, 2013). Por este motivo la señal de DAPI y ConA se superponen en las imágenes.

En la fig. 5C y ampliada en 5D se observan, además, unas “huellas” de ConA que corresponderían a lugares donde habían estado células que se desprendieron de la biopelícula, y que han sido descritas anteriormente para biopelículas de arqueas (Zhang y col., 2019).

En la fig. 6 se presenta la cuantificación del promedio de la señal del DAPI y ConA (fig. 6A) de las fotografías para cada condición, además del índice entre ambas señales (fig. 6B). Para realizar los cálculos se utilizó el programa ImageJ, donde se realizó la sustracción de fondo y se midió el promedio de la intensidad de señal de las imágenes en 8-bits.

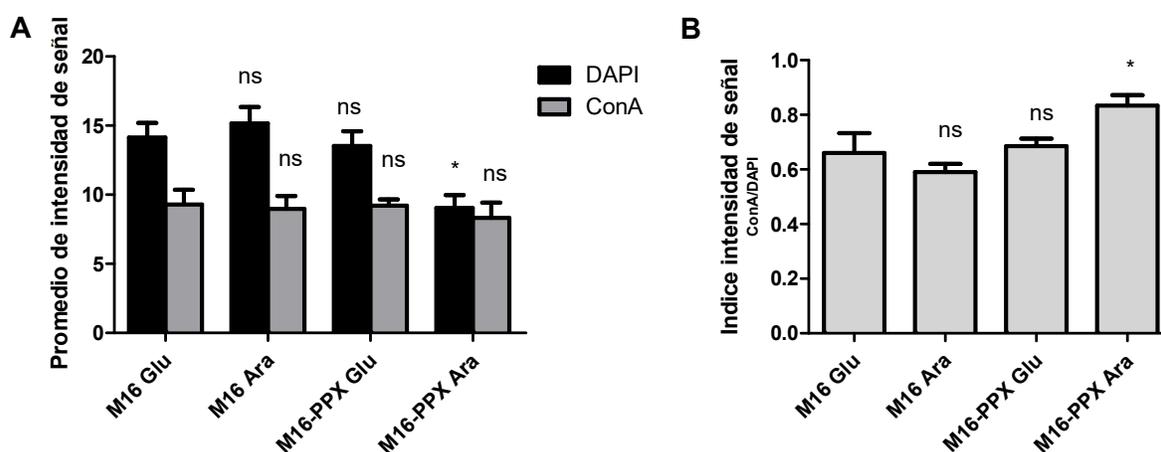


Figura 6. Promedio de la intensidad de señal de cada imagen obtenida por microscopía de epifluorescencia de las biopelículas de *S. solfataricus*. n= 4. A. DAPI y ConA, B. Índice de las intensidades obtenidas en DAPI /ConA.

Análisis estadístico ANOVA de una vía en el cual se comparan todas las columnas contra el control (M16 Glu), en donde * indica $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

En la señal de DAPI (fig. 6A, barras negras) se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la condición M16 inducida con Glu (WT) y la condición M16-PPX inducida con D-Ara [PoliP (-)]. En esta última, el promedio de señal es más bajo. En las demás condiciones, donde los niveles de PoliP son iguales a la condición control, no existen diferencias significativas.

Al observar el promedio de intensidad de ConA (fig. 6A, barras grises), que refleja la cantidad de exopolisacáridos, se observa que la señal de ConA en la cepa PoliP (-) es levemente menor que las demás, pero no lo suficiente para ser significativa estadísticamente. Al comparar los índices entre las intensidades de ConA y DAPI (fig. 6B), por tanto, se observa que el índice que corresponde a la condición PoliP (-) es mayor que los demás, esto debido a la presencia de menor cantidad de células adheridas (señal DAPI) y una cantidad similar de azúcares (señal de ConA). Esto último probablemente se deba a la presencia de las huellas de azúcar mencionadas anteriormente.

También se realizaron ensayos con la cepa M16 en presencia de D-Ara, las imágenes se encuentran en la fig. S2 del Anexo 3. En esta condición, la cepa M16 mostró un comportamiento similar a aquel en presencia de Glu, lo que se observa en la señal de DAPI y ConA y la razón entre ambas (fig. 6A y B).

5.1.4 Microscopía Confocal Laser de biopelículas de *S. solfataricus*

Para determinar diferencias en la morfología, se estudiaron biopelículas de 3 días de las cepas WT y PoliP (-) de *S. solfataricus* mediante tinción con DAPI y lectinas, y Microscopía Confocal Laser (MCL). Se utilizaron IB4-Alexa568, específica contra residuos α -D-galactosilo, y ConA-fluoresceína, contra residuos α -manopiranosilo y α -glucopiranosilo, para marcar los azúcares secretados por las células. Las biopelículas se prepararon de la misma manera que

para la microscopía de epifluorescencia, filtrando el medio de cultivo cada 24 h. Se tomaron 6 fotografías de cada una de las 3 réplicas biológicas realizadas por cepa. En la fig. 7 se muestran imágenes representativas de cada condición. Las imágenes de las réplicas biológicas se pueden encontrar en las fig. S4 y S5 del Anexo 4.

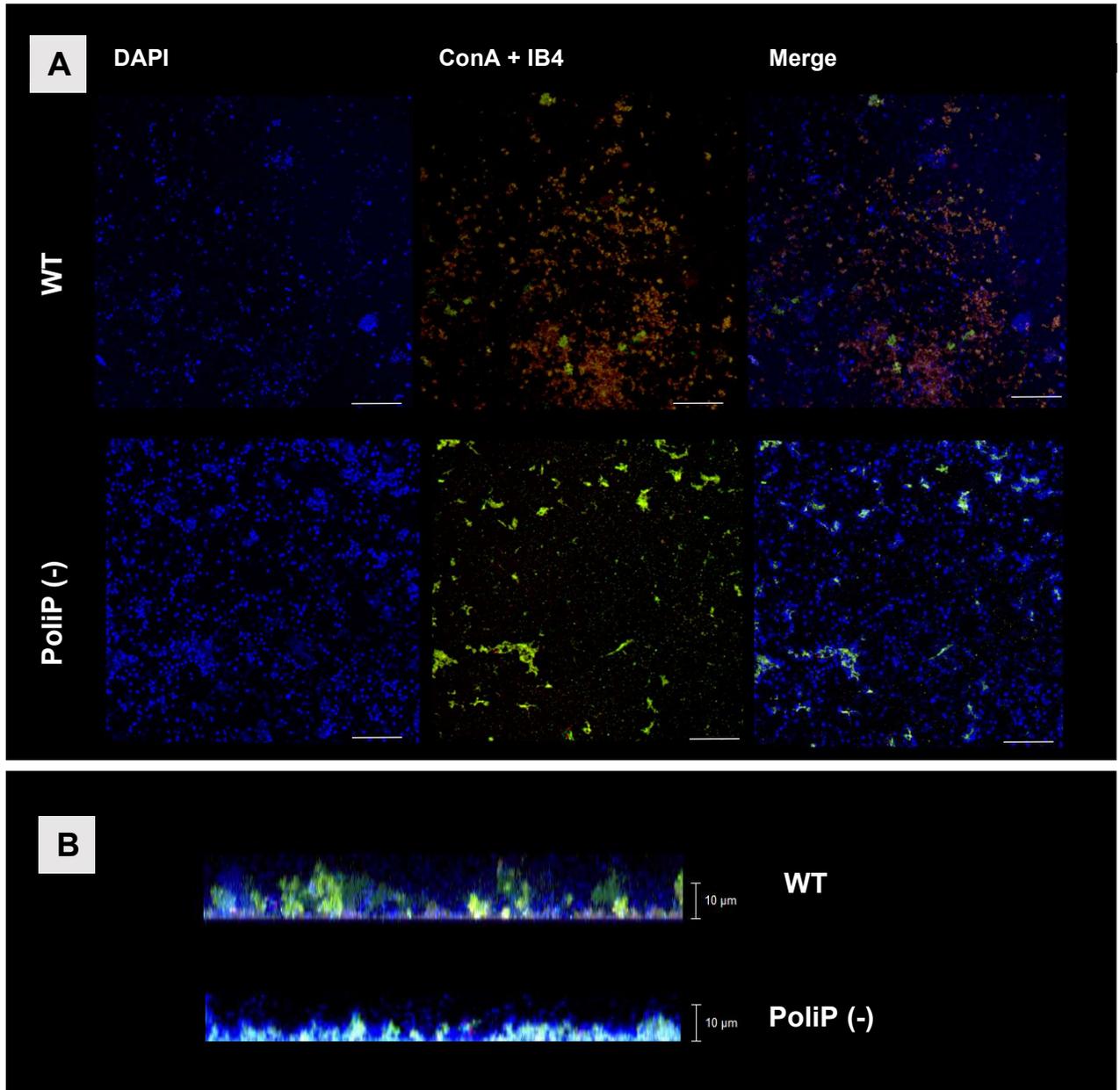


Figura 7. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de *S. solfataricus* WT y PolIP (-) teñidas con DAPI, ConA e IB4. Aumento 63x A. Vista superior en los canales DAPI y merge ConA/IB4 y merge de todos los canales. B. Vista lateral del merge de todos los canales. Las barras indican 10 µm.

Todas las imágenes son reconstrucciones de imágenes tomadas en varios planos del eje Z. En la fig. 7A se aprecia una vista superior de las biopelículas (plano XY), donde en la tinción con DAPI se nota una aparente menor cantidad de células en la biopelícula de la cepa WT comparada con la PoliP (-), así como menor cantidad de azúcares en la imagen ConA/IB4.

Como se puede notar en la fig. 7B, que corresponde al eje Z, la biopelícula generada por la cepa PoliP (-) es más delgada que la generada por la cepa WT: 8 μm versus 13 μm aproximadamente. La biopelícula de la cepa PoliP (-) posee menos células que sobresalen de la biopelícula “principal”. Además, se notan menos cúmulos de azúcares y una mayor densidad de células en la parte inferior.

Una posible explicación de la mayor intensidad de señal en el canal de ConA en PoliP (-) en la fig. 7A, podría ser la cantidad de cúmulos de azúcares y la estructura tridimensional observada en la imagen del eje Z correspondiente a la cepa WT (fig. 7B.). Esta estructura impediría que la tinción acceda a las células y a los residuos de azúcar en la cepa WT con la misma facilidad con que lo hace en la cepa PoliP (-), donde la biopelícula es más delgada y por tanto, más accesible. Además, los residuos de galactosilo son más abundantes en la cepa WT, por lo cual la señal de IB4 colocaliza con la señal de ConA en ciertas zonas (manchas naranjas), y la señal de esta última queda enmascarada, algo que no ocurre en la cepa PoliP (-) donde la señal de IB4 es infima.

5.1.5 Ensayos de adherencia de *S. solfataricus* a superficie de vidrio

La adherencia es uno de los pasos iniciales para la formación de biopelículas, y en *S. solfataricus* depende del arqueolo (van Wolferen y col., 2018; Zolghadr y col., 2010). Dados los resultados de las microscopías de biopelículas (figs. 6 y 7), se ensayó la adherencia a vidrio de *S. solfataricus* cuando carece de PoliP (fig. 8).

Para este ensayo se insertó una lámina de vidrio en un cultivo con agitación y se crecieron las células por 24 h. Luego, las células adheridas se fijaron con formaldehído al 4% y se realizó una tinción con DAPI y ConA. Las láminas se observaron en un microscopio de epifluorescencia y el número de células por imagen se determinó con el plug-in MicrobeJ de ImageJ.

En la fig. 8 se observan imágenes representativas de las condiciones WT (Fig. 8A), donde se ve una mayor cantidad de células, y PoliP (-) (Fig. 8B) donde se aprecian menos células adheridas. En la fig. 8C se grafica el promedio del número de células por imagen.

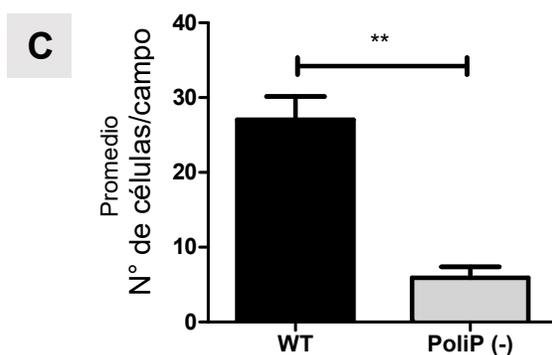
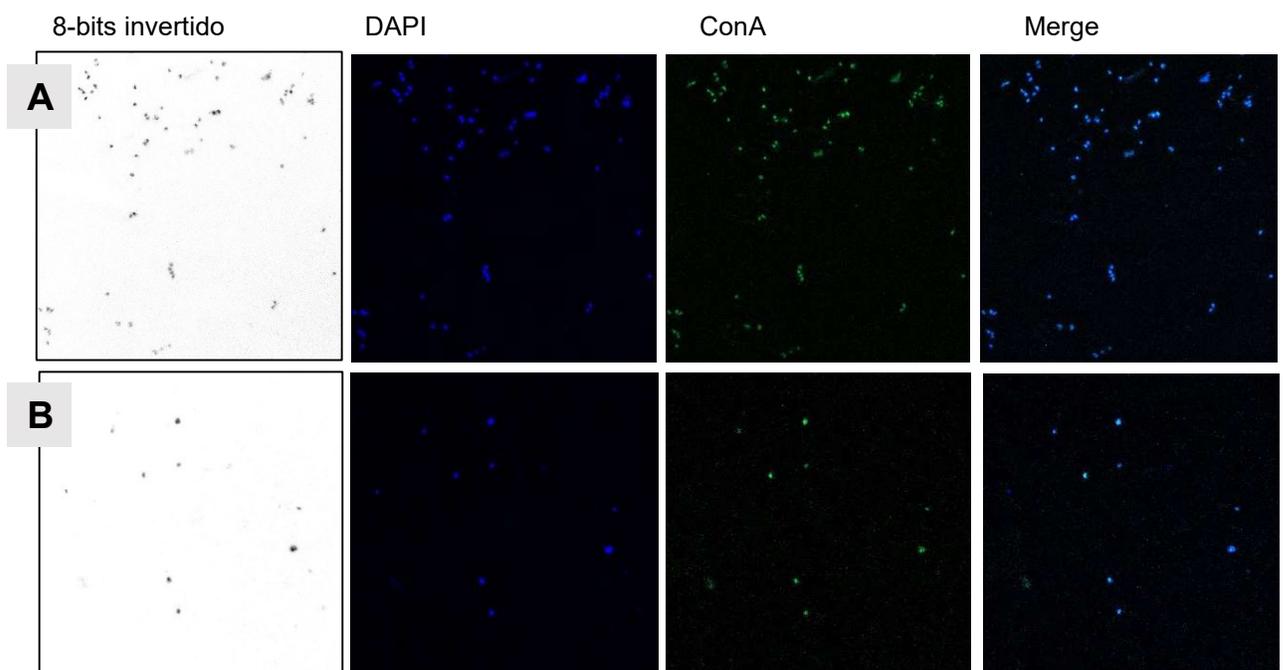


Figura 8. A. Microscopía de epifluorescencia de células adheridas a superficie de vidrio de *S. solfataricus* WT (A) y PoliP (-) (B). Aumento 100x

C. Promedio del número de células por imagen a partir de la microscopía de epifluorescencia del ensayo de adherencia (n=20). Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde ** indica $p \leq 0,0001$, *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$, * indica $p \leq 0,05$ y ns = no significativo**

La menor cantidad de células adheridas observadas en este experimento podría explicar la menor formación de biopelículas por la cepa PoliP (-).

5.1.6 Medición de los niveles de transcrito del gen de la arqueлина por qRT-PCR

En base a la menor adherencia observada para la cepa PoliP (-) de *S. solfataricus*, se decidió medir los niveles transcripcionales de uno de los componentes del arqueolo. En un estudio de adherencia de *S. solfataricus* sobre mica se había observado mediante qRT-PCR una disminución en los niveles de transcrito de *flaJ*, un componente del arqueolo, en células sésiles en comparación con células planctónicas (Zolghadr y col., 2010). Al mismo tiempo, la delección del arqueolo causó defectos en la adherencia de *S. solfataricus* a superficies (Zolghadr y col., 2010).

Al medir los cambios en los niveles de expresión del gen que codifica la arqueлина (*flaB*), el componente que forma la estructura, mediante qRT-PCR, se detectó un aumento en la expresión al comparar las células sésiles con las planctónicas tanto en las células PoliP (-) como en la WT (fig. 9).

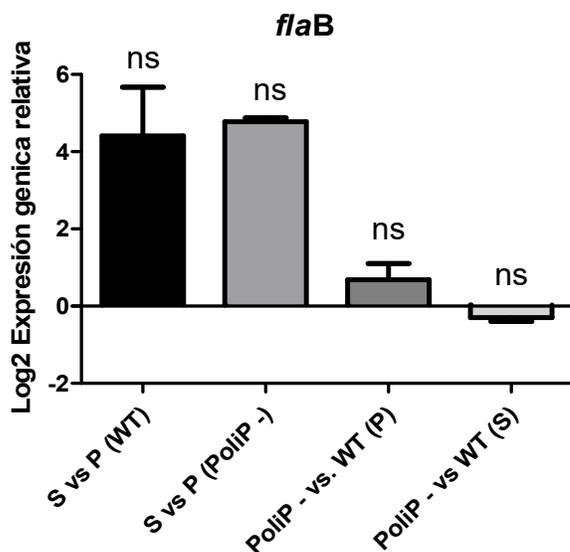


Figura 9. Expresión génica relativa del gen de la arqueлина en células sésiles (S) y planctónicas (P) de *S. solfataricus* WT y PoliP (-).

Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde **** indica $p \leq 0,0001$, *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$, * indica $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

Sin embargo, cuando se comparan las cepas PoliP (-) con la WT dentro de la misma condición, ya sea sésil o plantónica, no se detectan variaciones en los niveles de transcrito. Esto indica que no existen diferencias a nivel de expresión transcripcional de la arqueolina entre la cepa mutante y la cepa WT en condiciones de vida plantónica y sésil.

En los experimentos de proteómica, explicados más adelante, tampoco se detectaron cambios en los niveles de la arqueolina, por lo que la menor adhesión de las células PoliP (-) no sería un problema de falta de expresión del arqueolo.

5.1.7 Ensayos de movilidad en placa semisólida en *S. solfataricus*

Estando el arqueolo involucrado tanto en la adherencia a superficies como en la movilidad de *S. solfataricus*, se decidió estudiar otro efecto fenotípico que podría ocurrir por la falta de PoliP sobre esta estructura, suponiendo que el PoliP sirva como fuente de energía reemplazando al ATP o colaborando en el mantenimiento del pool de ATP/ADP en la célula. Por ello se ensayó la movilidad en placas semi sólidas de gelrite. Este ensayo se basa en medir la diferencia en el diámetro del halo formado por *S. solfataricus* a los 4 y 9 días de cultivo en placas semi sólidas bajo condiciones de hambruna, es decir, bajas concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno, en este caso, N-Z- amina.

Como se observa en la fig. 10, existe una diferencia significativa en el tamaño de los halos formados producto de la diferencia en la movilidad entre la cepa WT y la PoliP (-).

En estudios en *B. cereus* (Shi y col., 2004), mutantes de delección para *ppk* y/o *ppx* mostraron poca o nula movilidad de tipo swimming y swarming. Esto se había observado con anterioridad en otras especies como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *V. cholera* (Rashid y col., 2000).

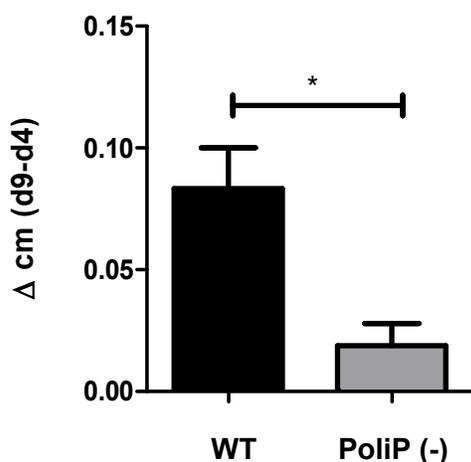


Figura 10. Movilidad de *S. solfataricus* WT y PoliP (-) en placas semisólidas. Diferencia de diámetro de halo entre los días 4 y 9 de cultivo.

Estadística t-test donde **** indica $p \leq 0,0001$, *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$ y * indica $p \leq 0,05$.

5.1.8 Medición de los niveles de transcrito de genes relacionados con el cambio de estilo de vida por qPCR en células PoliP (-) versus WT.

*5.1.8.1 Búsqueda en *S. solfataricus* de genes homólogos a los reguladores de formación de biopelículas de *S. acidocaldarius*.*

La familia Lrs14 de reguladores transcripcionales está relacionada a la formación de biopelículas en *Sulfolobus*, como se mencionó anteriormente. En *S. acidocaldarius* se realizaron mutantes de delección de los reguladores transcripcionales y se sabe cuáles de ellas son las que tendrían influencia en la formación de las biopelículas (Orell y col., 2013b).

Realizamos un alineamiento de algunas de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de la familia de reguladores Lrs14-like de *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus* (fig. 11).

Las proteínas anotadas como familia de reguladores Lrs14-like en *S. solfataricus* son aquellas codificadas por los loci: SSO0048, SSO1101, SSO1108, SSO1110 y SSO2474.

Mediante un análisis por BLAST se pudo identificar el homólogo a AbfR1 de *S. acidocaldarius* (*Saci_0446*) en *S. solfataricus* (fig. 11 A), resultando ser este la proteína codificada por el gen SSO0458, con un porcentaje de identidad del 63% y cobertura del 100%.

A	0	10	SACI AbfR1	116
		MSIETIKRVILKRRFISVAYGLSESEIDIFLIFLISKEGKIDPAISIELKSKSTSIILKKKISDAGLVKERGDNNMGGRPKYYISVNKEELKNEIDAKSEECKRENOMIKSFI		
		MSIETIEK+ LKRFLLVAYGLSE++D F++I+ S+ GKD+DAI+ EL ISKSR S+ILKKKI+DAGLV+KEK +GGRPK++Y +NKEELK +LI +SEE CK+L+ +I SF+		
		MSIETISEKGFLLKRRFLVAYGLSEADVDAFIKHIVSETGKIDVDAIAEELGSKSASIIILKKKIDAGLVKERFVSFGGRRPKFIYRINKEELKNEIDAKSEECKDHTTIFSSFL		
	0		SS00458	116
		I= 68% Cob=100%		
B	0		SS01108	123
		MOVENIRVRLPSGKEVGVPAALNFCYDISDIDDFQVLEKTIINSGFKITDELAEMHLSKASINRSVNKLVSIGFVDRVKDSSKGRPRVIYKFIIDPRITTKIENDFKYCADLFFSSVIFCELK		
		++ E +VRLPSGKE+ L++AL FCYDISDIDDFQVLIK L+ S K ED+LAE L LSKASINRSVNKLVSIGFV+R+KD SSKGRP+YIY+ I D++ +I+ DFK CA+LF +V+P+ELK		
		IEFEPAKVRLLPSGKEIFLIEPAIKFCYDISDIDDFQVLEKALIGSDKNEEDLAEQIKLSKASINRSVNKLVSIGFVERMKDSSKGRPRVIYRSIPYKLIERIETDFRCAELFFGAVLPEKELK		
	10		Saci_0133	132
		I= 67% Cob=98%		
C	2		SS01108	123
		QVENVIRVRLPSGKEVGVPAALNFCYDISDIDDFQVLEKTIINSGFKITDELAEMHLSKASINRSVNKLVSIGFVDRVKDSSKGRPRVIYKFIIDPRITTKIENDFKYCADLFFSSVIFCELK		
		Q+ R++ PSGK+ L+D L+FCY +S+TD QVL L SG K +EL L LSKASINRS+NKL+ +G R+K+S +K GRPRY+YK D + + +KI +D K CAD + + + QE		
		QITSGARMKIPSGKDAVITIDVLSFCYGISETDQVIVALAKSGAKGTELESDIILSKASINRSINIKLIEGLAMRIEESVNAKGRPRVIYKAPDYNELRSKILSDIKCADKVAKIVEQHF		
	3		Saci_0102	124
		I= 49% Cob=96%		
D	1		SS01101	110
		MAEKVRFPDGRVVDIHDFTAFMYGLSKSDVE-VLHUIQLONGKMTTDEISQNLNFKATSKRANLIDKGLIQREKAPAEKEERKGRPNYIYVVEERLYRKLLEADLEKLA		
		M ++ P ++ I + FMYGL++ +V+ + +L + K+ + +L+++ V+KA ISK+L+ L +KGLI+REK E RKGRP Y+Y+V++L++++ DLE+L		
		MEVLIQIPYQKKTQIEKLLIFMYGLNEXEVQLIFRILYSDTKENIEEIAEERFKYSKALISKSLISEFANKGLIIEEKYSNEG--RKGRP YVYVDEEQLFKRISRDLEELV		
	1		Saci_1223	109
		I= 38% Cob=88%		
E	4		SS01101	120
		KVRFPIGRVVDIHDFTAFMYGLSKSDVEVLHUIQLONGKMTTDEISQNLNFKATSKRANLIDKGLIQREKAPAEKEERKGRPNYIYVVEERLYRKLLEADLEKLAQKH		
		KV FP G+EV + D I+F+YGL KSD++VL +L+ Q +M++D+++ L V+KASI+K+LNNL DKGLI REK A +E++KGRP+YIYVW+ ERLY KLE DLE LA +K+ L++		
		KVSPFGCKEWTMCDIISFIVGLPKSDIIVLQVLIISQKREMSSEIADVLVSKASINRSNNLIVDKGLIIREKAEAEKPKGRFSYIYVWDEERLYKLEERDLETLASQKKEEER		
	6		Saci_1219	123
		I= 56% Cob=92%		

Figura 11. Alineamiento de proteínas pertenecientes a la familia Lrs14-like de reguladores transcripcionales de *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*.

En negro se señalan los residuos conservados, en gris los residuos de propiedades similares. En el rectángulo azul y letras rojas los residuos que se fosforilarian.

Está propuesto que este regulador se fosforila en los residuos Y84 y S87 en *S. acidocaldarius* (Li y col., 2017), sin embargo, estos residuos no se encuentran conservados en SSO0458, siendo reemplazados por residuos no fosforilables: Y84 →F84 y S87→R87.

Se analizó la secuencia de la proteína codificada por el locus SSO1108, ya que esta proteína apareció disminuída en el análisis proteómico de biopelículas y células planctónicas de las cepas PoliP (-) versus WT (ver resultados de proteómica, pag.63 en adelante). Esta secuencia presentó una identidad del 67% (con cobertura del 98%) con la proteína codificada por Saci_0133 (fig. 11 B), y una identidad del 49% (con una cobertura del 96%) con la proteína codificada por Saci_0102 (fig. 11 C). En *S. acidocaldarius*, estos genes habían sido analizados por qPCR en células sésiles versus planctónicas en estado estacionario, y no se vio una expresión diferencial a este nivel (Orell y col., 2013b). Las mutantes de estos genes tampoco mostraron diferencia fenotípica en la formación de biopelículas con respecto a la cepa silvestre (Orell y col., 2013b), por tanto no estarían relacionados con este proceso.

Un regulador positivo de la formación de biopelículas en *S. acidocaldarius* es la proteína codificada por el locus Saci_1223 (Orell y col., 2013b). Mediante un análisis por BLAST contra el proteoma de *S. solfataricus*, se encontró una mayor similitud con la proteína codificada por el gen SSO1101 (identidad del 38% con cobertura del 88%) (fig. 11 D). Sin embargo, al realizar el alineamiento de SSO1101 contra el proteoma de *S. acidocaldarius*, se encontró mayor similitud con la proteína codificada por el locus Saci_1219 (identidad del 56%, con cobertura del 92%) (fig. 11E).

Si bien ambas proteínas, la codificada por el locus Saci_1219 y la codificada por Saci_1223 corresponden a la familia de Lrs14-like, sólo Saci_1223 demostró tener una función como regulador de la formación de biopelículas (Orell y col., 2013b).

Se generaron partidores para medir los niveles de expresión por qPCR para los posibles reguladores codificados por los locus SSO1101, SSO1108 y SSO0458.

5.1.8.2 Análisis por qPCR de reguladores transcripcionales Lrs14 en *S. solfataricus* PoliP (-) y WT

Para el análisis de los niveles de transcritos de los genes de los reguladores Lrs14-like se utilizaron las mismas condiciones de cultivo que para la proteómica. Se analizó la significancia estadística de las condiciones de vida sésil versus planctónica en PoliP (-) contra WT (fig. 12).

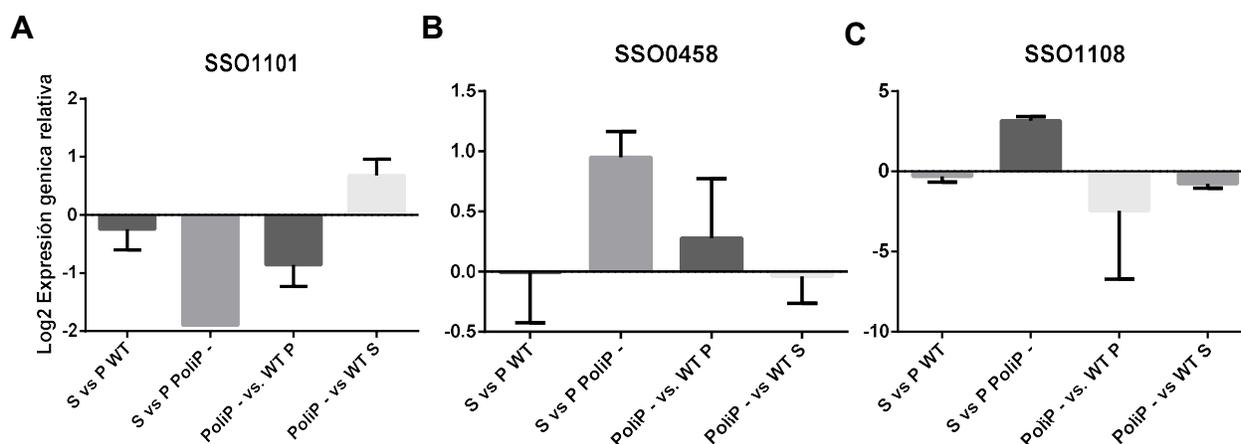


Figura 12. Expresión génica relativa de algunos reguladores de transcripción de la familia Lrs14-like en *S. solfataricus* WT y PoliP (-) en biopelícula y estado planctónico.
S: sésil, P: planctónicas

La proteína codificada por el locus SSO1101 sería un inductor de la formación de biopelículas al ser homólogo a la proteína codificada por el locus Saci_1223 como mencionamos anteriormente. Este posible regulador se encuentra disminuido en la cepa PoliP (-) al comparar células séviles versus planctónicas (fig. 12A). También se observa que los niveles de transcritos de la proteína homóloga a AbfR1 (SSO0458) se encuentran aumentados en la condición de células séviles versus planctónicas en la cepa PoliP (-), aunque no en la cepa WT (fig. 12B). Estos resultados coinciden con lo esperado para la cepa PoliP (-) ya que el posible inductor

de formación de biopelículas se encuentra disminuído, mientras que el represor se encuentra aumentado.

En la cepa WT no se observan diferencias en los niveles de transcrito de estos reguladores. Esto último coincide con lo observado por el grupo de la Dra. Sonja Albers, donde los niveles de estos reguladores no mostraban diferencias significativas al ser analizados mediante transcriptómica de células sésiles versus planctónicas de *S. solfataricus* (Koerdt y col., 2011).

5.2 Generación de mutantes del metabolismo de polifosfato en *S. acidocaldarius* y experimentos en biopelículas y fenómenos relacionados.

Las mutantes de *S. acidocaldarius* se generaron en colaboración con el laboratorio de la Dra. Sonja-Verena Albers en la Universidad de Freiburg, Alemania. Se eligió trabajar con este organismo debido a que: 1. es más fácil generar mutantes de delección en él (Wagner y col., 2012), 2. La regulación de la formación de biopelículas está más descrita (Koerdt y col., 2010; Koedt y col., 2011; Henche y col., 2012; Orell y col., 2013b; Li y col., 2017; van Wolferen y col., 2018).

Se pretendía generar 2 mutantes con los fenotipos de carencia y acumulación de PoliP. Para lograrlo se abordarían dos estrategias: por un lado, se intentaría deleccionar el gen de la PPX para generar la mutante que acumula el polímero, y por otro, se sobreexpresaría la PPX propia del microorganismo introduciendo un plásmido conteniendo el gen con un promotor inducible, para generar así la mutante que carece de PoliP, ya que se desconoce el gen de la PPK en este reino.

5.2.1 Generación de una cepa de *S. acidocaldarius* que carece de PoliP

Se construyó un plásmido que contenía el gen de la enzima PPX del microorganismo (*Saci_2018*), un promotor inducible por D-arabinosa y una cola de histidina en el C-terminal para facilitar la detección de la proteína. Además, el plásmido contenía el cassette *pyrEF* que permite seleccionar las colonias no auxótrofas de uracilo. La construcción se muestra en la fig.

13A.

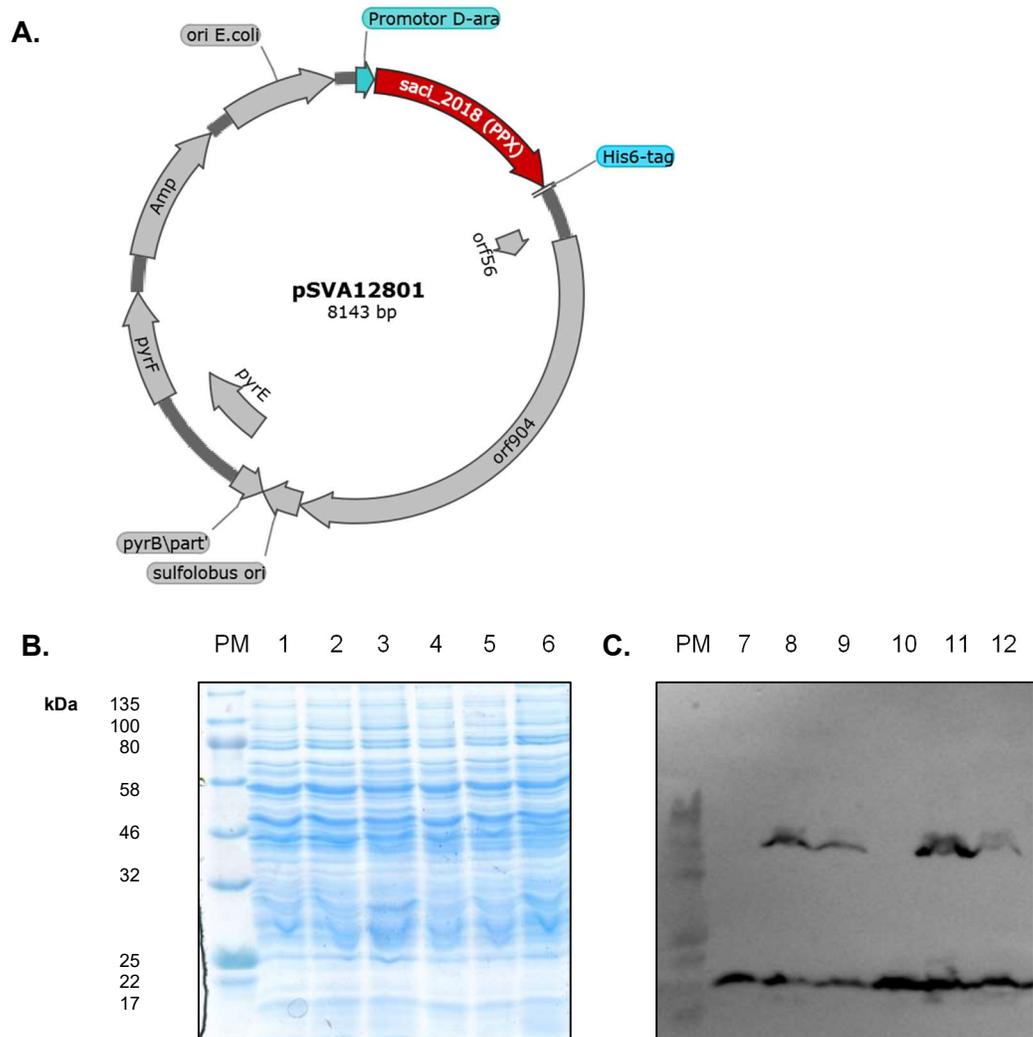


Figura 13. Obtención de una cepa de *S. acidocaldarius* que sobreexpresa su propia enzima PPX y carece de PoliP.

A. Diagrama representativo del plásmido pSVA12801 utilizado para la sobreexpresión del gen *saci_2018*. **B.** Electroforesis en gel de poliacrilamida de células enteras de *S. acidocaldarius* y **C.** Western blot anti cola de His. Carriles 1, 4, 7 y 10: MW001, carriles 2, 5, 8 y 11: MW001/pSVA12801 inducido con D-arabinosa, carriles 3, 6, 9 y 12: MW001/pSVA12801 sin inducir. Carriles 1- 3 y 7-9 corresponden a 1,5 h de inducción, carriles 4-6 y 10-12 corresponden a 4 horas de inducción.

Las células competentes de *S. acidocaldarius* MW001 se electroporaron con el plásmido metilado y se seleccionaron colonias en placas de gelrite que no contenían uracilo. Las colonias se crecieron en medio líquido Brock y se ensayó la sobreexpresión del gen en presencia de D-arabinosa, detectando la proteína por medio de Western Blot con anticuerpos de conejo contra la cola de histidina, y un anticuerpo secundario unido a peroxidasa (HRP). Se seleccionó un clon en el cual fue posible detectar la proteína por Western blot a diferentes tiempos de inducción (fig. 13B)

5.2.2 Generación de una mutante de *S. acidocaldarius* que acumula PoliP

Se propuso deletar el gen de la enzima PPX, esperando así lograr la acumulación de PoliP en el microorganismo. Para ello se utilizó el vector suicida pSVA431 (Wagner y col., 2012) donde se insertó un fragmento conteniendo aproximadamente 500 pb de las regiones río arriba y río abajo del gen de la PPX, generando el plásmido pSVA12800 (fig. 14). El método de delección se basa en el método pop-in/pop-out (Wagner y col., 2012).

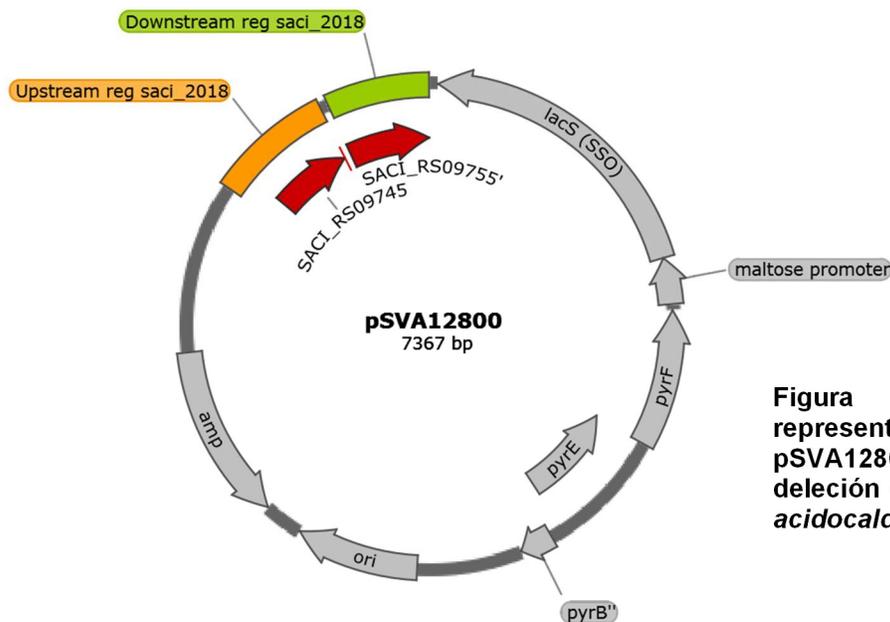


Figura 14. Diagrama representativo del plásmido pSVA12800 utilizado para la delección del gen saci_2018 en *S. acidocaldarius*.

Para la construcción del plásmido se diseñaron dos pares de partidores, uno para la región río arriba y un par para la región río abajo del gen de interés. Los mismos contenían además un sitio de reconocimiento para enzimas de restricción (*NcoI* y *Apal*, respectivamente) y una región de solapamiento entre ambos fragmentos. Se amplificaron los fragmentos de aproximadamente 500 pb cada uno. Estos se diluyeron en 1:10 y se realizó un PCR de solapamiento utilizando los partidores externos. Posteriormente el fragmento resultante se purificó separándolo mediante electroforesis en un gel de agarosa. Tanto el plásmido como el fragmento se cortaron con enzimas de restricción *NcoI* y *Apal* y se ligaron por 1 h. La construcción se introdujo en *E. coli* Top10 por transformación con shock térmico y se distribuyó en placas de medio LB-agar conteniendo ampicilina. A partir de las colonias resultantes se realizaron PCR utilizando los partidores externos del fragmento, para comprobar la presencia del plásmido y que el fragmento se encontraba inserto en el mismo.

A partir de las colonias positivas, se seleccionaron dos clones cuyo ADN se secuenció para comprobar la fidelidad del inserto con el genoma. El plásmido se nombró pSVA12800 (fig. 14) y se metiló transformándolo en la cepa *E. coli* ER1821 conteniendo el plásmido adicional pM.EsaBC4I (New England Biolabs).

El plásmido metilado se utilizó para transformar por electroporación *S. acidocaldarius* MW001 y MW2000. Tras la selección en placas sin uracilo, las colonias se crecieron en medio Brock líquido sin uracilo, y luego en placas de gelrite de segunda selección, con uracilo.

Se realizó un PCR de colonia para detectar la delección, usando los mismos partidores de río arriba y río abajo. Este método de clonamiento tiene un rendimiento del 50%. Hasta el momento de concluir la tesis no se detectaron mutantes.

Aunque no se pudo obtener la cepa que acumula PoliP, se decidió estudiar si las características observadas en la cepa PoliP (-) de *S. solfataricus* se obtenían también en *S. acidocaldarius*.

5.2.3 Ensayos de formación de biopelícula por *S. acidocaldarius*

Se analizó la formación de biopelículas en las cepas MW001 (WT) y MW001-PPX [PoliP (-)] mediante tinción con cristal violeta de la misma manera que con *S. solfataricus*, solo que la DO₆₀₀ inicial fue de 0,01 ya que se ha descrito anteriormente que esa es la mejor condición para la cepa MW001 (Koerdts y col., 2010). En la fig. 15 se observan los resultados luego de 3 días de incubación. La diferencia en la formación de biopelículas en este caso no es tan marcada como ocurría con *S. solfataricus*, sin embargo, sí se observa una diferencia estadísticamente significativa para la cantidad de cristal violeta retenido por la biomasa (fig. 15B) así como el índice 570/600 (fig. 15C) en la condición MW001-PPX inducida con D-arabinosa [PoliP (-)]. Se utilizó la cepa MW001-PPX inducida con glucosa (niveles normales de PoliP) como control.

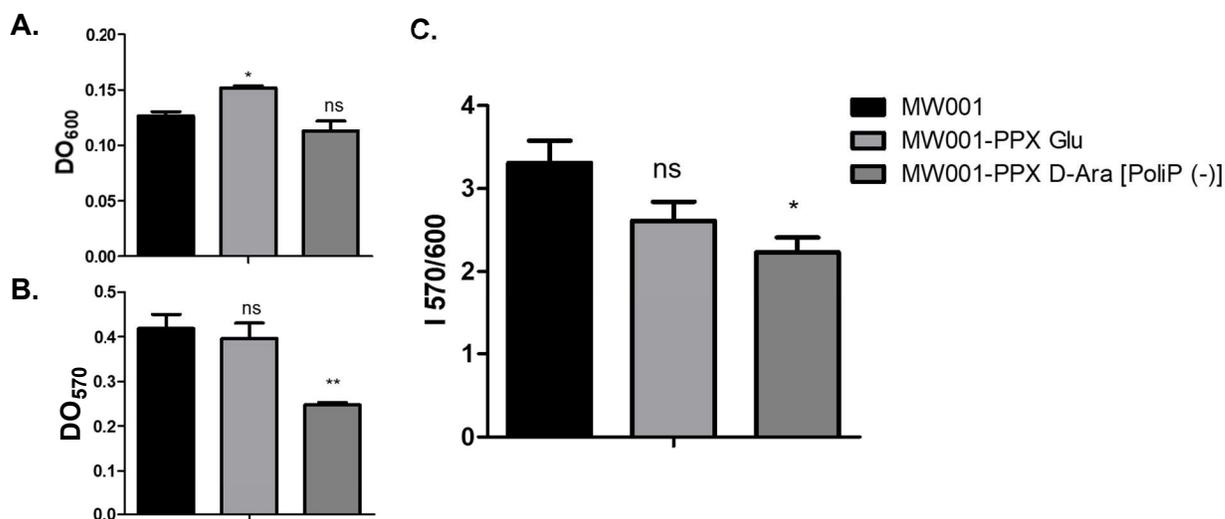


Figura 15. Parámetros de formación de biopelículas en *S. acidocaldarius* MW001 y MW001-PPX frente a diferentes inductores a los 3 días tras inoculación. A. Crecimiento de células planctónicas (DO₆₀₀) **B.** Formación de BP mediante tinción con cristal violeta (DO₅₇₀) **C.** Índice DO_{570/600}. Análisis estadístico ANOVA de doble vía, en donde ** p ≤ 0,01, * p ≤ 0,05 y ns: no significativo.

5.2.4 Microscopías de epifluorescencia y Confocal Laser de biopelículas de *S. acidocaldarius*

Se realizaron ensayos de MCL para determinar la morfología de las biopelículas en ambas cepas de *S. acidocaldarius*. En la fig. 16 se pueden observar imágenes representativas de ambas condiciones estudiadas.

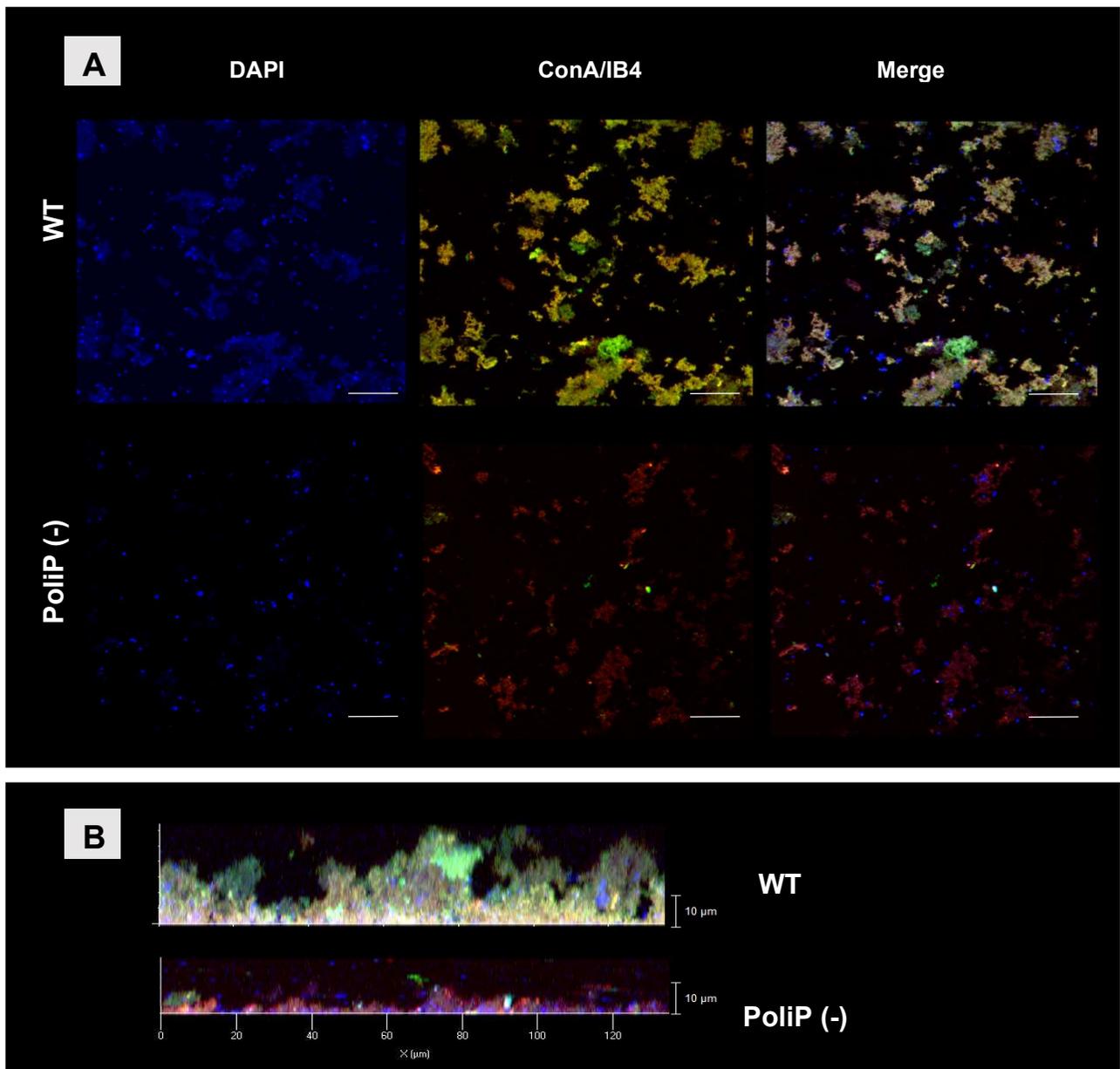


Figura 16. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de *S. acidocaldarius* WT y PoliP (-) teñidas con DAPI, ConA e IB4. Aumento 63X A. Vista superior en DAPI, azúcares (ConA+IB4) y merge de todos los canales, B. Reconstrucción en eje Z. Las barras indican 10 µm.

En la fig. 16A se muestra una vista superior (plano XY) de la preparación teñida con DAPI de las células, los azúcares (marcados con ConA y IB4) y el “merge” de todas las señales. Se distingue que en la condición PoliP (-) hay menos células marcadas en azul, igual a lo que se había observado para *S. solfataricus*. Con respecto a los azúcares, también se distingue menor cantidad de éstos, además de diferente identidad, resaltado por la diferencia de colores entre la cepa WT, donde la señal preponderante es la de la ConA-fluoresceína que corresponde a residuos α -manopiranosilo y α -glucopiranosilo, y la cepa PoliP (-) donde la señal preponderante es la del IB4-Alexa, que corresponde a residuos α -D-galactosilo.

Al mirar la reconstrucción en el eje Z también se evidencia que la cepa PoliP (-) genera una biopelícula más fina que la cepa WT, ya que esta última llega a los 20 μ m fácilmente, mientras que la primera apenas llega a la mitad de dicho valor.

En el Anexo 4, fig. S6 y S7, se pueden observar más imágenes de estas condiciones.

También se analizaron las células adheridas a la placa de Petri en biopelículas de 4 días, donde se observa que las células de MW001 poseen mayor cantidad de azúcares secretados alrededor y se agrupan formando “clústers” de células con esta matriz (fig. 17A), algo que se corresponde con lo observado en la MCL (fig. 16). La distribución de las células en la superficie de la placa de petri fue dispar. En el caso de la cepa WT, algunas regiones de mayor densidad celular se encontraban de manera dispersa en la superficie en comparación con la cepa PoliP (-) donde la distribución de células era más uniforme.

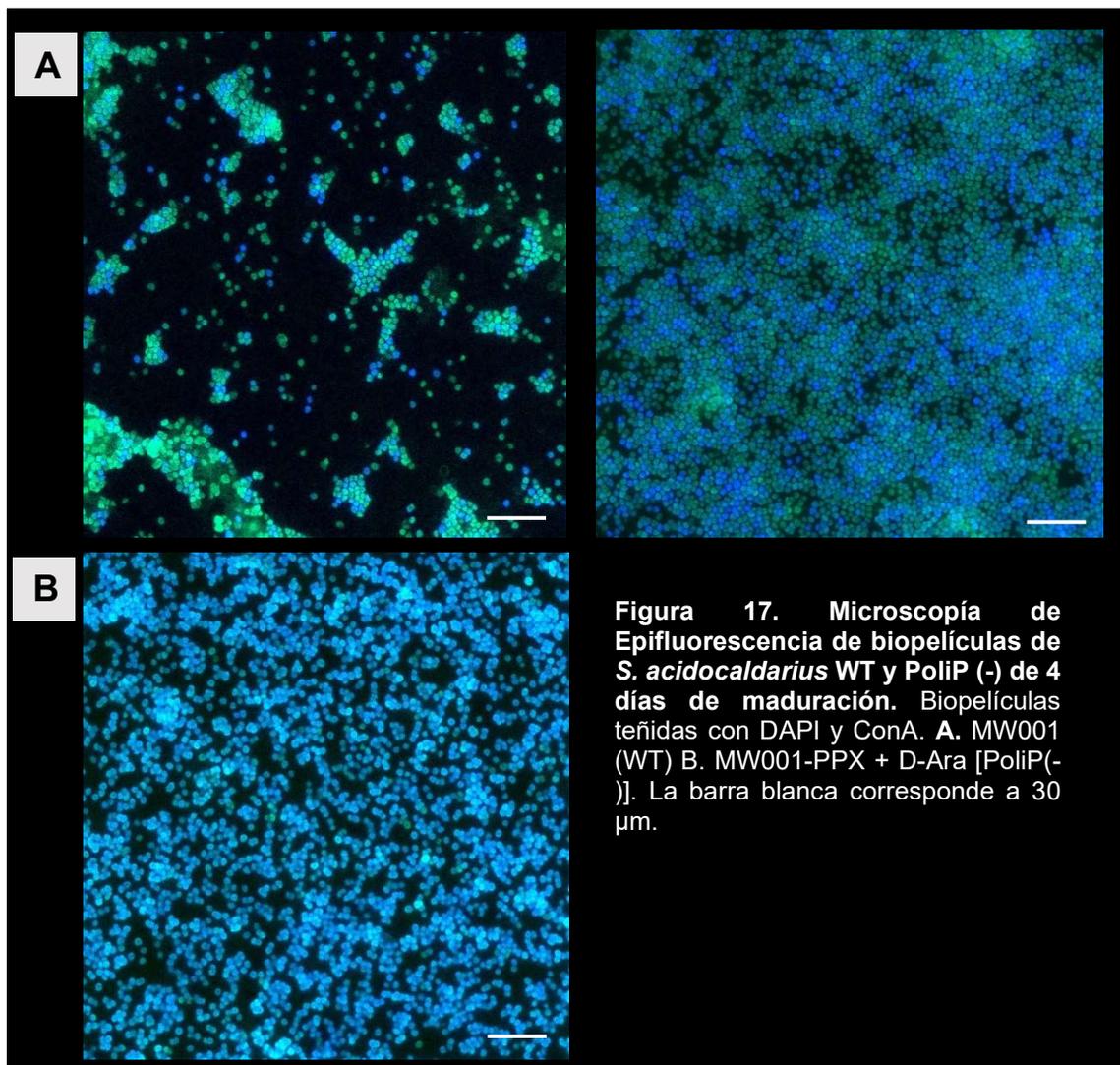


Figura 17. Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas de *S. acidocaldarius* WT y PolIP (-) de 4 días de maduración. Biopelículas teñidas con DAPI y ConA. A. MW001 (WT) B. MW001-PPX + D-Ara [PolIP(-)]. La barra blanca corresponde a 30 µm.

5.2.5 Ensayos de adherencia a superficie de vidrio en *S. acidocaldarius*

Se realizaron ensayos de adherencia durante 24 h, donde se probó la capacidad de las cepas WT y PolIP (-) de *S. acidocaldarius* de adherirse a superficies de vidrio, de la misma manera en que se había hecho con *S. solfataricus*. Las células adheridas a las láminas se fijaron con formaldehído al 4% y se tiñeron con DAPI y los residuos de azúcar mediante ConA-fluoresceína.

En la fig. 18 (A y B) se observa una diferencia significativa en la capacidad de adherencia al vidrio entre la cepa WT y la PoliP (-), siendo la capacidad de esta última mucho menor, al igual que ocurría en *S. solfataricus*. También se nota la señal de la ConA dispersa en la superficie de la lámina en los espacios sin células. Esta señal correspondería a azúcares secretados por las células y es más intensa en la cepa PoliP (-).

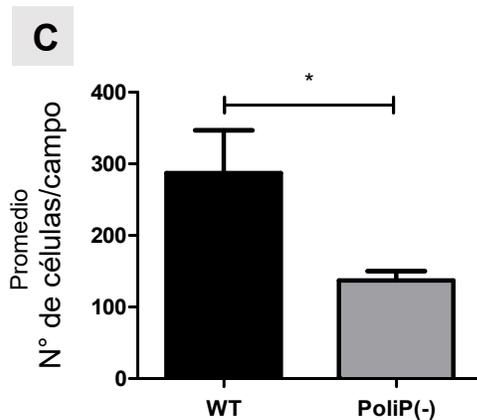
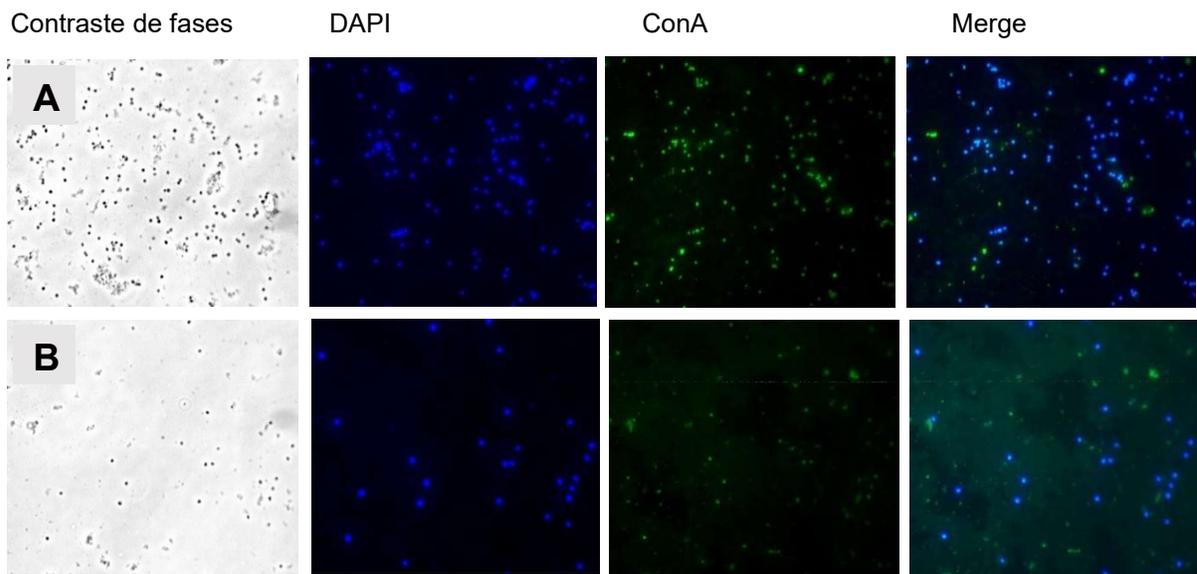


Figura 18. Microscopía de epifluorescencia de células de *S. acidocaldarius* WT y PoliP (-) adheridas a superficie de vidrio. A y B. Aumento 100X. Imágenes representativas de las cepas A. WT, B. PoliP (-)

C. Promedio del número de células por campo a partir de la microscopía de epifluorescencia del ensayo de adherencia (n=20). Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde * indica $p \leq 0,05$.

5.2.6 Expresión transcripcional del arquelo, el pili adhesivo y un regulador de biopelícula en la cepa PoliP (-) de *S. acidocaldarius*

En *S. acidocaldarius*, la adherencia depende del Pili Adhesivo Archaeal (App). El arquelo es más bien utilizado para la motilidad y el desarrollo posterior de la biopelícula (Henche y col., 2012).

Se midieron por qPCR los niveles de expresión de los genes *flaB*, que codifica para la flagelina, *aapE*, uno de los componentes del Aap, y *abfR1* que corresponde al represor transcripcional de biopelículas (Orell y col., 2013b) en la cepa PoliP (-) y WT. Los resultados se grafican en la fig. 19.

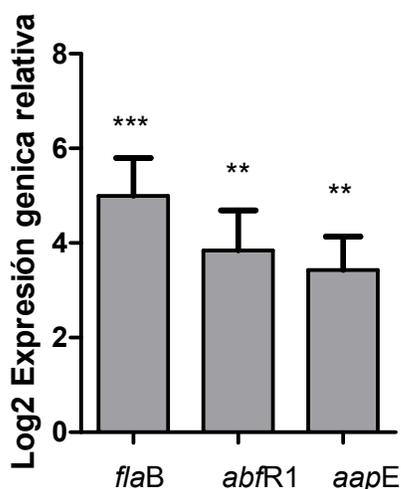


Figura 19. Niveles de expresión transcripcional de genes relacionados a biopelículas en la cepa PoliP (-) versus WT de *S. acidocaldarius*. Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ y ns: no significativo.

Se observa que la cepa PoliP (-) expresa una mayor cantidad de transcritos de los componentes de ambos apéndices (*flaB* y *aapE*) en comparación con la WT (fig. 19). Además, resulta interesante observar que el represor de biopelículas también se encuentra aumentado en esta cepa, lo cual iría en congruencia con su menor capacidad de formar biopelículas y la sobreexpresión del arquelo (Li y col., 2017).

Adicionalmente, se indujo la expresión del arqueolo en condiciones de hambruna, similares a las condiciones utilizadas en las placas de movilidad. Se realizó un western blot con anticuerpos anti-FlaB a partir de células enteras. En la fig. 20 se observa que la cepa PoliP (-) expresa la proteína en mayor cantidad que la cepa WT y MW001-PPX sin inducir.

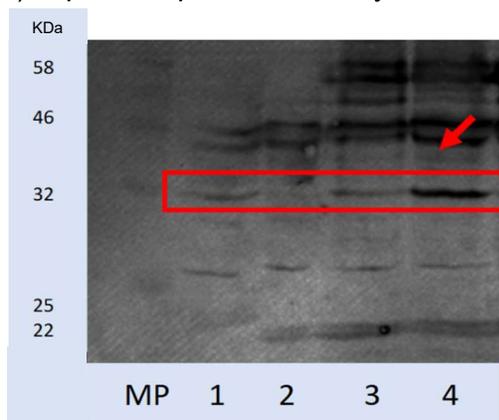


Figura 20. Western blot con anti-flaB contra extracto de proteínas de células enteras de *S. acidocaldarius* WT y PoliP (-) en condiciones de hambruna: MP: marcador de peso molecular, 1: MW001, 2: MW2000, 3: MW001-PPX sin inducir, 4: MW001-PPX inducida con D-ara. El rectángulo rojo indica donde se esperan ver las bandas de FlaB y la flecha indica la condición PoliP (-).

5.2.7 Ensayos de movilidad de *S. acidocaldarius*

Para observar un efecto fenotípico de la sobreexpresión del arqueolo y corroborar su funcionalidad, se realizaron ensayos de movilidad en placas de gelrite semisólidas y medio Brock. Se inocularon 5 μ L de cada cepa a una DO_{600} de 0,5. Se incubó por 4 días en cámara húmeda y luego se midió el halo externo e interno de cada inóculo y se calculó la diferencia entre ambos. En la fig. 21 se observa que existe una diferencia de movilidad entre las cepas.

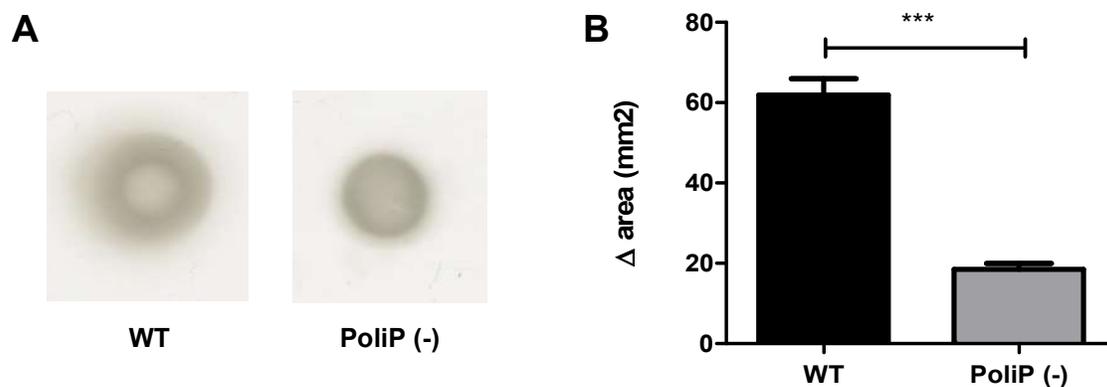


Figura 21. Ensayo de motilidad en placas semi-sólidas de gelrite/medio Brock. **A** Imagen de los halos de las colonias obtenidas del ensayo de motilidad. **B.** Promedio en las diferencias de las áreas del halo interno y externo de las colonias. Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde *** indica $p \leq 0,001$.

Tal como se observó para *S. solfataricus*, la movilidad de la cepa PoliP (-) de *S. acidocaldarius* es menor a la de su correspondiente cepa WT.

5.2.8 Concentración Mínima Inhibitoria de Cu²⁺

En presencia de Cu²⁺, PoliP se degrada, disminuyendo sus niveles en la célula (Alvarez y Jerez, 2004; Orell y col., 2010). De esta manera actúa como un mecanismo de resistencia al metal; además, también puede actuar uniendo el metal por atracción de cargas. Se ensayó la CMI de Cu²⁺ en las cepas WT y PoliP (-), exponiendo cultivos con la misma DO₆₀₀ inicial a diferentes concentraciones de Cu²⁺ durante 50 h, lo que corresponde al inicio de la fase estacionaria en la condición control. La CMI se define como la concentración mínima del metal para inhibir en crecimiento en un 50%.

En la fig. 22 se observan los resultados expresados como el porcentaje de crecimiento en cada condición respecto a la condición control. La cepa PoliP (-) de *S. acidocaldarius* es menos resistente al metal, disminuyendo su crecimiento a partir de 0,1 mM Cu²⁺, alcanzando su CMI cerca de los 0,3 mM Cu²⁺, mientras la CMI de la cepa WT está reportada como 1 mM (Remonsellez y col., 2006).

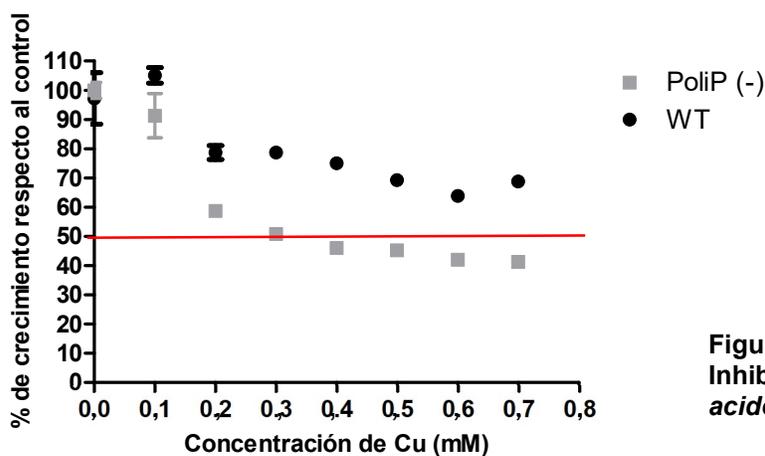


Figura 22. Concentración Mínima Inhibitoria de Cobre en *S. acidocaldarius* WT y PoliP (-)

5.3 Proteómica iTRAQ de células sésiles y planctónicas en las cepas WT y PoliP (-) de *S. solfataricus*

5.3.1 Preparación de muestras para la proteómica iTRAQ.

Se trabajó con cuatro condiciones, cada una con dos replicas: células planctónicas WT, células sésiles WT, células planctónicas PoliP (-), células sésiles PoliP (-) de *S. solfataricus*. El medio se suplementó desde el inicio del cultivo con D-arabinosa para la sobreexpresión de la enzima en la cepa que posee la construcción con el gen *ppx*.

Se tomaron aproximadamente 150 µg de proteínas totales por réplica y se congelaron con nitrógeno líquido y luego se mantuvieron a -80°C hasta liofilizarlas. Finalmente se enviaron al servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid, España, para su análisis por iTRAQ.

5.3.2 Resultados

Los resultados de la proteómica cuantitativa se organizaron en cuatro tablas:

1. Células planctónicas versus células sésiles, en cepa WT
2. Células planctónicas versus células sésiles, en cepa PoliP (-)
3. Cepa PoliP (-) versus WT, en células planctónicas
4. Cepa PoliP (-) versus WT, en células sésiles

La cantidad de proteínas identificadas en cada condición varió de 1.210 a 1.225 (tabla 1). La mayor cantidad de proteínas expresadas de manera diferencial (499) se identificaron en la cepa PoliP (-), al comparar las células planctónicas versus sésiles, mientras que en la WT apenas 74. En las condiciones de PoliP (-) versus WT se detectaron 217 proteínas expresadas diferencialmente en células sésiles, mientras que 200 en planctónicas. La mayoría de las

proteínas expresadas diferencialmente se encontraban disminuidas en la población PoliP (-), en ambas condiciones de crecimiento.

Tabla 1. Proteínas identificadas y proteínas expresadas diferencialmente, ya sea aumentadas o disminuidas en el experimento de proteómica cuantitativa iTRAQ.

	PoliP (-) vs. WT		Plantónicas vs. Sésiles	
	Sésiles	Plantónicas	PoliP (-)	WT
Proteínas identificadas	1.225	1.218	1.210	1.212
Proteínas expresadas diferencialmente	217	200	499	74
Proteínas que aumentan	66	97	303	38
Proteínas que disminuyen	151	103	196	36

5.3.2.1 Proteómica iTRAQ células planctónicas en las cepas PoliP (-) versus WT

A continuación, se presentan los resultados de proteómica de la cepa PoliP (-) versus WT, ambas en condición de células planctónicas (fig. 23 y tablas S4 y S5 en los Anexos).

A.



B.

Categoría funcional	n° prot.	prot. (+)	prot. (-)	%
Metabolismo	91	40	51	46,19
Producción y conversión de energía	30	16	14	15,23
Transporte y metabolismo de aminoácidos	24	11	13	12,18
Transporte y metabolismo de nucleótidos	7	1	6	3,55
Transporte y metabolismo de carbohidratos	9	5	4	4,57
Transporte y metabolismo de coenzimas	7	4	3	3,55
Transporte y metabolismo de lípidos	8	2	6	4,06
Transporte y metabolismo de iones inorganicos	4	1	3	2,03
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	2	0	2	1,01
Procesos celulares y señalización	19	12	7	9,64
Biogénesis de la pared / membrana / envoltura celular	7	3	4	3,55
Control del ciclo y división celular, partición del cromosoma	3	3	0	1,52
Trafico intracelular, secreción y transporte en vesículas	2	2	0	1,02
Mecanismos de defensa	7	4	3	3,55
Almacenamiento y procesamiento de la información	53	23	30	26,90
Estructura y biogénesis del ribosoma de traducción	15	5	10	7,61
Transcripción	17	4	13	8,63
Replicación, recombinación y reparación	11	5	6	5,58
Modificaciones post transcripcionales, recambio proteico, chaperonas	10	9	1	5,08
Pobremente caracterizadas	34	22	12	17,26
Función desconocida	34	22	12	17,26
TOTAL	197	97	100	100

Figura 23. Categorías funcionales de las proteínas que expresan cambios en la proteómica de las cepas PoliP (-) versus WT en células planctónicas. A. Gráfico de torta. **B.** Desglose de las categorías funcionales.

Se seleccionaron algunas proteínas que se consideraron relevantes, las cuales se volvieron a subagrupar, esta vez por función relacionada en base a la literatura, para facilitar la interpretación y discusión de los resultados.

En nuestro laboratorio se realizaron y publicaron previamente estudios proteómicos de la condición PoliP (-) vs. WT en células planctónicas de *S. solfataricus* mediante la técnica de ICPL (Soto y col., 2019). Se optó por realizar nuevamente el análisis de esta condición por iTRAQ ya que esta técnica es mucho más sensible, y además, el experimento 8-plex permitía incluir varias muestras. Por lo mismo, esta comparación de PoliP (-) vs. WT en células planctónicas con el contraste en células sésiles, ambas por iTRAQ, resulta más adecuada, ya que todas las muestras habían sido analizadas en el mismo experimento de proteómica.

En el Anexo 6 se presenta una comparación de los resultados por proteómica iTRAQ e ICPL. Brevemente, si bien el número de proteínas detectadas es mayor por iTRAQ, no se detectan algunas de las proteínas detectadas por ICPL. Sin embargo, la tendencia observada para las diversas rutas metabólicas de respuesta a estrés y producción de energía es la misma por ambas metodologías.

Metabolismo

La categoría funcional donde se observa la mayoría de los cambios en células planctónicas es la de Metabolismo (fig. 23), que sería la más afectada por la ausencia de PoliP.

Producción y conversión de energía

En la fig. 24 se observan los principales cambios en las principales rutas metabólicas relacionadas a la producción y conversión de energía. En la tabla 2 se lista una selección de proteínas de las tablas S4 y S5, agrupadas por vía metabólica principal a la cual pertenecen.

Tabla 2. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Metabolismo, Producción y conversión de energía.

En rosa se marcan las veces de cambios positivos (proteínas que aumentan) y en azul los negativos (proteínas que disminuyen).

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Producción y conversión de energía		
Ciclo de Krebs / Glioxilato shunt / Reacciones relacionadas		
SSO1333	Isocitrato liasa (AceA/icl)	-0,507
SSO2585	Malato deshidrogenasa	-0,286
SSO2589	Citrato sintasa	-0,252
SSO1842/SSO1629	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, dependiente de NADP (GapN-1) / (GapN-2)	-0,399
SSO1842	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, dependiente de NADP (GapN-2)	-0,238
Conversión de piruvato a glioxilato		
SSO1206	Piruvato sintasa, cadena beta (Pyruvic-ferredoxin oxidoreductase beta chain) (PorB-1)	-0,541
SSO1525	Piruvato deshidrogenasa, subunidad alfa (lipoamida) (PdhA-2)	-0,887
Cadena de transporte de electrones		
SSO0561	ATP sintasa tipo V, subunidad E	0,391
SSO2656	Quinol oxidasa (SoxABC), subunidad B del citocromo (SoxC)	0,456
SSO2657	Quinol oxidasa (SoxABC), subunidad aa3 del citocromo (SoxB)	0,509
SSO0329	NADH deshidrogenasa, subunidad N (NuoN)	0,471
SSO0559	ATP sintasa tipo V, subunidad I	0,235
SSO2658	Quinol oxidasa (SoxABC), subunidad II (SoxA)	0,364
SSO2819	Homologo a la proteína FIXC (FixC)	0,201
SSO2817	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidades alfa y beta (EtfAB/fixAB)	0,199
SSO6175	ATP sintasa, subunidad G (AtpG)	0,286
Otras reacciones relacionadas a estrés oxidativo		
SSO2574	Ferredoxina (Zn)	0,440
SSO2150	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-3)	0,180
SSO0106	Proteína no caracterizada	0,190
SSO3054	Oxidoreductasa	-0,394
SSO3014	Oxidoreductasa	-0,206

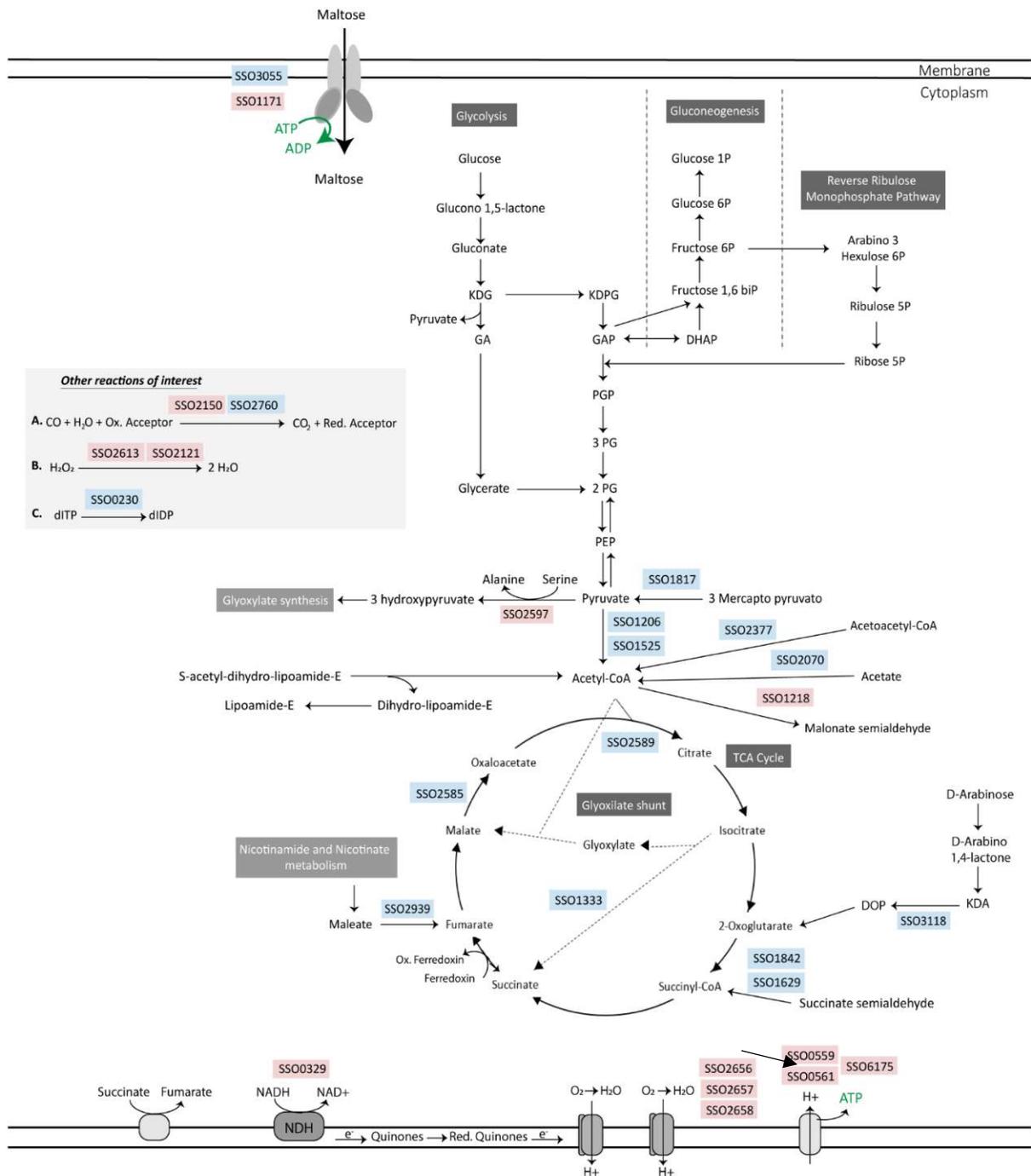


Figura 24. Rutas metabólicas afectadas por la ausencia de polifosfato en células planctónicas de *S. solfataricus*.

En cuadros rosados, los genes que codifican a proteínas que aumentan: Transportador ABC de maltosa (SSO1171), Serina piruvato aminotransferasa (SSO2597), Metil malonato semialdehído deshidrogenasa (SSO1218), NADH deshidrogenasa subunidad N (SSO0329), Quinol oxidasa SoxC (2656), SoxB (SSO2657) y SoxA (SSO2658), ATP sintasa tipo V subunidad I (SSO0559), ATP sintasa subunidad G (SSO6175), ATP sintasa tipo V, subunidad E (SSO0561), monóxido de carbono deshidrogenasa (SSO2150), Peroxirredoxina Bcp-2 (SSO2121) y Bcp-4 (SSO2613)

En cuadros azules, las que se encuentran disminuidas: Sulfur transferasa (SSO1817), Piruvato deshidrogenasa subunidad alfa (SSO1525), Acetil CoA c-acetil transferasa (SSO2377), Acetil CoA sintetasa (SSO2070), Citrato sintasa (SSO2589), Malato deshidrogenasa (SSO2585), Isocitrato liasa (SSO1333), Maleato cis-trans isomerasa (SSO2939), 2-dehído 3-desoxi D-arabinoato deshidrogenasa (SSO3118), Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP GapN-1 (SSO1842) GapN-2 (SSO1629), Monóxido de carbono deshidrogenasa (SSO2760), Nucleósido difosfato quinasa (SSO0230)

Se observan cambios en algunas de las enzimas involucradas directamente en el Ciclo de Krebs (fig. 24 y tabla 2). Anteriormente (Soto y col., 2019), en base a la disminución de otras enzimas cuyos productos alimentan el Ciclo, se especuló que esta vía podría estar aumentada por otros mecanismos de regulación, ya que en diversos microorganismos la producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato se ve aumentada en comparación a la obtención de ATP por fosforilación oxidativa en condiciones de estrés oxidativo (Lemire y col, 2017). Además, en una mutante de *Pseudomonas* sp. B4 que carecía de PoliP también se había observado un aumento en las enzimas de esta vía (Varela y col., 2010). Sin embargo, en este experimento se observan dos enzimas de la vía disminuidas: la malato deshidrogenasa (SSO2585) y la citrato sintasa (SSO2589) (fig. 24).

Otras enzimas involucradas en la conversión de Piruvato en AcetilCoA también se encuentran disminuidas: Piruvato deshidrogenasa (SSO1525) y Piruvato sintasa (SSO1206). Si bien el AcetilCoA es el primer sustrato en el Ciclo de Krebs, la acumulación de piruvato se podría utilizar para detoxificar ROS vía descarboxilación no enzimática (Lemire y col, 2017).

Respecto a la cadena de transporte de electrones: se encuentran aumentadas subunidades de una ATP sintasa (SSO0559, SSO0561 y SSO6175). También la subunidad N de la NADH deshidrogenasa (SSO0329), las subunidades alfa y beta de la flavoproteína de transferencia de electrones (FixAB) (SSO2817) una proteína homóloga a FixC (SSO2819).

Se observa también un aumento de las proteínas Sox: SoxA (SSO2658), SoxB (SSO2657) y SoxC (SSO2656) (fig. 24 y tabla 2). Estas enzimas están involucradas en la fosforilación oxidativa y están relacionadas con la citocromo c oxidasa subunidades I y II respectivamente (Lübben y col. 1992). SoxABCD (SSO2086-89) es una quinol oxidasa que es una bomba de protones. En una mutante de fosfatasa para *S. acidocaldarius* la expresión de algunos de los genes de este complejo se vieron disminuidos (Reimann y col., 2013).

En conjunto, estos resultados sugieren una mayor formación de ATP por fosforilación oxidativa, cuyo balance de ATP es mayor que la fosforilación a nivel de sustrato solamente, pero que causa mayor estrés a la célula.

Con respecto a las proteínas relacionadas a estrés oxidativo, la ferredoxina (SSO2574) (tabla 2), se encuentra aumentada. Esta proteína participa en el transporte de hierro a los centros de Fe-S que pueden verse afectados por el estrés oxidativo.

En el recuadro otras reacciones de la fig. 24 también se muestra una reacción catalizada por la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (SSO2150) de oxidación donde el CO es el aceptor de electrones pudiendo actuar en la reducción de especies oxidadas en congruencia con la idea de que el PoliP también ayuda a proteger a la célula del estrés oxidativo (Gray y Jakob, 2015). Esta enzima también puede actuar de acetil-CoA sintasa, generando más acetil-CoA que puede integrarse al ciclo de Krebs (Berg y col., 2010).

La proteína no caracterizada codificada por SSO0106 está clasificada como una alcohol deshidrogenasa en algunas bases de datos (NCBI), pero a la vez contiene un dominio similar a GroES (InterPro, UniPro). GroES es una chaperona de proteínas en *E. coli*. PoliP sería una chaperona inorgánica de proteínas en bacterias (Gray y col., 2014), por lo que la falta de PoliP podría inducir la expresión de chaperonas como GroES para suplir esta carencia. Esta proteína se encuentra aumentada en nuestros resultados.

Transporte y metabolismo de nucleótidos

Sólo se detecta aumentada la enzima exopolifosfatasa PPX (SSO1193), lo cual es de esperarse por estar inducida por D-arabinosa en la cepa PoliP (-).

Se observan varias proteínas disminuidas (tabla S5), entre las que se encuentra una nucleósido difosfato quinasa (SSO0230), que puede convertir XDP en XTP, siendo X cualquier base nucleotídica. Quizá para ahorrar fosfatos para la generación de ATP.

Transporte y metabolismo de carbohidratos

Tabla 3. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Metabolismo, transporte y metabolismo de carbohidratos

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Transporte y metabolismo de carbohidratos		
SSO1171	Transportador ABC de Maltosa	0,382
SSO2712	Proteína no caracterizada	0,32
SSO2847	Proteína de union a azucar	0,287
SSO3029	Proteína no caracterizada	-0,415
SSO0950	Proteína no caracterizada	-0,601
SSO2094	Enzima desdobladora de glicogeno (TreX)	-0,45

Se detecta un aumento en un transportador de maltosa (SSO1171) (fig 24 y tabla 3), sin embargo, otro transportador, también de maltosa (SSO3055) se encuentra disminuido (categoría de transporte y metabolismo de iones inorgánicos, tabla S5), al igual que otros transportadores que mencionaremos más adelante.

La proteína no caracterizada SSO2712 posee similitud con proteínas periplásmicas de unión a azúcar (UniProt, InterPro), en este caso sería una proteína extracelular ya que *S. solfataricus* carece de periplasma. La proteína codificada por SSO2847 también es una proteína de unión a azúcar relacionada con la captura de glucosa.

Los cambios en estas proteínas (tabla 3) sugieren que la célula necesita incrementar el ingreso de azúcares para generar energía, y que prefiere el uso de glucosa a otros tipos de azúcar. Estas proteínas no se grafican en la fig. 24.

Entre las proteínas disminuidas se encuentra la proteína codificada por el gen SSO3029, que posee un dominio de Xilosa isomerasa, la cual también es capaz de actuar convirtiendo fructosa en glucosa (tabla 3, no se cita en fig. 24).

La proteína codificada por SSO0950 (tabla 3) posee un dominio de N-acetil-D-glucosamina quinasa y ATPasa (UniProt, InterPro). El primer dominio mencionado se encuentra en proteínas que participan en la degradación de N-acetil-D-glucosamina, un azúcar complejo que forma parte de los EPS en *S. solfataricus* (van Wolferen y col., 2018). Esta proteína también se encuentra disminuida al comparar PoliP (-) vs. WT en células planctónicas, aunque no en la proteómica de células sésiles, discutida más adelante.

Transporte, biosíntesis y catabolismo de metabolitos secundarios

Se encuentra disminuida la maleato sintasa (SSO2939) (tabla 3 y fig. 24), una enzima que transforma maleato en fumarato. Se había visto que el maleato inhibe a la enzima isocitrato liasa in vivo en *Haloferox mediterranei* (Oren & Gurevich, 1995). Aunque esto no está probado en Sulfolobales, esta condición haría que disminuya la actividad de la isocitrato liasa (SSO1333), la cual de por sí se encuentra disminuida en nuestra proteómica (ver tabla S2, categoría Producción y conversión de energía).

Procesamiento y almacenamiento de la información

Modificaciones post traduccionales, recambio proteico y chaperonas

En esta condición, se observan 8 proteínas aumentadas y 1 disminuida (tabla 4, y tablas S4 y S5 del Anexo 5). Entre las aumentadas se ven varias peroxirredoxinas (SSO2613 y SSO2121, tabla 4). Como ya se mencionó, estas están involucradas en la destoxificación de peróxido de hidrógeno endógeno y exógeno (Limauro y col., 2008). Los PoliP ayudan en la destoxificación de ROS estabilizando los iones Fe^{+3} para evitar que ocurra la reacción de

Fenton (Gray y Jakob, 2015), por tanto, una falta de PoliP podría hacer que se necesiten más peroxirredoxinas para combatir el estrés oxidativo.

Tabla 4. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Modificaciones postraduccionales, recambio proteico y chaperonas.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Procesamiento y almacenamiento de información		
Modificaciones post-traduccionales, chaperonas y recambio proteico		
SSO2121	Peroxirredoxina	0,232
SSO2613	Peroxirredoxina, proteína homóloga a bacterioferritina (Bcp-4)	0,348
SSO1141	Proteína relacionada a proteasa	0,263
SSO2181	Proteína relacionada a peptidasa	0,321
SSO0349	Prefoldina, subunidad alfa	0,592

También están aumentadas, la proteína relacionada a proteasa (SSO1141), y una peptidasa (SSO2181) (tabla 4). Estas tendrían que ver con el reciclaje de proteínas, así como la subunidad alfa de la pre-foldina (SSO0349), que también se encuentra aumentada y que ayuda en el correcto plegamiento de las proteínas.

Proteínas pobremente caracterizadas

Tabla 5. Selección de las tablas S4 y S5 del Anexo 5, categoría: Proteínas pobremente caracterizadas: Función desconocida

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Función desconocida		
SSO12067	Segundo ORF en el transposon parcial ISC1160	1,497
SSO1583	Proteína no caracterizada	1,163

Se detectaron 22 proteínas aumentadas (tabla S4) y 12 disminuidas (tabla S5) en esta categoría. Resulta llamativa las veces de cambio de las proteínas no caracterizadas codificadas por los genes SSO1583 y SSO12067 (1.16 y 1.5 veces de cambio respectivamente, tabla 5). La SSO1583 es una proteína con varios dominios de

transmembrana y un dominio de función desconocida (DUF973). En su contexto genómico se encuentran proteínas relacionadas con el metabolismo energético (SSO1580, SSO1579, SSO1578) y algunas con dominio ferredoxina (SSO1581) y ferredoxina - oxido reductasa (SSO1577). La segunda, SSO12067, corresponde a un ORF de un transposón.

Además de éstas, existen otras proteínas no caracterizadas pero que poseen una clasificación dentro de las categorías funcionales, cuyos aumento o disminución llaman la atención por lo elevado de los mismos. Sería interesante en el futuro estudiar estas proteínas en más detalle mediante bioinformática, expresión heteróloga o delección para ahondar en su función. Ninguna de estas proteínas se habían reportado en la proteómica publicada anteriormente (Soto y col., 2019).

5.3.2.2 Proteómica iTRAQ células sésiles en las cepas PoliP - versus WT

En la fig. 25 se grafican los resultados de las categorías funcionales más representadas y la cantidad de proteínas con cambios positivos o negativos en este contraste.

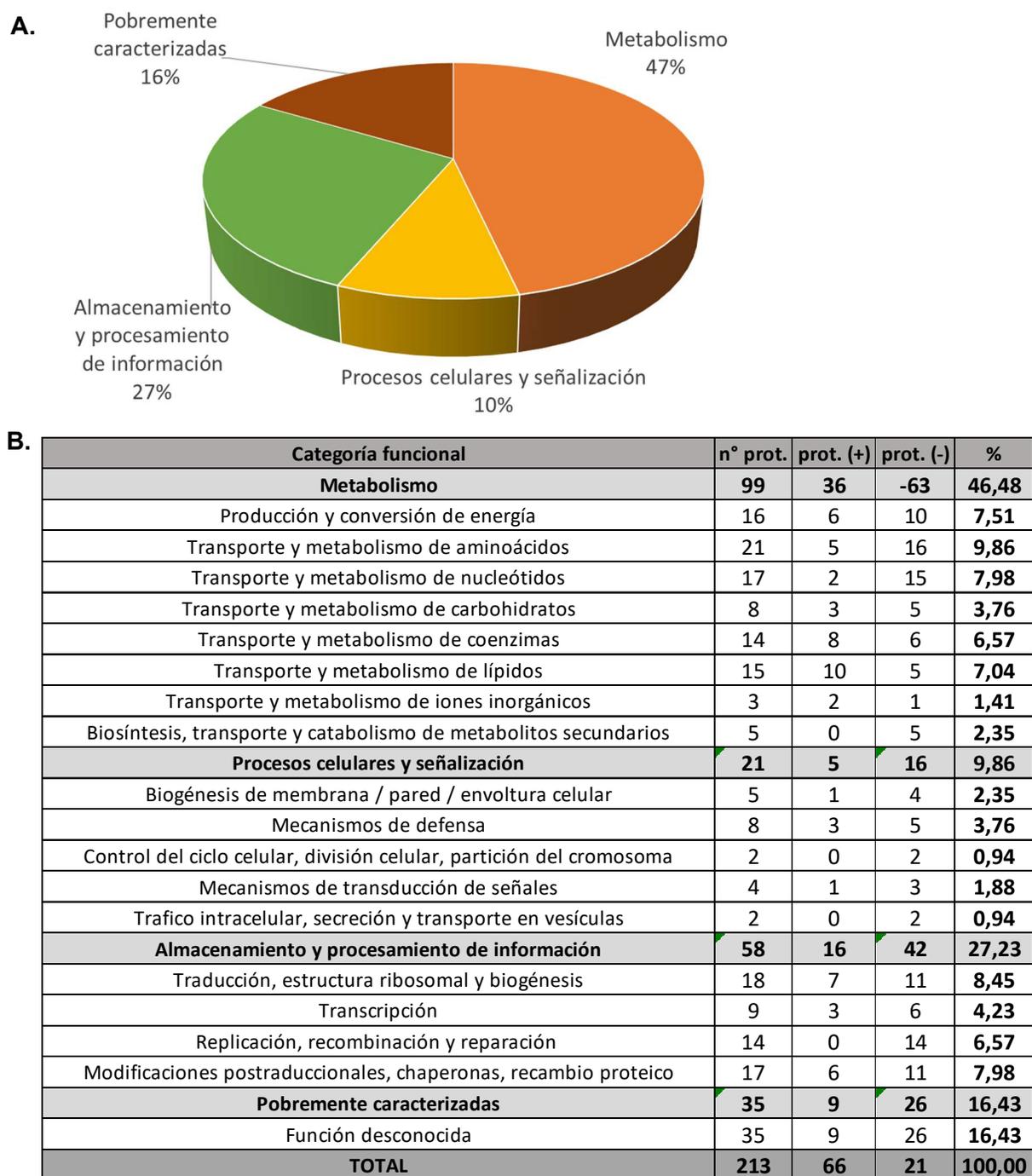


Figura 25. Categorías funcionales de las proteínas que expresan cambios en la proteómica iTRAQ M16-PPX versus M16 en células sésiles. A. Gráfico de torta. B. Desglose de las categorías funcionales

A continuación, se seleccionan algunas proteínas relevantes encontradas para discutir las en base a la literatura. Las mismas se volvieron a subagrupar, esta vez por función relacionada, para facilitar la interpretación y discusión de los resultados. Las listas completas de proteínas que aumentan o disminuyen su expresión de manera significativa se encuentran en las tablas S6 y S7 en el Anexo 5.

Metabolismo

Producción y conversión de energía

Una monóxido de carbono deshidrogenasa (SSO2760) se encontró aumentada (fig. 26, recuadro: otras reacciones de interés, y tabla 6). Esta enzima cataliza la conversión de CO a CO₂ y también puede actuar como AcetilCoA sintasa, generando AcetilCoA que puede entrar al ciclo de Krebs para generar ATP (Berg y col., 2010).

Tabla 6. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Metabolismo, Producción y conversión de energía

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Producción y conversión de energía		
Ciclo de Krebs / Glioxilato shunt / Reacciones relacionadas		
SSO2815	2-oxoacido--ferredoxina oxidoreductasa, cadena alfa	0,16
SSO1077	Fumarato hidratasa clase II	0,184
SSO2589	Citrato sintasa	0,234
Cadena de transporte de electrones		
SSO2657	Quinol oxidasa (SoxABC), citocromo subunidad aa3 (SoxB)	0,312
SSO0329	NADH deshidrogenasa, subunidad N (NuoN)	-0,371
SSO2358	Succinato deshidrogenasa, subunidad C (SdhC)	-0,336
SSO0665	NADH deshidrogenasa, subunidad B (NuoB)	-0,28
Otras reacciones relacionadas a estrés oxidativo		
SSO3054	Oxidoreductasa	-0,624
SSO2760	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-5)	0,227

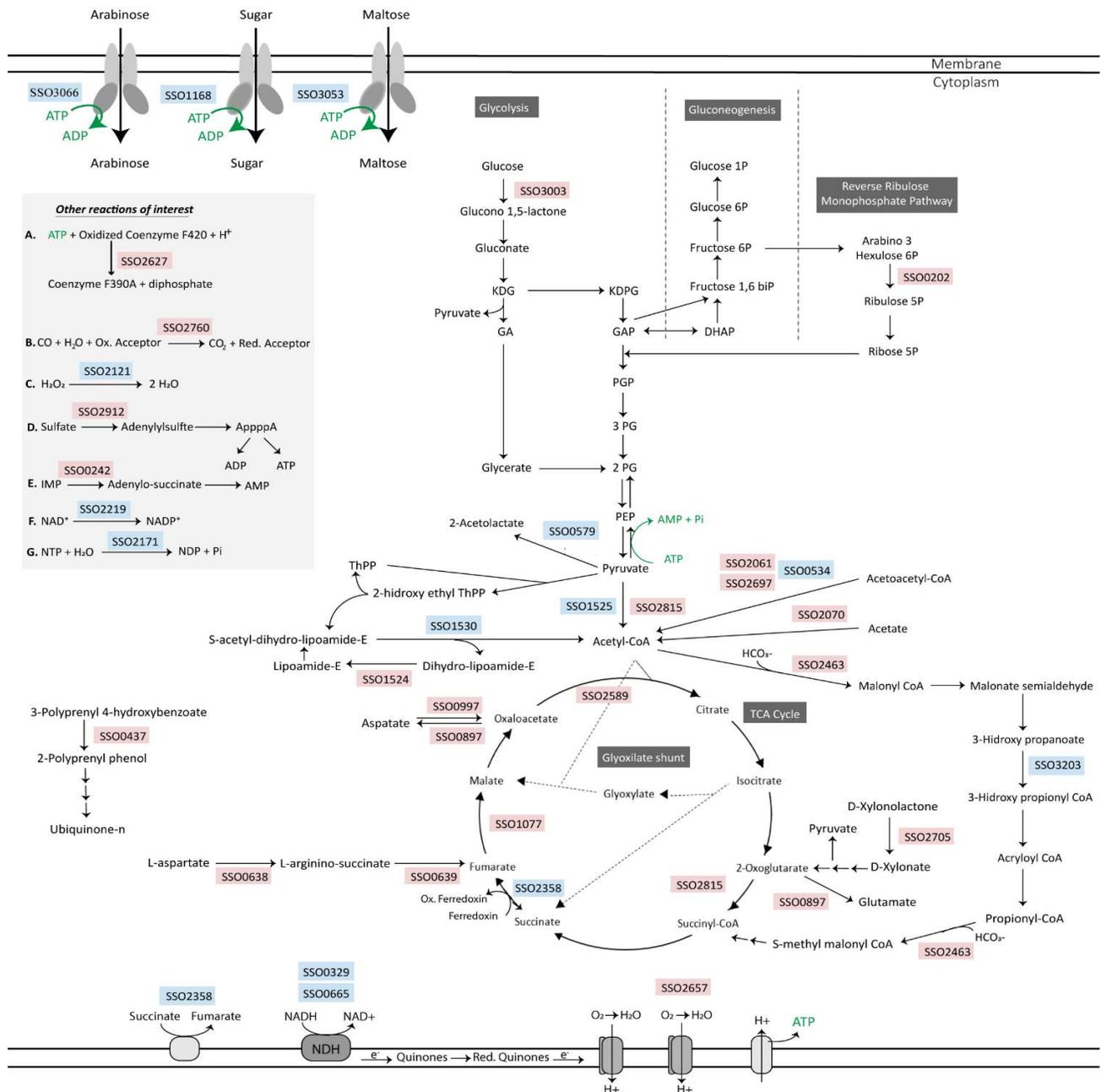


Figura 26. Rutas metabólicas afectadas por la ausencia de polifosfato en células sésiles de *S. solfataricus*.

En cuadros rosados, los genes que codifican a proteínas que aumentan: Glucosa 1 deshidrogenasa (SSO3003), D-arabino-3-hexulosa 6-fosfato formaldehído liasa (SSO0202), Acetil CoA C-acetil transferasa AcaB-2 (SSO2061), Acetil CoA C-acetil transferasa AcaB-8 (SSO2697), Acetil CoA sintetasa AcsA-7 (SSO2070), di hidrolipoamida deshidrogenasa (SSO1524), Aspartato aminotransferasa (SSO0897), L-aspartato oxidasa (SSO0997), Fumarato deshidratasa clase II (SSO1077), 2-oxoacido ferredoxin oxidoreductasa, cadena alfa (SSO2815), Argininosuccinato sintasa (SSO0638), Argininosuccinato liasa (SSO0639), Homólogo a Regucalcina (SSO2705), Aspartato aminotransferasa (SSO0897), Propionil CoA carboxilasa, subunidad beta (SSO2463), Quinol oxidasa SoxB (SSO2657), CoA ligasa (SSO2627), Monóxido de carbono deshidrogenasa (SSO2760), Sulfato adenililtransferasa (SSO2912), Adenilosuccinato sintasa (SSO0242)

En cuadros azules, las que se encuentran disminuidas: Transportador de arabinosa (SSO3066), Transportador de azúcares (SSO1168), transportador de maltosa (SSO3053), acetolactato sintasa (SSO0579), Piruvato deshidrogenasa (SSO1525), Di hidrolipoamida S-acetil transferasa PdhC (SSO1530), Acetil CoA C-acetil transferasa AcaB-1 (SSO0534), NADH deshidrogenasa subunidad N (SSO0329), NADH deshidrogenasa subunidad B (SSO0665), Acetil-CoA sintetasa (SSO3203), Succinato deshidrogenasa subunidad C (SSO2358), Peroxirredoxina (SSO2121), NAD quinasa (SSO2219), nucleósido tri fosfatasa (SSO2171)

Ciertas proteínas de la cadena de transporte de electrones se vieron disminuidas, como la subunidad C de la enzima succinato deshidrogenasa (SSO2358) y las subunidades B y N de la NADH deshidrogenasa (SSO0665 y SSO0329, respectivamente) (fig. 26). Como se mencionó anteriormente, la generación de ATP a través de la fosforilación a nivel de sustrato, es preferente respecto a la fosforilación oxidativa, y por ende, la cadena de transporte de electrones, es un mecanismo de respuesta al estrés oxidativo en microorganismos (Lemire y col., 2017). Este resultado contrasta con el aumento de algunos componentes de la cadena de transporte de electrones en la condición PoliP (-) versus WT en células planctónicas de *S. solfataricus*.

También se ha reportado que en células sometidas a estrés, la disminución en las cantidades de ATP constituye una respuesta metabólica al estrés oxidativo (Reichmann y col., 2018).

Al igual que en células planctónicas, se detecta un aumento en SoxB (SSO2657). Como ya mencionamos, esta proteína forma parte de una bomba de protones y que en una mutante de fosfatasa en *S. acidocaldarius* la expresión de algunos de los genes de este complejo se vieron disminuidos (Reimann y col., 2013).

Transporte y metabolismo de nucleótidos

Al contrario de lo que pasa en las células planctónicas, aquí vemos una disminución en varias enzimas de las vías de síntesis de las purinas y las pirimidinas. Varias de las proteínas relacionadas con la vía de síntesis de purinas se encuentran disminuidas: PurS (SSO6264), PurL (SSO0629), PurQ (SSO0628), PurC (SSO0626), PurD (SSO0635), PurF-2 (SSO0633). Sólo se encuentra aumentada PurA (SSO0242) (fig. 28).

Tabla 7. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Metabolismo, Transporte y metabolismo de nucleótidos

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Transporte y metabolismo de nucleotidos		
SSO1193	Exopolifosfatasa, probable	1,515
Metabolismo de purinas		
SSO0633	Amido fosforibosil transferasa (PurF-2)	-0,303
SSO0635	Fosforibolisamina--glicina ligasa (PurD)	-0,336
SSO0629	Fosforibosilformilglicinamidina sintasa, subunidad (PurL)	-0,406
SSO0628	Fosforibosil formil glicinamidina sintasa, subunidad (PurQ)	-0,273
SSO0611	Dihidro orotasa (PyrC)	-0,332
SSO0242	Adenil succinato sintetasa (purA)	0,407
SSO2171	Nucleosido trifosfatasa (THEP1)	-0,524
Metabolismo de pirimidinas		
SSO0614	Aspartato carbamoil transferasa (PyrB)	-0,447
SSO0613	Aspartato carbamoil transferasa, cadena regulatoria (PyrI)	-0,695
SSO0626	Fosforibosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa (PurC)	-0,243
SSO0610	Deshidrorotato deshidrogenasa B (NAD(+)), subunidad catalitica (PyrD)	-0,267
SSO0615	Orotato fosforibosiltransferasa PyrE	-0,364
SSO0231	Uracil fosforibosil transferasa (Upp)	-0,611
SSO0976	Uridilato quinasa (PyrH)	-0,305
SSO6264	Fosforibosilformilglicinamidina sintasa, subunidad (PurS)	-0,472
SSO0201	CTP sintasa (PyrG)	-0,369

Con respecto al metabolismo de pirimidinas, se encuentran disminuidas PyrB (SSO0614), PyrC (SSO0611), PyrD (SSO0610), PyrE (SSO0615), PyrG (SSO0201), PyrH (SSO0976) y Upp (SSO0231). Ninguna proteína de la vía se encuentra aumentada en estas condiciones (fig. 27). Esto podría traducirse en una menor síntesis de ácidos nucleicos y por tanto un mayor tiempo de replicación celular, pero se necesita más evidencia al respecto.

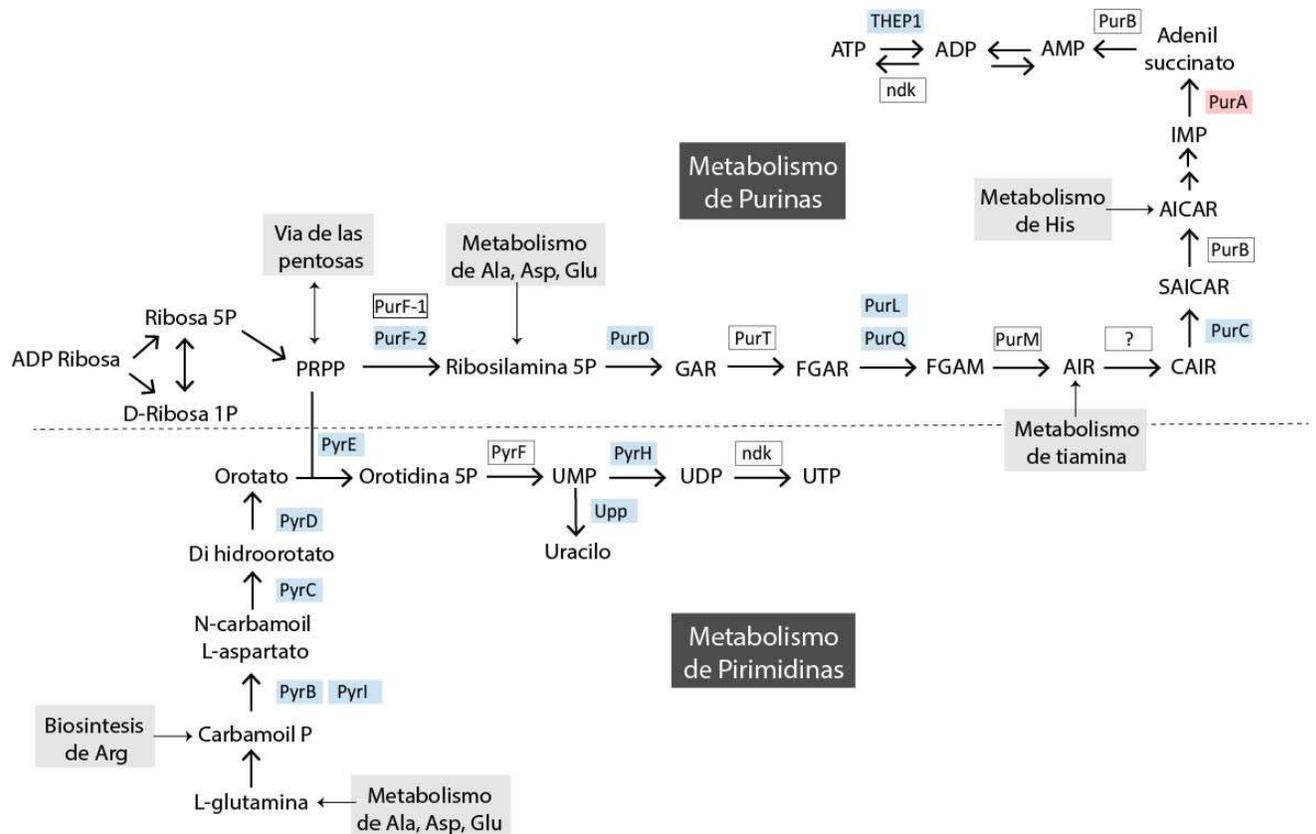


Figura 27. Proteínas del metabolismo de bases nitrogenadas que se encontraron expresados diferencialmente en células sésiles de *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT.

En rectángulos celestes se mencionan las proteínas disminuidas:

Metabolismo de purinas: PurF-2 (SSO0633), PurD (SSO0635), PurL (SSO0629), PurQ (SSO0628), PurC (SSO0626), PurS (SSO06264), THEP-1 (SSOSSO2171)

Metabolismo de pirimidinas: PyrB (SSO0614), PyrI (SSO0613), PyrC (SSO0611), PyrD (SSO0610), PyrE (SSO0615), PyrH (SSO0976) y Upp (SSO0231).

En rectángulos rosados se encuentran las proteínas aumentadas: Metabolismo de purinas: PurA (SSO0242).

Transporte y metabolismo de carbohidratos

Se observa la disminución de varios transportadores de azúcar y arabinosa (SSO1168 y SSO3066) (fig. 26), así como un transportador de prolina/betaína (SSO2852). Estos transportadores tienen en común el uso de ATP para el transporte de sus sustratos, por lo que una disminución de los mismos disminuiría el consumo de ATP. No se observa aumento de transportadores ABC.

Transporte y metabolismo de coenzimas

En esta categoría aparece disminuida una NAD quinasa (SSO2219) (fig 26, en cuadro “Otras reacciones de interés”). Esto resulta contradictorio respecto a la respuesta metabólica frente al estrés oxidativo, ya que esta respuesta suele ser un aumento en la actividad de la NAD quinasa para la producción de mayor cantidad de NADP en preferencia al NAD, ya que esta coenzima provee equivalentes de reducción para generar glutatión, tiorredoxina e hidroperóxido reductasa (Lemire y col., 2017).

También se encuentra disminuida una subunidad de la Piridoxal 5'-fosfato sintasa (SSO0570), que está involucrada en la síntesis de vitamina B6, la cual se encontró aumentada en un estudio de la respuesta a níquel en *S. solfataricus* (Salzano y col., 2007)

Transporte y metabolismo de lípidos

Sat (SSO2912) es una proteína que participa en la asimilación de Sulfato para producir ATP o ADP y se encuentra aumentada (tabla S6 del Anexo 5, fig 26, en cuadro “Otras reacciones de interés”).

Transporte y metabolismo de iones inorgánicos

La proteína Fur (SSO2244), un sensor de los niveles de hierro y controlador de la Superóxido dismutasa dependiente de Fe/Mn (Lemire y col., 2017), se encuentra disminuida en estas condiciones (tabla 8). Fur es un regulador transcripcional de la respuesta a estrés (Cárdenas y col., 2012).

Tabla 8. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Metabolismo, Transporte y metabolismo de iones inorgánicos

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Transporte y metabolismo de iones inorganicos		
SSO1067	Proteinasa intracelular	0,265
SSO2244	Proteína reguladora de la captura de hierro (Fur)	-0,435

Se ve aumentada una proteínasa intracelular (SSO1067) (tabla 8) que estaría involucrada en el reciclaje de proteínas.

Procesos celulares y señalización

Mecanismos de transducción de señal

Aparece disminuida la Proteína Universal de Estrés (SSO1865) (tabla 9). Esta misma proteína se había reportado aumentada en la condición de biopelícula versus planctónicas en *S. solfataricus* (Koerdt y col., 2011). La proteína no caracterizada codificada por el gen SSO2778 posee un dominio de proteína universal de estrés (UniProt, InterPro). Esto junto con la disminución de las peroxirredoxinas indica que la célula PoliP (-) en modo de vida sésil estaría menos preparada para resistir estrés.

Tabla 9. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesos celulares y señalización. Mecanismos de transducción de señal

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Procesos celulares y señalización		
Mecanismos de transducción de señal		
SSO1195	Fosfohistidina fosfatasa (SixA)	-0,442
SSO2778	Proteína no caracterizada	-0,345
SSO1865	Proteína Universal de Stress (uspA)	-0,185

La fosfohistidina fosfatasa (SixA) (SSO1195) se encuentra disminuida. SixA de *S. solfataricus* no mostró similitud con SixA de *E. coli* en Blast, sin embargo, de acuerdo con EggNOG pertenecen a la misma familia y la proteína de la arquea posee el dominio de esta superfamilia. La actividad catalítica de este dominio es la de fosforilar y desfosforilar un residuo de His en su estructura para transferir el grupo fosfato de un sustrato (Rigden, 2008). A esta misma familia pertenece la proteína PhoE de *E. coli*, la cual se expresa en hambruna de fosfato. SixA en *E. coli* tiene a ArcB como sustrato. SixA actúa bajo ciertas condiciones de anaerobiosis, quitando el fosfato de ArcB y disminuyendo la transferencia de fosfato de ArcB a ArcA. ArcA

actúa como represor del operón de la Succinato deshidrogenasa cuando se encuentra fosforilado, por tanto la acción de SixA resulta en la des-represión de la Succinato deshidrogenasa (Matsubara y Mizuno, 2000). En este caso, la disminución de SixA en la cepa PoliP (-) respecto a la WT resultaría en la represión de la Succinato deshidrogenasa, suponiendo que cumplieran la misma función. De hecho, la subunidad C de la succinato deshidrogenasa se encuentra disminuida en estas condiciones, apoyando este modelo.

Mecanismos de defensa

Tabla 10. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesos celulares y señalización. Mecanismos de defensa.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Procesos celulares y señalización		
Mecanismos de defensa		
SSO0688	Transportador ABC	-0,534
SSO1746	Proteína no caracterizada	-0,386
Proteína relacionada a CRISPR-Cas		
SSO1440	Homologo a ARN helicasa dependiente de ATP (Cas3)	-0,88
SSO1439	Proteína no caracterizada	-0,437
SSO1402	Proteína relacionada a ARN helicasa dependiente de ATP	-0,248
SSO1425	Proteína no caracterizada	0,193
SSO1428	Proteína no caracterizada	0,225
SSO1426	Proteína no caracterizada	0,283

Se encuentra disminuida la proteína codificada por los genes SSO0688, un transportador dependiente de ATP (tabla 10).

La proteína no caracterizada SSO174 6 también se encuentra disminuida (tabla 10). Esta posee una identidad 100% con la proteína de SSO 98/2 que está anotada como PilT, además está anotada en esa misma familia en la base de datos EggNOG. Esta proteína se encuentra disminuída en la cepa PoliP (-) comparada con la WT en células sésiles, y es una ATPasa citoplasmática relacionada con el pili tipo IV y el sistema de secreción tipo IV. Además, tiene

que ver con la movilidad tipo Twitching y el ensamblaje del flagelo. Quizás esto tenga relación con los defectos de motilidad y adherencia encontrados en la cepa PoliP (-).

Se encuentran aumentadas las proteínas SSO1425, SSO1426 y SSO1428, proteínas relacionadas al sistema CRISPR-Cas. Sin embargo, en la misma categoría, se encuentra disminuida la proteína SSO1439, que también se encuentra en el contexto de las anteriores. También disminuye la proteína codificada por el gen SSO1440, una proteína homóloga a ARN helicasa dependiente de ATP, parte del sistema CRISPR-Cas (*cas3*); y la ARN helicasa dependiente de ATP (SSO1402).

Procesamiento y almacenamiento de la información

Transcripción

Tabla 11. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesamiento y almacenamiento de la información. Transcripción

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Procesamiento y almacenamiento de la información		
Transcripción		
SSO1108	Familia Regulador transcripcional <i>Lrs14</i>	-0,255
SSO1631	Proteína E de síntesis de Coenzima PQQ (<i>PqqE-2</i>)	0,719

En esta categoría, resulta interesante observar la disminución de uno de los reguladores transcripcionales *Lrs-14* (SSO1108) (tabla 11), involucrados en la formación de biopelículas en las especies de *Sulfolobus* (Koerdts y col., 2011; Orell y col., 2013b). Específicamente en *S. solfataricus* no se ha estudiado cómo cada uno de estos reguladores interviene en la formación de las biopelículas (favoreciendo o no la formación de éstas), como se ha hecho con *S. acidocaldarius* debido a su facilidad para obtener mutantes de delección. Forman parte de las familias *Lrs-14*, las proteínas codificadas por los genes SSO1101, SSO1110, SSO0458, SSO2474, SSO0048 y SSO1108 como habíamos mencionado anteriormente. Las proteínas

codificadas por SSO1101 y SSO1108 aparecen aumentadas en la proteómica de biopelículas de Koerdt (Koerdt y col., 2011).

La proteína E de síntesis del cofactor PQQ (SSO1631) se encuentra aumentada (tabla 10). Esta es una proteína que participa en la síntesis de un cofactor redox, por tanto, tiene que ver con el estrés oxidativo.

Replicación, recombinación y reparación

En esta categoría funcional, la proteína no caracterizada codificada por SSO0572 se encuentra disminuida. La misma se trataría de la ATPasa PilT, que habíamos mencionado anteriormente (categoría Procesos celulares y señalización, mecanismos de defensa).

Además, también se encuentra disminuida la proteína PdxS, una pyridoxal fosfato sintasa (SSO0570). Según se ha reportado previamente ambas formarían parte de un operón junto con SSO0571 que en este caso no se detectó en la proteómica. Sin embargo, al formar parte de este operón, se pone en duda si su función tendría que ver con este sistema de secreción tipo IV, ya que SSO0570 y SSO0571 no tienen que ver con esta función. SSO0572 es una proteína asociada mayormente a membrana (Albers, 2004). La función de esta ATPasa tiene que ver con la retracción del Pili tipo IV (archaello), y el movimiento twitching. *S. solfataricus* posee 2 estructuras Pili tipo IV: el archaello y el Ups. En *S. acidocaldarius*, el archaello tiene que ver con la adherencia a superficies, además del Aap que no se encuentra presente en *S. solfataricus* (Henche y col.,2011)

Modificaciones post traduccionales, recambio proteico y chaperonas

Esta categoría agrupa proteínas relacionadas a la reparación de proteínas dañadas y la defensa contra el estrés oxidativo (tabla 12). Resulta particularmente interesante ya que se ha descrito el papel de los PoliP como chaperonas inorgánicas de proteínas en bacterias. En arqueas no existen estudios publicados al respecto, pero resultados preliminares de nuestro laboratorio sugieren que cumplirían el mismo rol.

Tabla 12. Selección de las tablas S6 y S7, categoría: Procesamiento y almacenamiento de la información. Modificaciones postraduccionales, recambio proteico y chaperonas

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Procesamiento y almacenamiento de la información		
Modificaciones post-traduccionales, chaperonas y recambio proteico		
Metabolismo Redox		
SSO2121	Peroxirredoxina Bcp-2	-0,269
SSO2708	Proteína relacionada al factor de expresión/formación de hidrogenasa	-0,234
Tiorredoxinas		
SSO2416	Tiorredoxina reductasa (TrxB-3)	0,289
SSO2222	Ferredoxina--NADP reductasa /TrxB-1	0,175
SSO2232	Tiorredoxina (TrxA-2)	-0,537
SSO2204	Proteína no caracterizada	-0,26
Reciclaje de proteínas / Chaperonas		
SSO0738	Proteasoma, subunidad alfa	-0,317
SSO3231	Proteína homóloga a Proteasa HtpX	-0,274
SSO2427	Proteína Pequeña de choque termico hsp20	-0,272
SSO1141	Proteína relacionada a proteasa	-0,272
Clusters Fe-S		
SSO7239 / SSO95	Proteína no caracterizada / Proteína no caracterizada	0,289
SSO10788	Proteína no caracterizada	0,297
SSO0927	Proteína no caracterizada (proteína de ensamblaje de cluster Fe-S SufB)	-0,307

Metabolismo redox

Resulta llamativa la disminución de varias proteínas que tienen que ver con el metabolismo redox, como, por ejemplo, la codificada por el gen SSO2121, una Peroxiredoxina reportada como aumentada anteriormente en un análisis de proteómica de la cepa WT versus la PoliP (-

) en células planctónicas (Soto y col., 2019). Sin embargo, esa misma proteína aparece aumentada en células planctónicas en comparación con las sésiles en la mutante PolIP (-), lo que sugiere una posible mayor tolerancia al estrés oxidativo en condición de biopelícula. En la WT no varía en estas condiciones. Esta peroxidasa participa en la respuesta a peróxido exógeno (Maaty y col., 2009). La proteína relacionada con la formación / expresión de hidrogenasas (SSO2708) también aparece disminuida.

Tiorredoxinas

La proteína TrxA-2 (SSO2232), una tiorredoxina que corresponde al sistema de reparación de proteínas, también se encuentra disminuida. Esta proteína actúa oxidándose para llevar los grupos S de cisteínas o metioninas de un estado oxidado a uno reducido para evitar la pérdida de estructura de las proteínas. Para volver a su estado reducido, actúa sobre ella la enzima tiorredoxina reductasa (TrxB-3) que consume NADPH (fig. 28 y tabla 28) (Cárdenas y col., 2012). La TrxB-3 (SSO2416) aparece aumentada en estas condiciones. También en esta misma categoría aparece aumentada la Ferredoxina NADP reductasa (SSO2222), también anotada como una tiorredoxina reductasa (TrxB-1).

Quizá esta expresión diferencial se deba a una necesidad de ahorrar en cantidad de proteínas, pero logrando que estas actúen de manera más eficiente. Así, el aumento en TrxB-1 y TrxB-3 permitiría que la cantidad de TrxA-2 existente, se reduzca rápidamente para volver a actuar, sin necesidad de gastar en producir TrxA-2. En la fig. 29 se esquematiza el mecanismo de acción de las tiorredoxinas.

La proteína no caracterizada codificada por el gen SSO2204 posee un dominio de tiorredoxina y al igual que TrxA-2, se encuentra disminuida en estas condiciones.

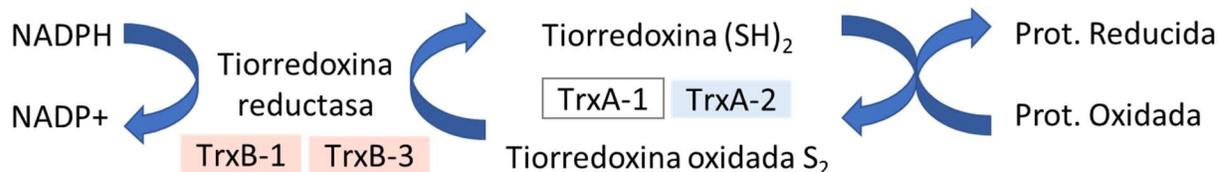


Figura 28. Metabolismo de tiorredoxinas y proteínas diferencialmente expresadas en células sésiles de *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT.

Tiorredoxina reductasa TrxB-1 (SSO2222) TrxB-3 (SSO2416) y Tiorredoxina TrxA-2 (SSO2232).

Reciclaje de proteínas / Chaperonas

El proteosoma es una estructura encargada de la degradación de proteínas mal plegadas, dañadas o mal sintetizadas (Maupin-furrow, 2011). En la proteómica encontramos la subunidad alfa del proteosoma (SSO0738) aumentada en la cepa PoliP (-) con respecto a la WT en biopelículas.

La proteasa homóloga a HtpX (SSO3231), sin embargo, aparece disminuida. Esta proteína está anotada como una Small Heat Shock Protein. También, la proteína Hsp20 codificada por el gen (SSO2427) aparece disminuida. Esta misma proteína aparece aumentada en la proteómica de biopelículas de *S. solfataricus*, *S. tokodai* y *S. acidocaldarius* (Koerdt y col., 2011) Otras proteínas relacionadas a proteasas son la codificada por el gen SSO1141 que aparece disminuida.

Ensamblaje de cluster Fe-S

Por análisis bioinformáticos hemos encontrado que las proteínas no caracterizadas codificadas por los genes SSO9500 y SSO10788 poseen dominios de sulfuro transferasas y

100% de identidad con proteínas de la familia SirA, una proteína reguladora de la formación de enlaces disulfuro (Auernik y Kelly, 2008). Ambas aparecen aumentadas en la proteómica (tabla S6, categoría Procesamiento y almacenamiento de la información. Modificaciones post traduccionales, recambio proteico y chaperonas). Podrían actuar devolviendo a las proteínas con enlace disulfuro a su estado reducido ante el estrés oxidativo.

La proteína no caracterizada, codificada por el gen SSO0927, posee similitud con la Proteína de Ensamblaje de Cluster Fe-S SufB. Esta proteína se encuentra disminuida en nuestra proteómica (tabla S6). Su función es la de ayudar en el ensamblaje de los centros Fe-S en las proteínas (Outten, 2015).

Proteínas pobremente caracterizadas

En total, se detectaron cambios en 36 proteínas pobremente caracterizadas o de función desconocida, 9 aumentando y 27 disminuyendo sus niveles de expresión (Tabas S6 y S7 del Anexo 5).

Una oxidorreductasa de la familia de las aldo/ceto reductasas (SSO3209) se encontró aumentada.

Se encontró disminuida la proteína codificada por el gen SSO1388, el cual también se había reportado disminuido en presencia de níquel en *S. solfataricus* en cél. Sésiles (Salzano y col., 2007). La proteína codificada por SSO0886 se encontraba disminuida, mientras que en respuesta a Ni había aumentado. Se desconoce que función cumpliría.

Entre las proteínas que aumentan en ambas condiciones, sésil y plantónica, se encuentra la flavoproteína Piridina nucleótido disulfito oxidorreductasa (SSO2629). También encontramos coincidencias en ambas en proteínas no caracterizadas SSO2410, SSO0171 que aumentan su expresión, mientras que SSO1812 y SSO1005 disminuyen en ambas.

5.3.3 Comparación proteómica *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT, en células sésiles y planctónicas

Se compararon las proteínas expresadas de manera diferencial en PoliP (-) con respecto a la WT, tanto en las condiciones planctónicas como sésiles. Se distingue que las categorías enriquecidas en cada condición son diferentes (fig. 29). Por ejemplo, la categoría de proteínas que se ve más sobre expresada en las células planctónicas es la de energía y conversión de energía, donde se encuentran las enzimas del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones. Sin embargo, en células sésiles, la categoría funcional más representada es la de transporte y metabolismo de lípidos, que quizá tenga que ver con la producción de EPS, y se relacione con una mayor producción de EPS por célula como nuestros experimentos de microscopía lo sugieren.

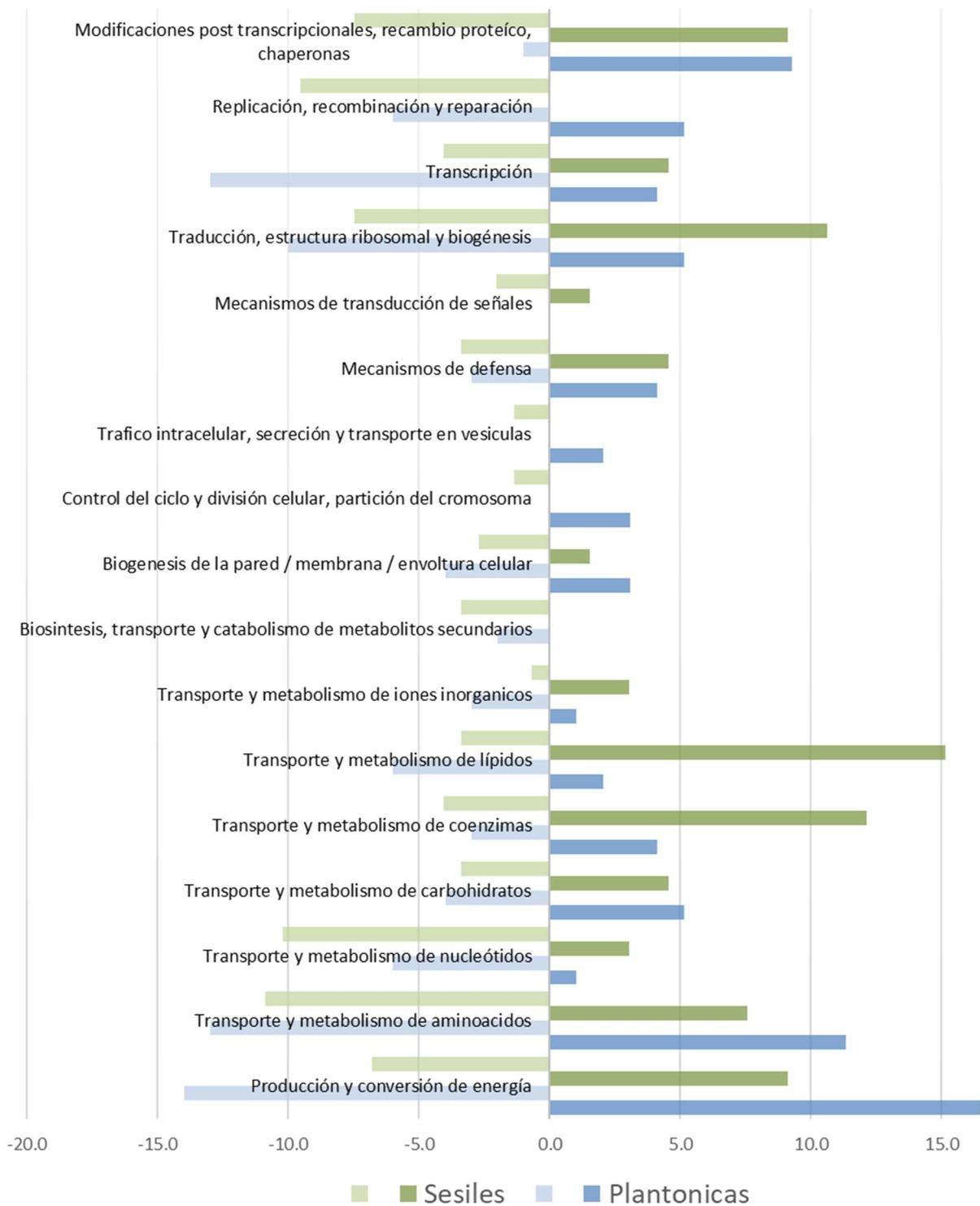


Figura 29. Gráfico comparativo del porcentaje de proteínas correspondiente a cada categoría funcional en las proteómicas PoliP (-) versus WT, en células planctónicas y sésiles.

Diferencias a nivel metabólico en la respuesta a la falta de PoliP entre las células sésiles y planctónicas

Al comparar las proteómicas de células sésiles PoliP (-) versus WT, con la proteómica de células planctónicas, se observan diferentes respuestas a nivel del metabolismo de producción de energía y otras vías (fig. 30).

En las células planctónicas, la respuesta metabólica se asemeja al trabajo publicado previamente en nuestro laboratorio de proteómica ICPL (Soto y col., 2019) donde se vio un aumento de la NADH deshidrogenasa, además de otras proteínas pertenecientes a la cadena de transporte de electrones para la generación de ATP.

En células planctónicas hay una disminución en los niveles de las proteínas que catalizan los pasos del ciclo de Krebs en las células PoliP (-) con respecto a la condición WT. En el caso de las células sésiles, sin embargo, hay un aumento en los niveles de varias proteínas del ciclo. Además, en las planctónicas se observa también una disminución en las enzimas que forman parte de la vía del glioxilato.

En la cadena de transporte de electrones también se observan diferencias, en este caso, una unidad de la NADH deshidrogenasa se ve aumentada en planctónicas mientras que en sésiles dos subunidades de esta enzima se ven disminuidas.

En general observamos un metabolismo más favorecido a la producción de ATP por fosforilación a nivel de sustrato en las células sésiles PoliP (-), mientras que en las planctónicas está más favorecida la fosforilación oxidativa.

En células planctónicas hemos visto anteriormente que varios transportadores de azúcar que consumen ATP disminuyen sus niveles (Soto y col., 2019). En el presente estudio, este comportamiento ocurre tanto en células sésiles como planctónicas, por lo que el gasto de ATP en ambos estilos de vida sería menor en la cepa de *S. solfataricus* que carece de PoliP.

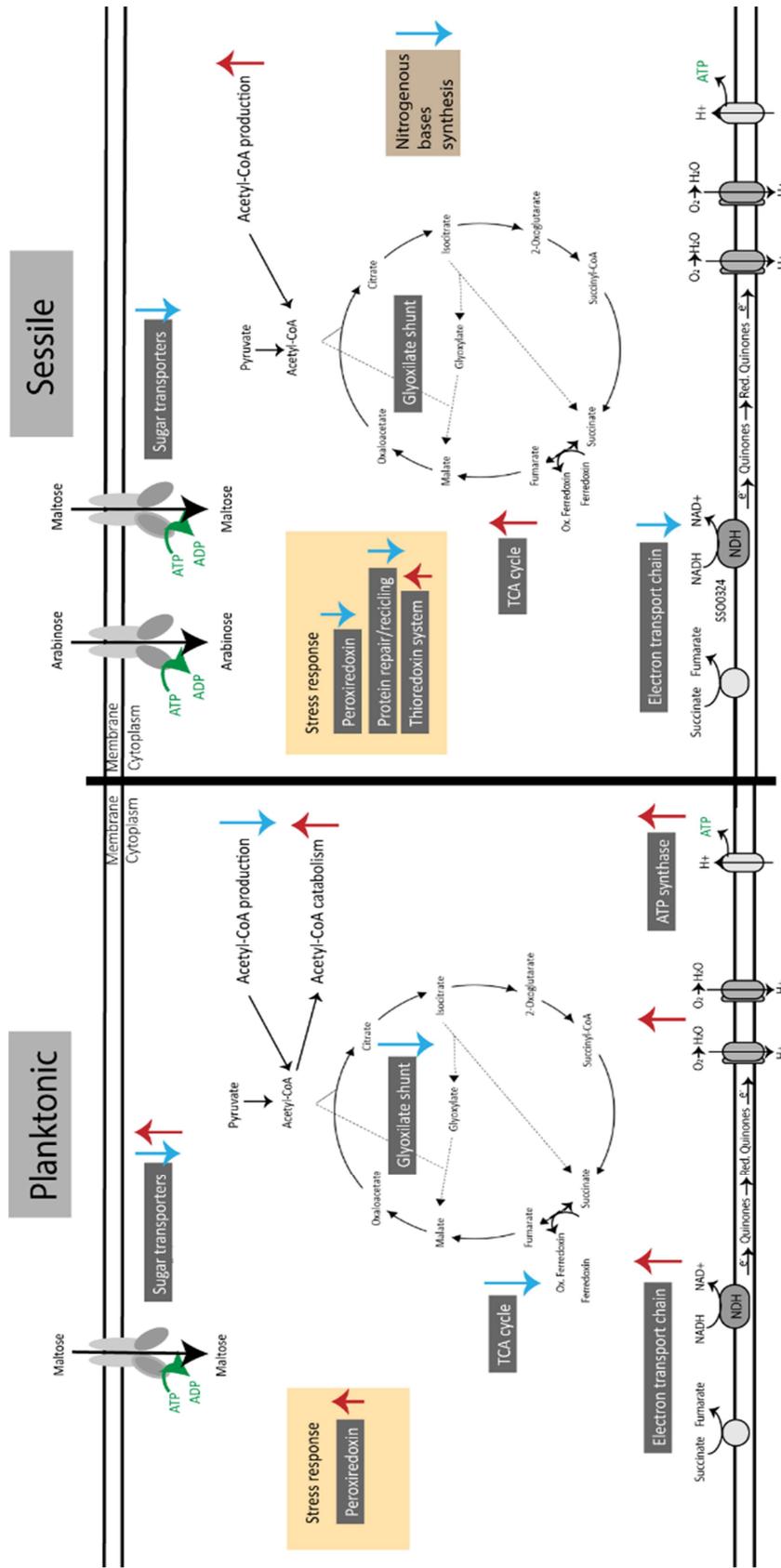


Figura 30. Comparación de los cambios generales observados en las principales categorías metabólicas de interés en las proteómicas de células PolIP (-) versus WT en estado de vida planctónico y sésil.

También se ven disminuídas las proteínas de las vías de síntesis de bases nitrogenadas (fig. 27), lo que podría indicar una menor síntesis de ácidos nucleicos en la cepa PoliP (-) al compararla con la WT en células sésiles, no así en las planctónicas. En general se ve un metabolismo más disminuido en células sésiles al compararlas con las planctónicas, esto podría deberse al estado de vida mismo de biopelícula, donde la célula podría tener menor requerimiento energético.

5.4 Niveles de PoliP en biopelícula de *S. solfataricus*

En la proteómica de células planctónicas versus sésiles en M16 (datos no mostrados) se encontró aumentada la enzima PPX. El valor de veces de cambio es de 0,27. En cambio, en la proteómica donde se contrastan ambos estilos de vida en la cepa M16PPX [PoliP (-)] no se detecta una expresión diferencial de la PPX entre células sésiles y planctónicas, probablemente enmascarada por la sobre expresión de la enzima en la cepa PoliP (-).

Se midieron los niveles de PoliP durante 6 días de desarrollo de una biopelícula de *S. solfataricus* M16. Se observa en la fig. 31 que los niveles del polímero disminuyen durante los días 3, 4 y 5 en modo de vida sésil, para luego volver a su nivel habitual en el día 6.

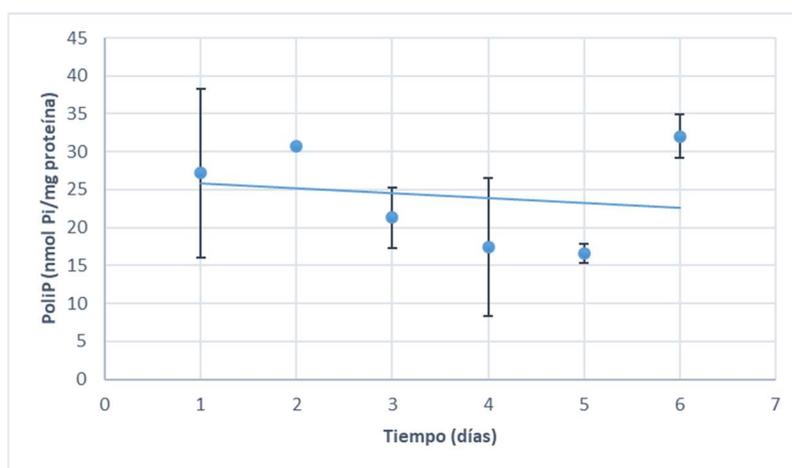


Figura 31. Niveles de PoliP en biopelícula de *S. solfataricus* M16 a lo largo de varios días de desarrollo.

Por datos de nuestro laboratorio, se sabe que en fase exponencial de crecimiento planctónico de *S. solfataricus*, los PoliP alcanzan un valor de aproximadamente entre 30 a 35 nmol Pi/mg proteína, mientras que en fase estacionaria alcanza 20 nmol Pu/mg proteína. En el día 3 de crecimiento de la biopelícula, momento en el que se tomó la muestra para los análisis de proteómica, los niveles de PoliP son de aproximadamente 20 nmol Pi/mg proteína, lo que se corresponde con los niveles de la fase estacionaria.

Estos cambios en los niveles de PoliP no cuadran con lo esperado a partir de los resultados de proteómica, ya que la enzima que los degrada (PPX) está aumentada en este estilo de vida planctónico. Sin embargo, los niveles más bajos de PoliP en la biopelícula también podrían deberse a un cambio en la actividad de la PPX, o a su uso por otras enzimas.

5.5 Niveles de ATP y ATP/ADP en células planctónicas PoliP (-) y WT de *S. solfataricus*

Dado que los resultados de la proteómica sugieren una posible adaptación de la célula para mantener sus niveles de ATP constantes, se decidió medir las cantidades de ATP y ADP por miligramo de proteína y la razón ATP/ADP mediante la reacción de la luciferasa. Los resultados se exponen en la fig. 32.

En la fig. 32A se observa que no existen diferencias entre las razones de ADP/ATP. Esta razón se utiliza muchas veces para determinar si existe proliferación o muerte celular. No existen datos previos de los valores de la razón ADP/ATP para *S. solfataricus* en la literatura, por lo cual no se puede inferir respecto al estado de las células. Sin embargo, cabe aclarar que todos los cultivos se encontraban en fase exponencial de crecimiento al momento de empezar el experimento.

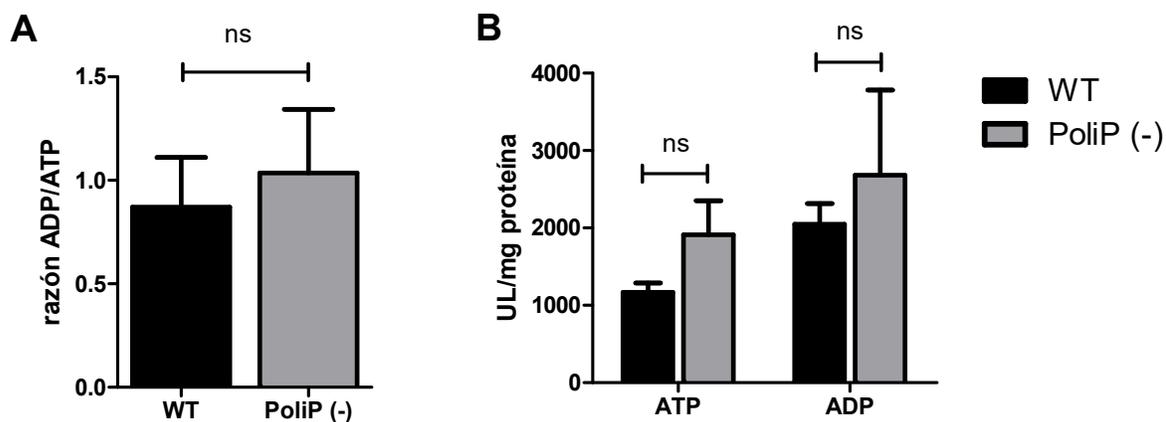


Figura 32. Niveles de ATP, ADP y razón ATP/ADP en células planctónicas de *S. solfataricus* PoliP (-) y WT. A. Razón ADP/ATP, B. Niveles de ATP y ADP por miligramo de proteína.

Análisis estadístico t-de student, en donde ns = no significativo, con confianza de 95%.

Los niveles de ATP y ADP se estandarizaron por la cantidad total de proteína de cada cultivo. Tampoco se observan diferencias significativas en los niveles de ATP o ADP entre las células PoliP (-) y WT (fig. 32B), aunque si se observa un leve aumento de ambos nucleótidos en la cepa PoliP (-).

Es posible que los cambios observados en la proteómica, como la mayor expresión de la ATP sintasa y proteínas de la cadena de transporte de electrones, explique la mantención e incluso un ligero aumento de los niveles de estos nucleótidos en la cepa PoliP (-). Además, *S. solfataricus* no posee niveles del polímero tan altos comparado con otros microorganismos. Este resultado rechaza la idea de que la menor motilidad observada en la cepa PoliP (-) se deba a una carencia energética, al menos de ATP.

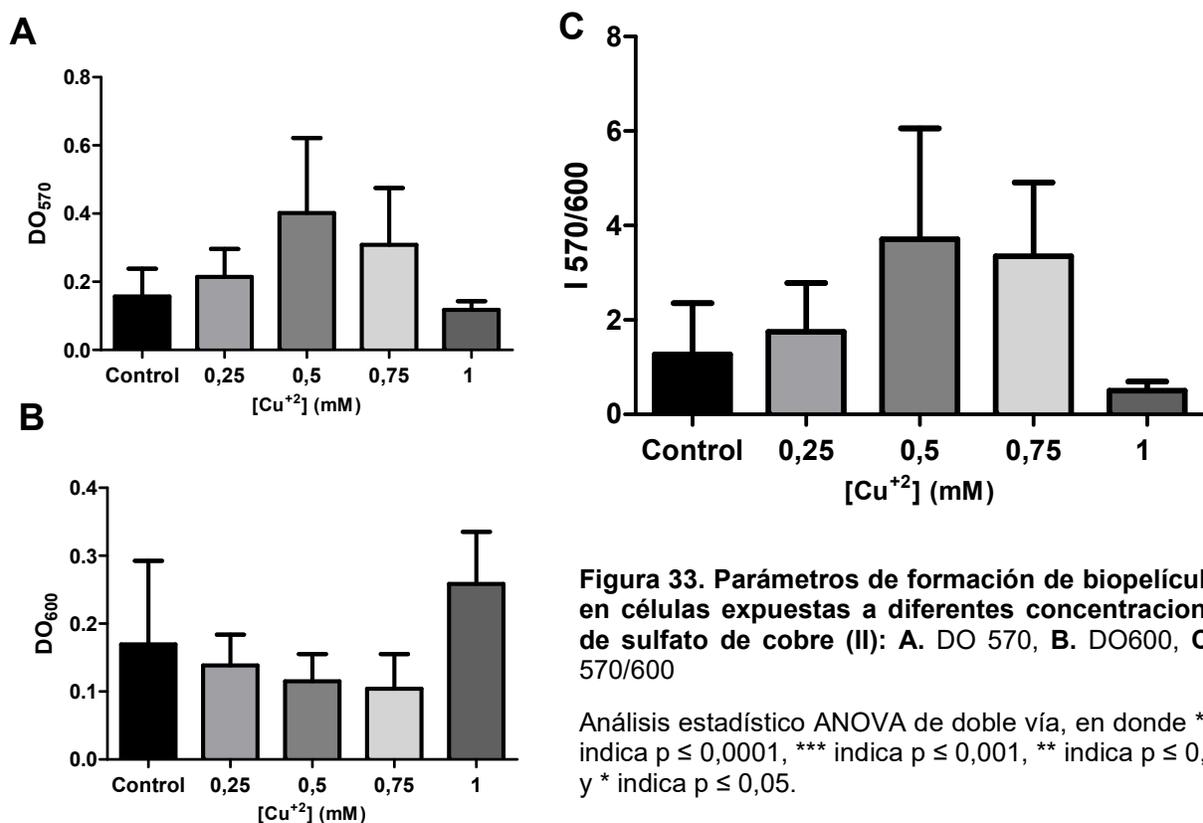
5.6 Efecto del Cu^{2+} sobre la formación de biopelículas y la síntesis de exopolisacáridos de la matriz en *S. solfataricus*.

5.6.1 Efecto del Cu^{2+} sobre el crecimiento de biopelículas.

Para estudiar el efecto del Cu^{2+} sobre biopelículas ya formadas, se trabajó con placas de 12 pocillos en las que se inoculó la cepa WT de *S. solfataricus* y, tras 2 días de crecimiento, se filtró el medio para eliminar las células planctónicas y se añadió de vuelta el medio libre de células además de una determinada cantidad de Sulfato de Cobre (II). Para cada concentración de Cu^{2+} se utilizó una placa, por lo que se realizaron 12 réplicas por concentración. La DO_{600} y DO_{570} se midieron tras dos días de exposición al metal.

En la fig. 33 se observa que las concentraciones de Cu^{2+} utilizadas, en general, promovieron la formación de biopelícula, ya que se registró un aumento en la cantidad de biopelícula formada con respecto a la condición control (fig. 33A y C) observándose el mayor índice $\text{DO}_{570}/\text{DO}_{600}$ al añadir 0,5 mM del metal. Además, se observa que el crecimiento a DO_{600} no sufre mucha variación (fig. 33B), pero sí la absorbancia del cristal violeta a 570.

En el caso de la concentración 1 mM de Cu^{2+} , se observa un aparente mayor crecimiento en las células planctónicas que en biopelícula. Esto podría deberse a que la toxicidad del Cu^{2+} es tal a esa concentración, que en realidad las células se liberan de la biopelícula tratando de alejarse del metal y por tanto hay más células planctónicas.



5.6.2 Análisis de los niveles de transcrito mediante qRTPCR de genes seleccionados

en *S. solfataricus* WT crecido en presencia de cobre

Mediante qRTPCR se analizaron los niveles de transcrito de algunos genes relacionados al estilo de vida sésil para estudiar si la expresión de los mismos es afectada por la presencia de Cu²⁺. Para ello, las biopelículas se crecieron en placas de Petri grandes según lo mencionado en materiales y métodos, y el sobrenadante se filtró al segundo día, momento en el cual se agregó Cu²⁺ a diferentes concentraciones. La extracción de ARN se realizó a partir de las células sésiles tras 24 horas de exposición al metal. Para los cálculos de expresión relativa se consideró como condición control los niveles de expresión de WT plantónica sin cobre (fig. 34).

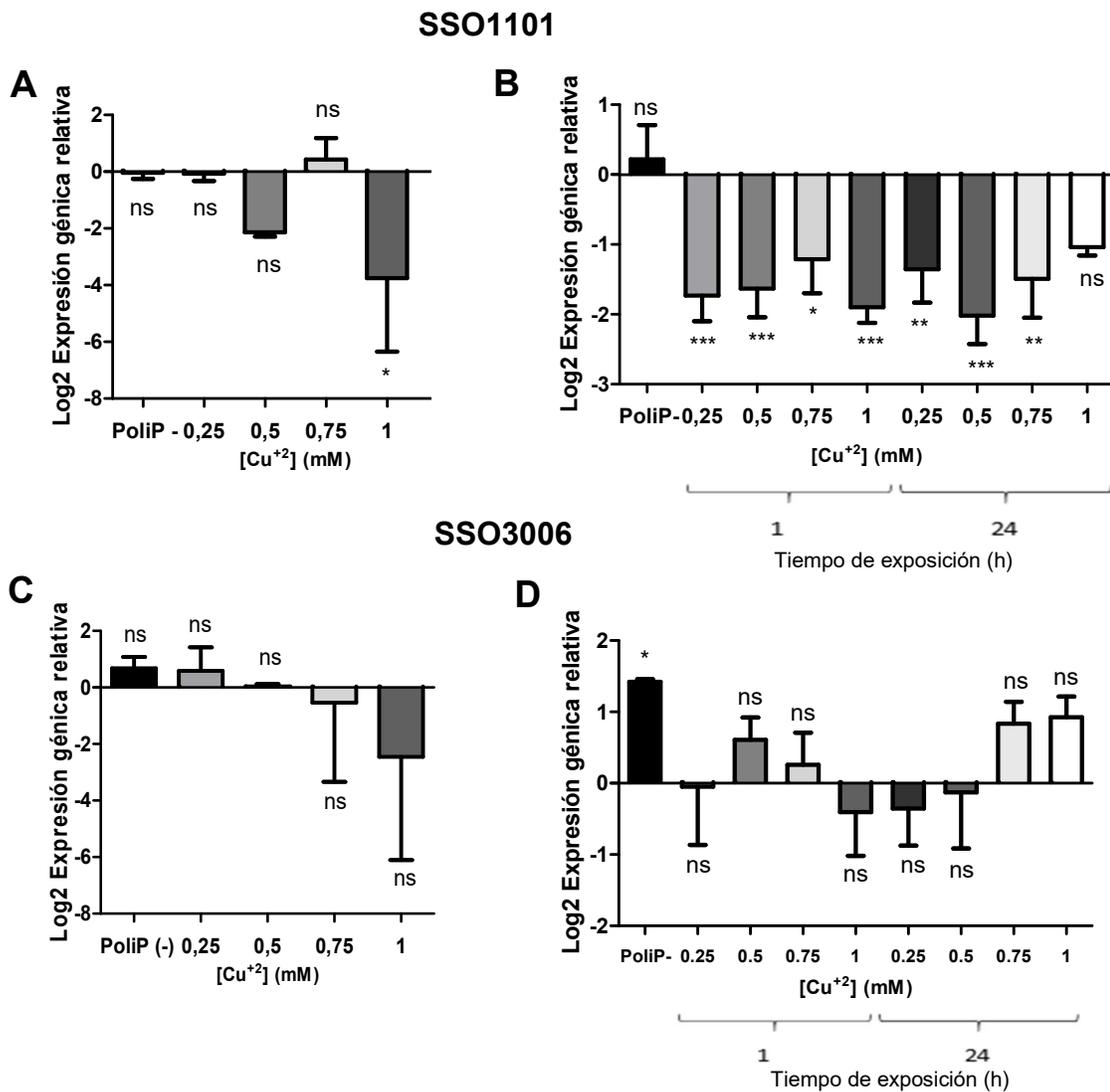


Figura 34. Expresión génica relativa de SSO1101 y SSO3006 en células sésiles y planctónicas WT y PolIP (-) expuestas a cobre. SSO1101: A. Células sésiles tras 24 horas de exposición al metal, **B:** Células planctónicas tras 1 o 24 horas de exposición. **SSO3006 C:** Células sésiles tras 24 horas de exposición al metal, **D:** Células planctónicas tras 1 o 24 horas de exposición. Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde **** indica $p \leq 0,0001$, *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$, * indica $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

Ya que no se observaron cambios significativos en la expresión del gen SSO1101, posible regulador positivo de la formación de biopelículas (fig. 34A), ni una tendencia en los niveles de expresión conforme a las concentraciones de exposición (fig. 34A), se realizó la extracción de

ARN a partir de las células planctónicas a las 1 y 24 horas de exposición al metal. En este caso, se observó una disminución en la expresión del gen en todas las condiciones (fig. 34B).

En estas condiciones también se midió la expresión del gen SSO3006, que codifica para una alfa manosidasa que estaría involucrada en la síntesis de EPS (fig. 34C y D) (Koerdt y col., 2012). Se ha descrito que la expresión de este gen se encuentra aumentada en células adheridas a vidrio (Zolghadr y col., 2010). En las condiciones estudiadas no se observa una tendencia clara, aunque se observa un ligero aumento en células PoliP (-) no expuestas a Cu^{2+} (fig. 34C y 34D), y en WT planctónicas tras 1 h de exposición a 0,5 mM de Cu^{2+} y 24 h de exposición a 0,75 y 1 mM (fig. 34D), aunque estos aumentos no son estadísticamente significativos.

También se midieron los niveles de expresión del gen de la arqueolina, donde se observa un aumento cuando se exponen las células planctónicas a Cu^{2+} durante 24 h (fig. 35).

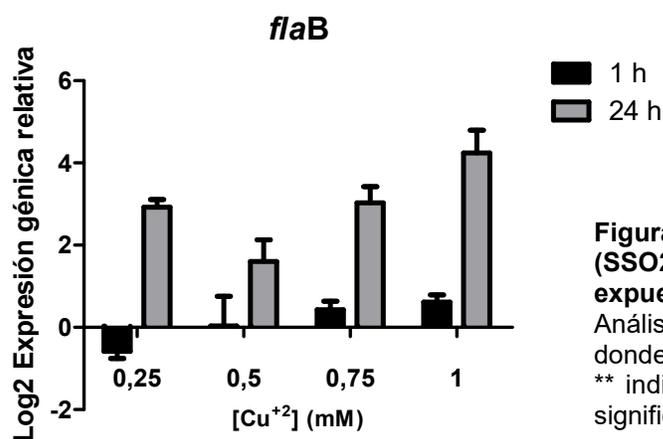


Figura 35. Expresión génica relativa de *flaB* (SSO2323) en células planctónicas WT expuestas a cobre durante 1 y 24 h.

Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde **** indica $p \leq 0,0001$, *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$, * indica $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

Esto concordaría con nuestros resultados del aumento de la expresión de la arqueolina en células sésiles (fig. 10) y el aumento en la formación de biopelículas a mayores concentraciones de cobre (fig. 35). Quizás esta respuesta recién a las 24 h y no a 1 h se deba

a que la formación de biopelícula sea un mecanismo de defensa secundario contra el metal, que se active de manera retrasada después de la del sistema Cop y de la hidrólisis de PoliP.

Se midió la expresión del gen que codifica para CopA, una ATPasa transportadora de cobre que constituye un mecanismo de resistencia contra este metal en la arquea (Ettema y col., 2006). Se determinó la expresión en células de biopelícula tras 24 horas de exposición al metal, y no se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión. Como condición control se utilizaron los niveles de expresión de *copA* en biopelícula de la cepa WT sin cobre, ya que en esta condición *copA* se encuentra disminuida al comparar con las células planctónicas (no mostrado).

Al medir en células planctónicas tras 1 y 24 h de exposición a Cu^{2+} , se observa una clara tendencia al aumento en los niveles de expresión de *copA* con la concentración y con el tiempo, obteniéndose los mayores niveles a 1 mM Cu^{2+} y 24 horas de exposición (fig. 36).

Si comparamos la condición sésil con la planctónica, podemos observar una menor inducción del gen en la condición de biopelícula (fig. 36), lo cual iría en congruencia con la hipótesis del efecto protector de este estilo de vida frente al estrés por metales.

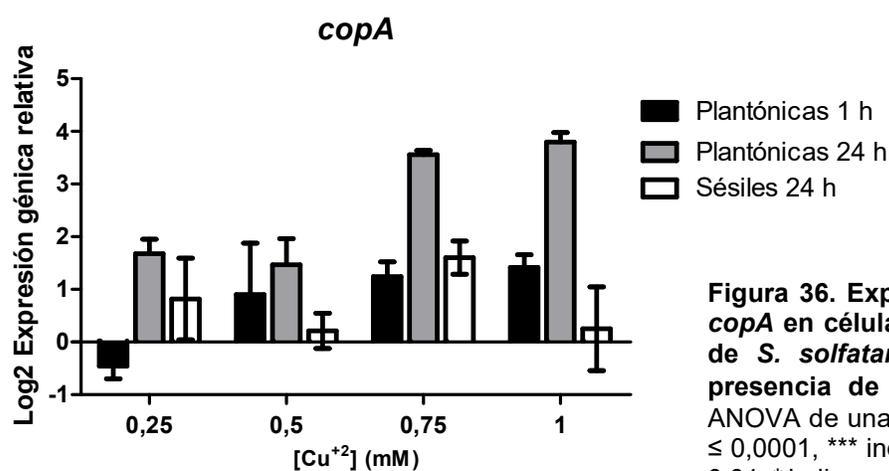


Figura 36. Expresión génica relativa de *copA* en células sésiles y planctónicas, de *S. solfataricus* WT y PoliP (-) en presencia de Cu^{2+} . Análisis estadístico ANOVA de una vía, en donde **** indica $p \leq 0,0001$, *** indica $p \leq 0,001$, ** indica $p \leq 0,01$, * indica $p \leq 0,05$ y ns = no significativo.

5.6.3 Microscopía Confocal Laser de biopelículas de *S. solfataricus* expuesto a Cu

Se realizaron ensayos de Microscopía Confocal Laser para observar la morfología de las biopelículas en presencia de Cu. Para ello se crecieron biopelículas de *S. solfataricus* M16 por 3 días en presencia de 0,5 mM del metal, debido a que a esa concentración se había detectado la mayor cantidad de biopelícula por tinción con cristal violeta (fig. 37). Las biopelículas se tiñeron con IB4, ConA y DAPI como se había descrito anteriormente.

En la fig. 37 se observan dos fotos representativas para comparar la condición control con la condición con Cu. Fotos adicionales se pueden encontrar en el Anexo 4, fig. S4 y S8.

Se observan diferencias en la cantidad e identidad de los exopolisacáridos, lo cual se traduce en la señal de las lectinas. En presencia de Cu, se nota una disminución en la señal de ConA (verde), la cual se une a residuos α -manopiranosilo y α -glucopiranosilo, y un aumento en la señal de IB4 (rojo), que se une a residuos α -D-galactosilo (fig. 37A).

En general la biopelícula generada en presencia de Cu^{2+} posee una mayor densidad celular y se encuentra más empaquetada que la biopelícula formada en ausencia del metal, donde se nota una estructura más laxa con menor cantidad de células. El grosor de la biopelícula también es diferente (fig. 37B), donde la formada en presencia de Cu^{2+} llega a los 10 μm y la que está formada en ausencia del metal supera esta medida, llegando incluso al doble del grosor.

También se observaron biopelículas de la cepa PoliP (-) en respuesta a Cu^{2+} mediante MCL. Como se aprecia en la fig. 38, la cepa PoliP (-) forma muy poca biopelícula en presencia de 0,5 mM de Cu^{2+} . De hecho, posee muy poca cantidad de azúcares. No se observan los clústeres de azúcar y células que sí se observan en ausencia del metal en esta cepa. El grosor de la biopelícula es muy bajo (fig. 38B).

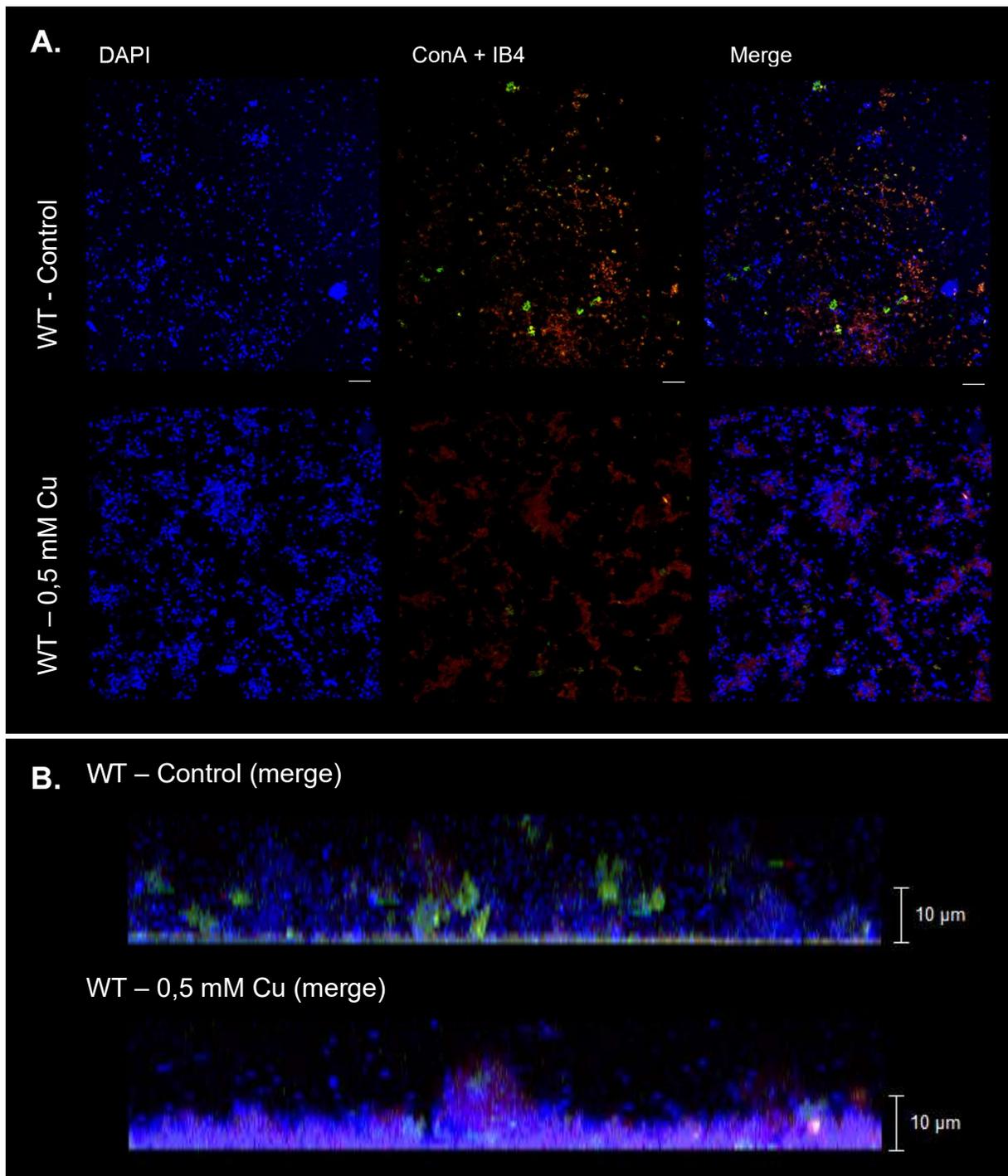


Figura 37. Efecto del cobre en la formación de biopelículas en *S. solfataricus* M16 (WT). Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de la cepa WT crecida en ausencia o presencia de 0,5 mM Cu. **A.** Vista superior. **B.** Vista en el eje Z de biopelículas. Aumento 63x. La barra indica 10 μm .

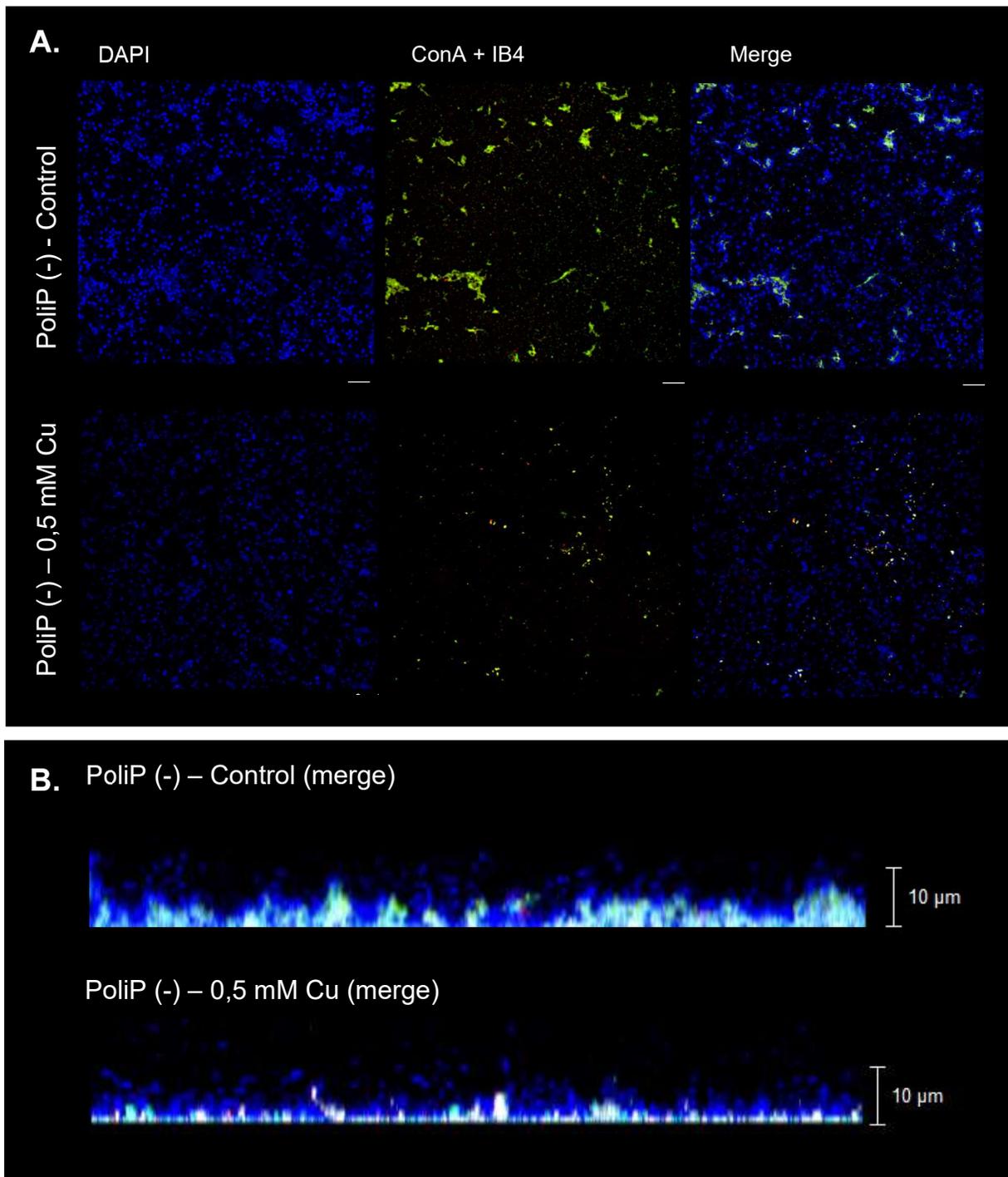


Figura 38. Efecto del cobre en la formación de biopelículas en *S. solfataricus* M16-PPX [PoliP (-)]. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de la cepa PoliP (-) crecida en ausencia o presencia de 0,5 mM Cu. **A.** Vista superior. **B.** Vista en el eje Z de biopelículas. Aumento 63x. La barra indica 10 μ m.

5.7 Proteómica iTRAQ en células sésiles y planctónicas con y sin Cu²⁺ en las cepas PoliP (-) y WT

5.7.1 Diseño de proteómica con Cobre

Para la proteómica con Cu²⁺ se llegó a la conclusión de realizar un experimento 8-plex con las siguientes condiciones: 0,5 mM Cu²⁺, 24 h de exposición al metal y la condición células WT planctónicas con Cu²⁺ como condición control:

- WT plantónica sin Cu²⁺ vs. WT plantónica con Cu²⁺
- PoliP (-) plantónica con Cu²⁺ vs. WT plantónica con Cu²⁺
- WT sésil con Cu²⁺ vs. WT plantónica con Cu²⁺

Las muestras se prepararon como se menciona en la sección de Materiales y métodos. Tal y como en la proteómica anterior, se tomaron aproximadamente 150 mg de proteína por réplica, se liofilizaron y se congelaron a -80°C para luego enviarlas al servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid, España, quienes realizaron el análisis iTRAQ.

5.7.2 Resultados

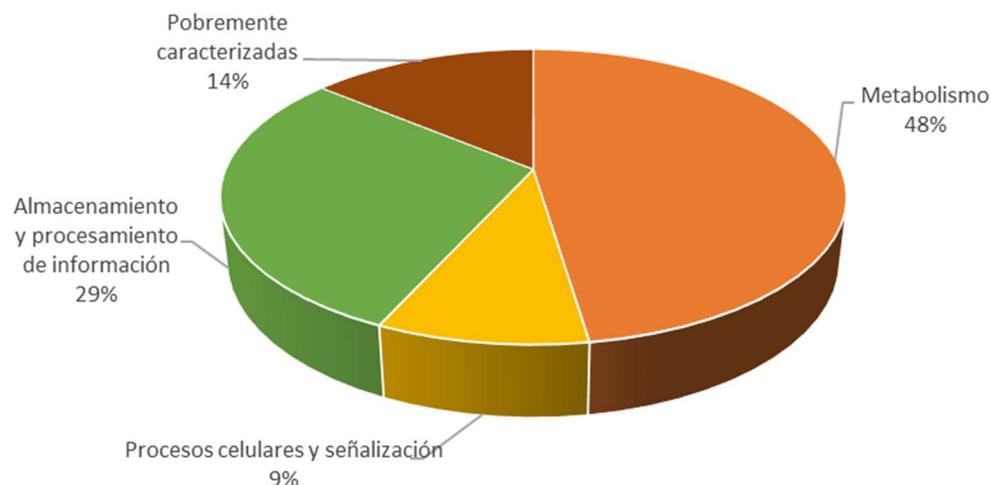
Los resultados generales se detallan en la tabla:

Tabla 13. Resultados de la proteómica iTRAQ con Cu²⁺. Número de proteínas identificadas y número de proteínas que se expresan diferencialmente, aumentando o disminuyendo.

	WT plantónica c/ Cu vs.		PoliP (-) plantónica c/ Cu
	WT plantónica	WT sesil c/ Cu	WT plantónica c/ Cu
Proteínas identificadas	1.048	1.047	1.046
Proteínas expresadas diferencialmente	442	317	145
Proteínas que aumentan	204	281	109
Proteínas que disminuyen	238	36	36

5.7.3 Proteómica iTRAQ de células WT planctónicas versus sésiles, ambas con Cu²⁺

A.



B.

Categoría funcional	n° prot.	prot. (+)	prot. (-)	%
Metabolismo	150	132	18	47,6
Producción y conversión de energía	45	43	2	14,3
Transporte y metabolismo de aminoácidos	48	37	11	15,2
Transporte y metabolismo de nucleótidos	8	7	1	2,5
Transporte y metabolismo de carbohidratos	17	15	2	5,4
Transporte y metabolismo de coenzimas	11	10	1	3,5
Transporte y metabolismo de lípidos	8	8	0	2,5
Transporte y metabolismo de iones inorgánicos	8	8	0	2,5
Biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios	5	4	1	1,6
Procesos celulares y señalización	29	28	1	9,2
Biogénesis de la pared / membrana / envoltura celular	11	10	1	3,5
Mecanismos de defensa	9	9	0	2,9
Control del ciclo y división celular, partición del cromosoma	3	3	0	1,0
Mecanismos de transducción de señal	6	6	0	1,9
Almacenamiento y procesamiento de información	92	78	14	29,2
Estructura y biogénesis del ribosoma de traducción	41	30	11	13,0
Transcripción	14	13	1	4,4
Replicación, recombinación y reparación	12	11	1	3,8
Modificaciones post transcripcionales, recambio proteico, chaperonas	25	24	1	7,9
Pobrementemente caracterizadas	44	43	1	14,0
Función desconocida	44	43	1	14,0
TOTAL	315	281	34	100

Figura 39. Categorías funcionales de las proteínas que expresan cambios en la proteómica iTRAQ células planctónicas versus sésiles en cepa M16 con Cu²⁺. A. Gráfico de torta. B. Desglose de las categorías funcionales

A continuación, discutimos algunos de los resultados más relevantes. Las tablas con la lista completa de proteínas se encuentran en el Anexo 4, tablas S8 y S9.

Metabolismo

A esta categoría corresponden la mayor cantidad de los cambios, los que a su vez son aumentos en la expresión de las proteínas (fig. 39).

Producción y conversión de energía

Tabla 14. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Metabolismo: Producción y conversión de energía.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Producción y conversión de energía		
Ciclo de Krebs/ Glioxilato shunt / Reacciones relacionadas		
SSO2059	Acetil-CoA sintetasa (Acetato-CoA ligasa) (AcsA-6)	0,383
SSO1333	Isocitrato liasa (AceA/icl)	0,481
SSO0897	Transaminasa A	-0,093
SSO0997	Aspartato oxidasa	1,028
SSO0534	Acetil-CoA c-acetiltransferasa (Acetoacetil-CoA thiolasa) (AcaB-1)	0,25
SSO2061	Acetil-CoA c-acetiltransferasa (Acetoacetil-CoA thiolasa) (AcaB-2)	0,141
SSO0286	Fructosa-1,6-bifosfato aldolasa/fosfatasa	0,356
SSO3003	Glucosa 1-deshidrogenasa 1	-0,278
SSO2816	2-oxoacido--ferredoxin oxidoreductasa, cadena beta	0,158
SSO2815	2-oxoacido--ferredoxin oxidoreductasa, cadena alfa	0,147
Cadena de transporte de electrones		
SSO0665	NADH deshidrogenasa, subunidad B (NuoB)	0,236
SSO0323	NADH deshidrogenasa, subunidad C (NuoC)	0,618
SSO0324	NADH deshidrogenasa, subunidad D (NuoD)	0,337
SSO0326	NADH deshidrogenasa, subunidad I (NuoI)	0,349
SSO0328	NADH deshidrogenasa, subunidad L (NuoL)	0,509
SSO0329	NADH deshidrogenasa, subunidad N (NuoN)	0,371
SSO2657	Quinol oxidasa (SoxABC), subunidad citocromo aa3 (SoxB)	0,454
SSO2656	Quinol oxidasa (SoxABC), subunidad citocromo B (SoxC)	0,433
SSO0560	ATP sintasa subunidad F (AtpF)	0,441
SSO0563	V-ATPasa subunidad A	0,108
SSO0564	V-ATPasa subunidad B	0,127
SSO0561	V-ATPasa subunidad E	0,635
SSO0559	V-ATPasa subunidad I	0,386
SSO2817	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidades alfa y beta (EtfAB/fixAB)	0,244
SSO2763	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad beta (EtfB)	0,153
SSO2356	Succinato deshidrogenasa, subunidad A (SdhA)	0,273
SSO2357	Succinato deshidrogenasa, subunidad B (SdhB)	0,307
SSO2358	Succinato deshidrogenasa, subunidad C (SdhC)	0,3

Se ve un aumento de varios componentes de la cadena de electrones (tabla 14 y fig. 40): las subunidades B, C, D, I, L y N, de la NADH deshidrogenasa (SSO0665, SSO0323, SSO0324, SSO0326, SSO0328, SSO0329), las subunidades A, B y C de la succinato deshidrogenasa (SSO2356, SSO2357 y SSO2358), las subunidades B y C de la quinol oxidasa (SSO2657, SSO2656), lo que se puede observar en la fig. 40.

También aumentan sus niveles varias proteínas del ciclo de Krebs y de la vía del glioxilato (fig. 39, tabla 14). Adicionalmente, la subunidad F de la ATP sintetasa (SSO0560) también se encontró aumentada.

Todos estos cambios sugieren una mayor necesidad para generar ATP en las células planctónicas con respecto a las sésiles en su respuesta al estrés por Cu²⁺.

Las subunidades A, B, E e I (SSO0563, SSO0564, SSO0561, SSO0559) de la ATPasa también se encuentran aumentadas (tabla 13).

Transporte y metabolismo de iones inorgánicos

Tabla 15. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Metabolismo, Transporte y metabolismo de iones inorgánicos.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Transporte y metabolismo de iones inorganicos		
SSO2244	Proteína reguladora de captura de hierro (Fur)	1,065
SSO2651	ATPasa transportadora de cationes (CopA)	0,289
SSO0356	Proteína reguladora de fosfato, putativa	0,129

Entre las proteínas de transporte de electrones se observa un aumento de la proteína Fur (SSO2244). En otros organismos, esta proteína se ha relacionado con la respuesta a estrés pues controlaría la expresión de ciertos genes como las superóxidos dismutasas (Cárdenas y col., 2012).

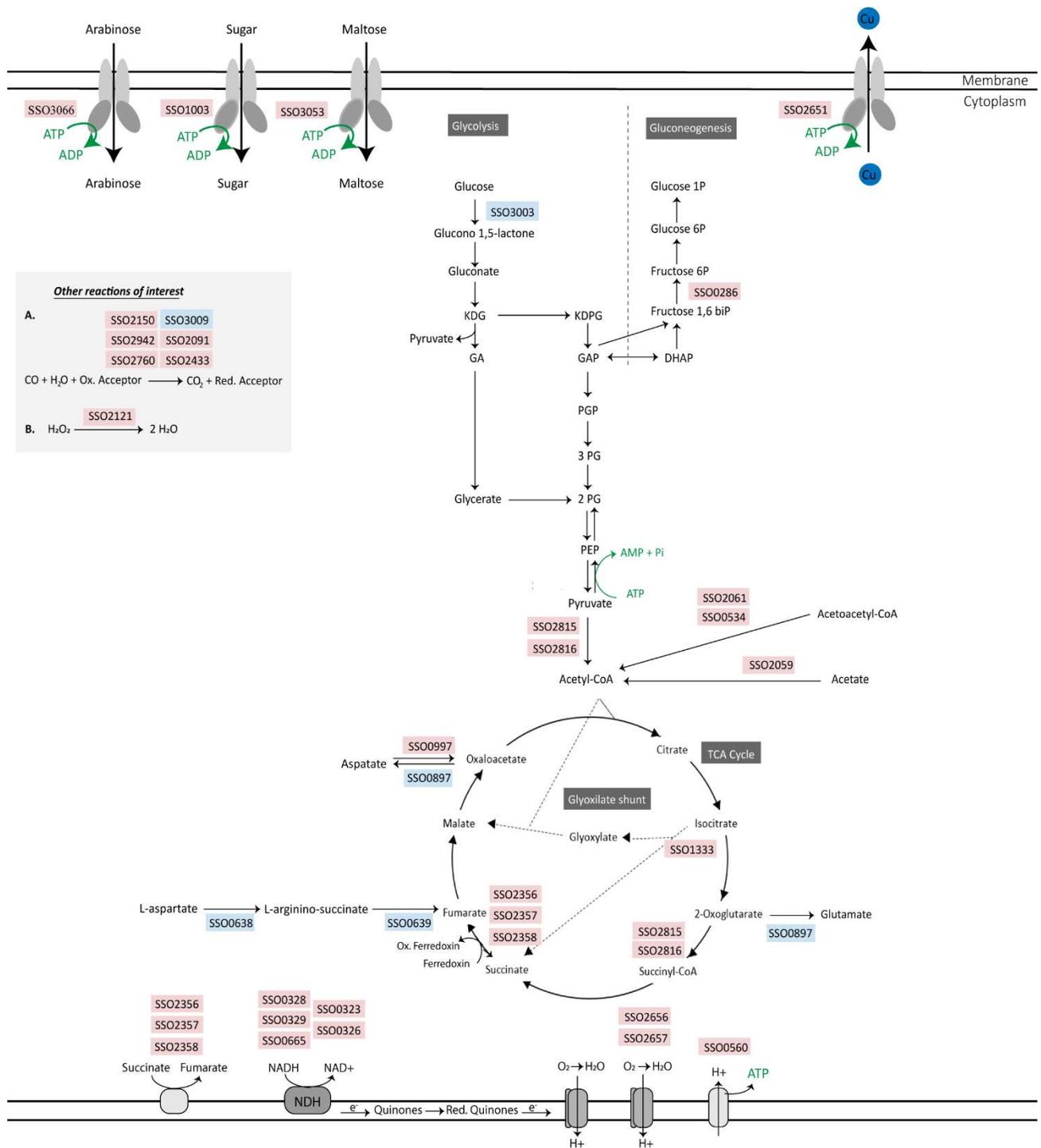


Figura 40. Rutas metabólicas afectadas por el Cu al comparar células planctónicas vs. sésiles de *S. solfataricus* WT.

En cuadros rosados, los genes que codifican a proteínas que aumentan: Transportador de arabinosa (SSO3066), transportador ABC de azúcar (SSO1003), transportador de maltosa (SSO3053), fructosa 1,6 bifosfato aldolasa (SSO0286), 2-oxoacido-ferredoxin oxidorreductasa cadena alfa (SSO2815) cadena beta (SSO2816), Acetil CoA acil transferasa AcaB-2 (SSO2061) AcaB-1 (SSO0534), Acetil CoA sintetasa (SSO2059), L aspartato oxidasa (SSO0997), Succinato deshidrogenasa subunidad A (SSO2356), subunidad B (SSO2357), subunidad C (SSO2358), isocitrato liasa (SSO1333), quinol oxidasa SoxB (SSO2657), SoxC (SSO2656), ATP sintasa suunidad F (SSO0560), monóxido de carbono deshidrogenasa CutA-1 (SSO2433), CutA-2 (SSO2091), CutA-3 (SSO2150), CutA-5 (SSO2760), CutA-6 (SSO2942), peroxidorexina (SSO2121), CopA (SSO2651)

En cuadros azules, las que se encuentran disminuidas: glucosa 1P deshidrogenasa (SSO3003), transaminasa (SSO0897), monóxido de carbono deshidrogenasa CutA-7 (SSO3009)

En esta categoría también se observa un aumento de CopA (SSO2651) en la condición plantónica con respecto a las células sésiles. Esta ATPasa es un mecanismo de resistencia a Cu^{2+} , como se mencionó anteriormente (Ettema et al., 2006). La otra ATPasa, CopB (SSO2896), se encuentra entre los péptidos detectados, pero no se detectan cambios. Esto iría en concordancia con la hipótesis de que la forma de vida biopelícula

También se observa el aumento de una proteína reguladora de fosfato (SSO0356) sobre la que no se tienen más detalles.

Proteínas relacionadas a estrés

Tabla 16. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Metabolismo.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Metabolismo		
Otras proteínas de respuesta a estrés		
SSO11231	Proteína similar a ferroxidoxina (Zfx-like2)	0,855
SSO2942/1209	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-6) / Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-1)	0,352
SSO2433	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena corta (CutC-1)	0,217
SSO2091	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-2)	0,231
SSO2150	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-3)	0,178
SSO2760	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-5)	0,221
SSO3009	Monóxido de carbono deshidrogenasa, cadena larga (CutA-7)	-0,147
SSO2776	Oxidoreductasa de transferencia de electrones	0,272
SSO2642	Ruberitrina	-0,345

Diversas proteínas relacionadas a estrés se encuentran aumentadas en la categoría de metabolismo. Varias cadenas de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (tabla 16) que participa en la reacción de reducción de aceptores de electrones oxidados, con la conversión de CO en CO_2 (Berg y col., 2010).

También aparecen aumentadas otras proteínas que transfieren electrones como las oxidoreductasas de ferroxiredoxinas (SSO2815, SSO2816) y una proteína similar a ferredoxina (SSO11231).

Procesos y señalización celular

Mecanismos de transducción de señal

En esta categoría, diversas proteínas con dominio de Proteína Universal de Respuesta a Estrés (USP) se encuentran aumentadas (tabla 17).

Tabla 17. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Procesos y señalización celular: Mecanismos de transducción de señal.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Procesos y señalización celular		
Mecanismos de transducción de señal		
SSO1865	Proteína con dominio USP	0,641
SSO3183	Proteína con dominio USP	0,513
SSO2778	Proteína con dominio USP	0,316

Biogénesis de pared, membrana y envoltura celular

La proteína de biosíntesis de sulfolípidos (SqdB) (SSO2583) se encuentra disminuída en las células planctónicas con respecto a las sésiles cuando ambas están en presencia de Cu²⁺. Esta proteína está involucrada en la glicosilación del arqueolo en *S. acidocaldarius* (Meyer y col., 2011). También se ha visto que la no glicosilación del arqueolo llevaría a adhesión y motilidad deficientes en estos organismos.

Procesamiento y almacenamiento de información

Replicación, recombinación y reparación

Las proteínas Rad50 y HerA, son proteínas sello de la respuesta a estrés (Cárdenas y col., 2012) que en nuestros experimentos se encuentran aumentadas en las células planctónicas con respecto a las células sésiles cuando ambas son sometidas a la misma concentración de Cu^{2+} (tabla 18).

Tabla 18. Selección de las tablas S5 y S6, categoría: Procesamiento y almacenamiento de información: Replicación, recombinación y reparación.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Almacenamiento y procesamiento de la información		
Replicación, recombinación y reparación		
SSO2249	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	0,281
SSO2251	DNA double-strand break repair helicase HerA	0,224
SSO10610/SSO9535	DNA-binding protein 7d/DNA-binding protein 7a	0,127

La proteína sso7d (SSO10610) también se ha encontrado aumentada. Esta proteína se ha descrito que participa en el rescate de proteínas dañadas consumiendo ATP (Guagliardi y col., 2000).

Modificaciones post traduccionales, recambio proteico y chaperonas**Tabla 19.** Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Procesamiento y almacenamiento de información: Modificaciones post traduccionales, recambio proteico y chaperonas.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Almacenamiento y procesamiento de la información		
Modificaciones post-traduccionales, chaperonas y recambio proteico		
Reciclaje de proteínas / Chaperonas		
SSO0862/SSO3000	Subunidad 1 del termosoma / Subunidad 3 del termosoma	1,115
SSO3000	Subunidad 3 del termosoma	0,888
SSO0282	Subunidad 2 del termosoma	0,888
SSO0862	Subunidad 1 del termosoma	0,846
SSO1141	Proteína relacionada a proteasa	0,441
SSO2427	Proteína pequeña de choque de calor hsp20	0,312
SSO0278	Proteína del core del proteosoma PsmB 1	0,091
Tiorredoxinas		
SSO2416	Tiorredoxina reductasa (TrxB-3)	-0,135
SSO2204	Proteína con dominio Thioredox_DsbH	0,512
SSO0314	Proteína con dominio similar a tiorredoxina	0,234
Metabolismo redox		
SSO2613	Peroxiredoxina (Bcp-4)	0,287
SSO2121	Peroxiredoxina	0,194

En la categoría de proteínas con función de “Modificaciones post traduccionales, recambio proteico y chaperonas” se observan varias proteínas de respuesta a estrés aumentadas, como por ejemplo las diversas subunidades del termosoma (SSO0862, SSO0282, SSO3000). Proteínas del sistema tiorredoxina o con dominio de tiorredoxina (SSO2204 y SSO0314), proteínas de choque térmico (SSO2427), peroxirredoxinas (SSO2613 y SSO2121), proteínas del “core” del proteosoma (SSO0278), proteínas relacionadas a proteasa (SSO1141) o proteosoma (SSO0278).

Únicamente una tiorredoxina reductasa (TrxB-3) (SSO2416) se encuentra disminuida.

En conjunto estos resultados sugieren que las células planctónicas necesitan producir mas proteínas de respuesta a estrés que las células en estado sésil ante las mismas cantidades de

Cu²⁺ en el medio. Esto apoya la teoría de que el estado de vida biopelícula protege contra el estrés por metales.

Proteínas pobremente caracterizadas

Tabla 20. Selección de las tablas S8 y S9, categoría: Proteínas pobremente caracterizadas.

locus	Proteína	Log Veces de cambio
Pobremente caracterizadas		
SSO0389	Proteína de capa superficial	0,723
SSO2253	Proteína con dominio similar a ferritina	0,369
SSO2629	Oxidoreductasa (Flavoproteína)	0,178

En esta categoría se encontraron 29 proteínas no caracterizadas aumentadas, aunque en total suma 44 (43 aumentadas, 1 disminuída) teniendo en cuenta aquellas que están parcialmente caracterizadas.

En esta categoría también se encuentran, por ejemplo: una oxidorreductasa (SSO2629), una proteína de capa de superficie (SSO0389) y una proteína con dominio similar a ferritina (SSO2253).

5.7.3 Comparación de proteómicas con y sin cobre de células planctónicas versus sésiles

Al comparar las proteínas de las tablas de las proteómicas de células planctónicas versus sésiles con y sin Cu²⁺ en M16, se observan que son pocas las proteínas que coinciden entre ambas condiciones. En la fig. 41 se observan dos diagramas de Venn, el de tonos rojos corresponde a las proteínas que aumentan (fig. 41A), donde 13 proteínas coinciden; mientras que el de los tonos azules corresponde a las proteínas que disminuyen sus niveles de

expresión (fig. 41B). En la tabla (fig. 41C) se listan las proteínas que coinciden en ambos contrastes.

En su mayoría, las proteínas que aumentan en la condición con Cu^{2+} corresponden a proteínas transportadoras. También aparece aumentado en ambos contrastes un regulador

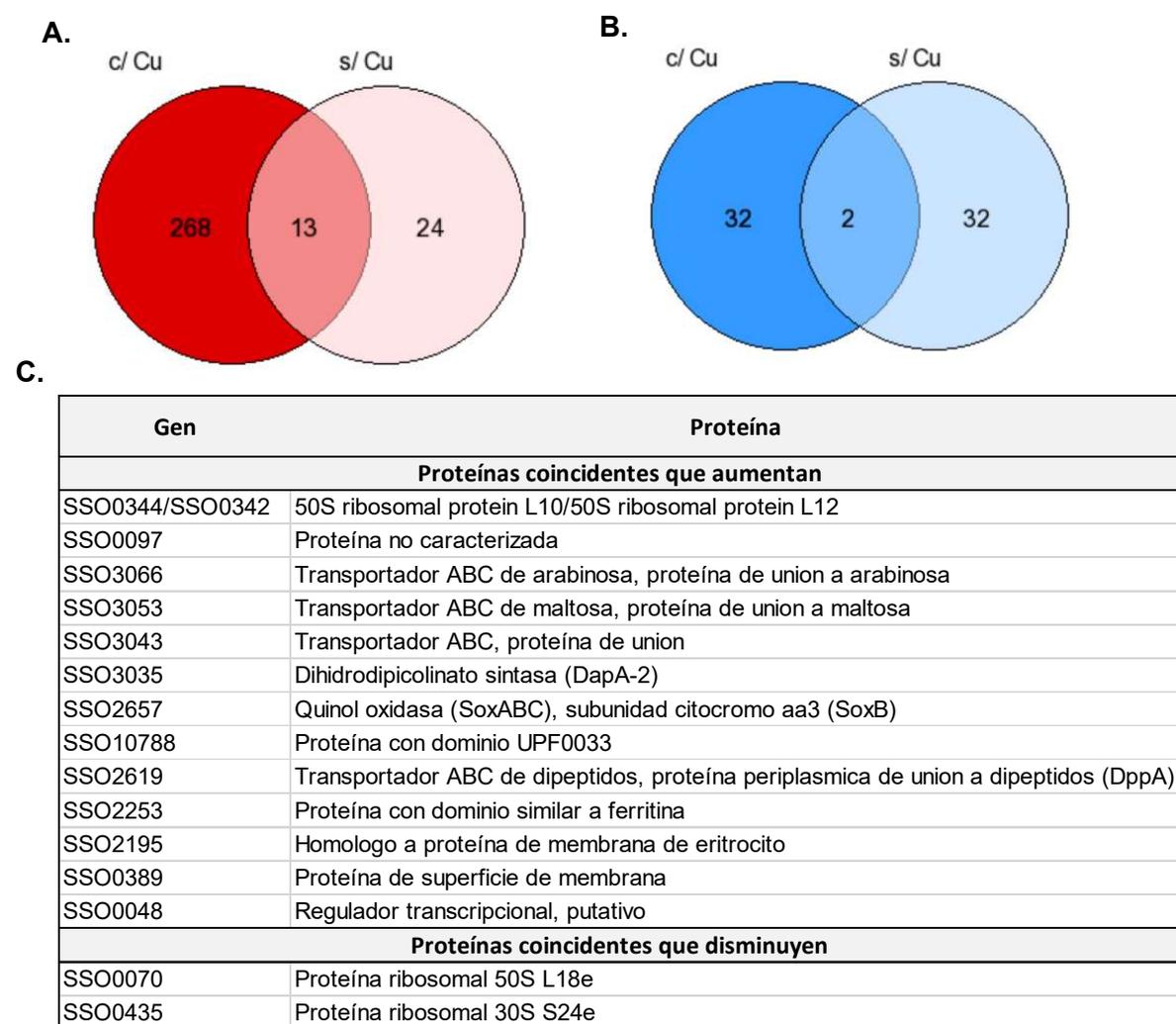


Figura 41. Proteínas que coinciden al comparar las proteómicas sin Cu y con Cu, en células planctónicas versus sésiles. A. Proteínas que aumentan, **B.** Proteínas que disminuyen, **C.** Cuadro con la identidad de las proteínas que coinciden.

transcripcional que corresponde a la familia Lrs-14 (SSO0048), aunque las veces de cambio son mayores en ausencia de Cu^{2+} (0,12 versus 0,405).

Como es de esperarse, varias proteínas de respuesta a estrés solo aparecen aumentadas al añadir Cu^{2+} al medio.

También se puede notar una diferencia en la respuesta metabólica de las células al estrés por Cu^{2+} , ya que, por ejemplo, las proteínas que corresponden a la cadena de transporte de electrones y que se encuentran aumentadas en presencia de Cu^{2+} no presentan cambios al hacer el mismo contraste de células planctónicas versus sésiles sin Cu^{2+} . Por ende, la célula estaría necesitando más energía para responder al estrés por Cu^{2+} .

6. DISCUSION

6.1 Efecto de la ausencia de PoliP durante la formación de biopelículas y fenómenos relacionados en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*.

6.1.1 Metabolismo de PoliP en *Sulfolobus* y cepas utilizadas en el estudio

Como mencionamos anteriormente, en Crenarchaeotas no se conoce la enzima que sintetiza los PoliP (Albi & Serrano, 2016; Cardona y col., 2002), solo se conoce la enzima que los degrada, la PPX. A pesar que se desconoce la PPK en este reino, existen miembros del mismo orden *Sulfolobus* que acumulan cantidades importantes de PoliP, como por ejemplo *S. metallicus* o *M. sedula* (Remonsellez y col., 2006; Rivero y col., 2018).

En esta tesis se quiso estudiar el efecto de la ausencia de PoliP en la formación de biopelículas en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*, así como el efecto del Cu^{2+} en las biopelículas de *S. solfataricus*.

Para llevar a cabo los experimentos se utilizaron dos cepas de *S. solfataricus*, una de ellas carece de PoliP en niveles detectables en presencia de D-Ara y fue generada previamente en el laboratorio (M16-PPX) (Soto y col., 2019).

Adicionalmente, en esta tesis, se logró generar exitosamente una cepa de *S. acidocaldarius* que no acumula PoliP debido a que sobreexpresa la enzima que degrada el polímero. Se decidió realizar esta construcción debido a que la regulación de la formación de biopelículas y otros procesos están más estudiados en este organismo que en *S. solfataricus*; además las

herramientas permiten obtener mutantes “knock-out” de manera más fácil. Sin embargo, no se logró obtener aun la mutante de delección de la PPX, la cual debería acumular PoliP.

En *S. islandicus*, una especie cercana a *S. acidocaldarius* y *S. solfataricus*, cuyo genoma esencial está disponible (Zhang y col., 2018), no se nombra al gen de la PPX como esencial, por lo cual debería ser posible obtener mutantes de delección del gen. Mas adelante, en el laboratorio, se intentarán otras técnicas de clonamiento y se seguirán haciendo “screenings” por el método “pop in/pop out” (Wagner y col., 2012) para obtener dichas mutantes, ya que sería interesante probar cual es el efecto de la acumulación de PoliP o la falta de hidrolisis del polimero sobre la formación de biopelículas y otros fenómenos.

6.1.2 Formación de biopelículas en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* en carencia de PoliP

Por datos de nuestro laboratorio se sabe que los niveles de PoliP alcanzan un máximo cuando la célula llega a fase estacionaria, y luego disminuyen a cerca de la mitad de su valor. *S. solfataricus* posee un máximo de 25-35 nmoles Pi/mg de proteína de PoliP en fase exponencial y estacionaria temprana.

Se midieron los niveles de PoliP en la cepa WT de *S. solfataricus* a lo largo de 6 días de desarrollo de una biopelícula, donde se observó que existe una disminución en los niveles del polímero. Luego, el aumento en el día 6 podría deberse a la maduración de la biopelícula y el escape de las células a la forma de vida planctónica o a un estado de dormancia. Se ha reportado anteriormente que bacterias que entran en un estado de dormancia acumulan PoliP (Albi y Serrano, 2016), y también se sabe que los PoliP son importantes para la persistencia de las células. En la proteómica de células planctónicas versus sésiles de la M16 (datos no mostrados) se observa un aumento de la PPX.

Para diversas bacterias se había reportado anteriormente que la delección de las enzimas PPX o PPK causaban defectos en la formación de biopelículas (Drozd y col., 2014; Rashid, y col., 2000; Shi y col., 2004) entre otros fenómenos. En *E. coli*, se había visto que la degradación de PoliP en fase estacionaria gatilla la formación de biopelículas a través del sistema LuxS de Quorum sensing (Grillo-Puertas y col., 2012). Sin embargo, este sistema parece estar ausente en arqueas, donde, específicamente en *S. solfataricus*, no se han detectado aun sistemas similares.

Al llevar a cabo ensayos de formación de biopelículas en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* WT y PoliP (-), observamos que las cepas que carecen de PoliP se comportan de manera similar, formando menor cantidad de biopelículas.

En arqueas no se había estudiado anteriormente la relación entre este polímero y el estilo de vida sésil. En esta tesis reportamos por primera vez que la carencia de PoliP genera defectos en la formación de biopelículas en arqueas.

Como se puede observar en las fig. 7 y 16, las cepas PoliP (-) de *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* forman menos biopelículas que las cepas WT al cabo de 3 días de crecimiento. Así mismo, la morfología de dichas biopelículas es más fina, con menor cantidad de células adheridas y azúcares extracelulares.

Además de eso, en *S. solfataricus* se detectaron “huellas” de azúcares (fig. 7C) que corresponderían a sitios donde hubo células adheridas anteriormente, algo que se ha descrito para *Acidianus* sp. en pirita (Zhang y col., 2018). Pareciera que la menor formación de biopelículas podría deberse a una menor adherencia eficaz o dificultad de las células de mantenerse adheridas en el tiempo.

En ambas cepas PoliP (-), se distingue una disminución de los residuos α -manopiranosilo y α -glucopiranosilo y un aumento de los residuos α -D-galactosilo con respecto a la condición WT, evidenciado por las señales de las lectinas utilizadas. Esto podría indicar un patrón diferente de glicosilación de las proteínas de superficie (Meyer y Albers, 2013), lo que también se podría relacionar con la adhesión a superficies, en el caso de la glicosilación del arqueolo (Meyer y col., 2013). En la microscopía de epifluorescencia de la biopelícula de *S. acidocaldarius* (fig. 18) se nota además una característica: las células en la cepa WT se encuentran en forma de grupos con azúcares alrededor, algo que no se observa en la cepa PoliP (-) donde las células parecen estar adheridas de manera individual sin formar estas agrupaciones.

Con respecto a las diferencias entre ambas especies, anteriormente se había descrito que *S. acidocaldarius* forma mayor cantidad de biopelículas que *S. solfataricus* (Koerdt y col., 2010). No solo la biopelícula es más gruesa, sino que contiene mayor cantidad de células y de azúcares. De hecho, *S. solfataricus* secreta muy pocos azúcares. Esto es evidente al comparar las imágenes de MCL de las cepas WT, donde se nota que la biopelícula de *S. acidocaldarius* (fig. 16) es más gruesa y contiene mayor cantidad de azúcares que la de *S. solfataricus* (fig. 7).

6.1.3 Adherencia a superficies de *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* en carencia de PoliP. Expresión de las estructuras de adhesión y funcionalidad del arqueolo.

Para determinar si las diferencias en la formación de biopelícula se relacionan con la adherencia inicial de las células, se realizaron ensayos de adherencia a superficie de vidrio comparando las cepas WT y PoliP (-) en ambas especies. Como se puede observar en las fig. 8 y 18, las cepas PoliP (-) mostraron menor adherencia a superficies comparando con la cepa WT. También se observa un menor número de células adheridas en *S. solfataricus* comparada

con *S. acidocaldarius*, esto podría deberse a que el número de células a una misma densidad óptica es diferente para ambas cepas, siendo menor en *S. solfataricus*. En *S. acidocaldarius*, la adherencia de las células también depende del Pili Adhesivo Archaeal (Aap), ausente en *S. solfataricus* (Henche y col., 2012). Al medir los niveles de transcripto de un componente de esta estructura por qRT-PCR, se encontró un aumento de la expresión del mismo en la cepa PoliP (-) en comparación a la cepa WT (fig. 19).

Se midió la expresión de la arqueína, un componente del arqueolo en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* por qPCR (fig. 9 y fig. 19). Se observaron dos patrones de expresión diferentes, en el caso de *S. solfataricus*, no se observó una diferencia entre la cepa WT y PoliP (-) en células planctónicas ni sésiles (fig. 9), apoyando la idea que quizás un patrón de glicosilación diferente esté influyendo en la adherencia. En el caso de *S. acidocaldarius* sí se observó una mayor expresión de este componente en el caso de la cepa PoliP (-) comparando con la WT (fig. 19), lo cual fue corroborado a nivel de proteína por Western blot (fig. 20).

Para comprobar que había defectos en otras funciones del arqueolo, se llevaron a cabo ensayos de motilidad en placas semi sólidas. Tanto en *S. solfataricus* (fig.11) como en *S. acidocaldarius* (fig. 21) se observan defectos en la motilidad de las cepas PoliP (-).

En el caso de *S. solfataricus*, el componente PiIT (SSO1746) del arqueolo, que corresponde a la ATPasa se encuentra disminuido en la proteómica de PoliP (-) vs. WT de células sésiles, pero ningún otro componente se ha detectado con cambios significativos.

Ya que nuestros análisis de proteómica se realizaron en células enteras, no debe descartarse que aún queda por resolver por microscopía electrónica si es que el arqueolo es en realidad ensamblado en igual proporción en la superficie en la cepa WT y PoliP (-). Además, se podría estudiar el estado de glicosilación del arqueolo, ya que mutantes de enzimas de la vía de esta

modificación post traduccional han resultado ser cepas no motiles (Meyer y col., 2013). Esto se podría realizar por movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes.

Defectos en la motilidad de células que carecen de alguna de las enzimas PPK o PPX se había reportado antes en la bacteria *Bacillus cereus* (Shi y col., 2004). Al observarse este defecto en la mutante Δppx , que no puede hidrolizar PoliP, y no solo en la Δppk , apoya la idea de que este defecto podría estar relacionado con una falta de ATP o del PoliP como fuente directa de energía, teniendo en cuenta el papel de reserva energética del PoliP en la célula (Kornberg y col., 1999). Se reportó una mutante de *Pseudomonas sp.* B4 que carece de PoliP y es no motil, a pesar de poseer el flagelo intacto, observado por microscopía electrónica (Varela y col., 2010). Sin embargo, en el análisis de proteómica poseía cantidades menores de flagelo que la cepa WT.

Con respecto a los azúcares de superficie que también podrían tener influencia en la formación de biopelícula y la adherencia a superficies, podemos mencionar que en la proteómica de la cepa WT vs. PoliP (-) en células sésiles se encuentra disminuida la enzima Agl16 (SSO0681). Esta enzima está probablemente involucrada en la glicosilación de proteínas de superficie ya que es un homólogo de la Agl16 de *S. acidocaldarius* que está involucrada en el último paso de síntesis de N-glican y cuya delección afecta la funcionalidad y el ensamblaje del arqueolo (Meyer y col., 2013). Por tanto, podría ser que la estructura del arqueolo no se encuentre correctamente glicosilada, eso se traduciría en menor motilidad, menor adherencia, y menor cantidad o diferente identidad de azúcares en las biopelículas, que es lo que observamos en los experimentos con *S. solfataricus*.

En la mutante PoliP (-) de *Pseudomona sp.* B4, se había reportado diferencias con la WT respecto a la composición del core de lipopolisacáridos (LPS), observado mediante

electroforesis (Varela y col., 2010). Aunque *Sulfolobus* spp. posee capa S en lugar de LPS, podría darse algo similar en este microorganismo, aunque por otras vías.

Se podría realizar un análisis más detallado de la composición de la capa S y de los EPS comparando las cepas PoliP (-) y WT en *Sulfolobus* spp.

6.1.4 Estudio de reguladores transcripcionales relacionados a la formación de biopelícula

Poco se sabe de la regulación de la formación de biopelículas en *Sulfolobus* spp. Se ha descrito que en *S. acidocaldarius* existen reguladores transcripcionales de la familia Lrs14, como los codificados por *Saci_1223*, el cual es un regulador positivo, y *Saci_0458* o AbfR1, que es un regulador negativo de la formación de biopelículas (Orell, y col., 2013b).

El regulador transcripcional AbfR1 también se ve afectado por fosforilación (Li y col., 2017). La fosforilación de AbfR1 evita que cumpla su función como regulador negativo, favoreciéndose entonces la formación de biopelículas al disminuir la expresión de los genes *fla* y aumentando la excreción de azúcares extracelulares. Además, al regular su propia expresión mediante unión a su región promotora, al encontrarse fosforilado, disminuye sus niveles de proteína.

Los resultados de qPCR en *S. acidocaldarius* indicaron que había un aumento en la cantidad de este regulador en la cepa PoliP (-) al comparar con la WT (fig.19), lo cual coincide con la idea que los PoliP estarían involucrados en la regulación de la formación de biopelículas por esta vía, ya que al no haber PoliP, no existe fosforilación, y, por tanto, el regulador puede cumplir su función de represor de la formación de biopelículas. También coincide con esta idea, la baja cantidad de EPS secretados en la cepa PoliP (-) observado en la microscopía (fig.

18) y la sobre expresión del arqueolo (fig. 19 y fig. 20); siendo ambos procesos controlados por AbfR1 (Li y col., 2017).

Se ha visto la existencia de quinasas dependientes de PoliP en bacterias (Nocek y col., 2008), las cuales sintetizan ATP, GTP y fosforilan otras proteínas. En experimentos sobre la respuesta de *S. solfataricus* a H₂O₂, se vio la fosforilación diferencial de ciertas proteínas (Maaty, 2009). La fosforilación también podría ser una respuesta al estrés que esté regulada por la presencia de PoliP y que podría estar afectando la formación de biopelículas. Para ello deberían realizarse análisis de fosfoproteomas en ambas cepas.

Para poder relacionar la regulación en ambas especies, realizamos un alineamiento de secuencias aminoacídicas entre los reguladores de *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius* (fig. 11), y observamos que los residuos que están propuestos como aceptores de grupo fosfato no se encuentran conservados, por lo cual no podemos asegurar que este regulador se vea afectado por fosforilación en *S. solfataricus*. En *S. solfataricus* también se observó un aumento del regulador al comparar células PoliP (-) versus WT en células planctónicas

En el trabajo publicado por Li y colaboradores (Li y col., 2017), se realizaron mutaciones en dichos residuos en *S. acidocaldarius*, perdiendo el regulador su función, pero sin demostrar de manera directa que son éstos los residuos que se fosforilan. Podría ocurrir que las mutaciones provoquen un cambio en el motivo que impida la fosforilación o la pérdida misma de función siendo otro residuo cercano el que realmente se fosforila. Un probable sitio de fosforilación alternativo podría ser Y86, que se encuentra entre Y84 y S87 (fig. 11), y además sí se conserva en *S. solfataricus*. También podría ser que el sitio de fosforilación en la proteína de *S. solfataricus* es otro, o que ésta simplemente no se regule por fosforilación.

En la proteómica de células sésiles versus planctónicas en tres especies de *Sulfolobus* realizada por Koerdt y colaboradores (Koerdt y col, 2011), aparecen aumentadas las proteínas codificadas por los genes SSO1101 y SSO1108, estando la primera relacionada con la proteína codificada por *Saci_1223*, que es un regulador positivo de la formación de biopelículas (Orell y col., 2013b), y SSO1108 con *Saci_0133* y *Saci_0102*, reguladores que no tendrían función, al menos conocida, en la formación de biopelículas (Orell y col., 2013b). En nuestros experimentos, el regulador SSO1101 solo aparece aumentado en la proteómica de células sésiles versus planctónicas en la cepa PoliP (-), lo que podría indicar un intento de inducir la formación de biopelículas, aunque ese regulador también está involucrado posiblemente en otros procesos celulares. Mientras que el SSO1108 aparece disminuido en células sésiles versus planctónicas en PoliP (-), y en PoliP (-) versus WT tanto en células planctónicas como en células sésiles.

6.1.5 Modelo de formación de biopelículas en ausencia de PoliP en *S. acidocaldarius*

En base a los resultados obtenidos, quisiéramos proponer un modelo de cómo el PoliP podría afectar la formación de biopelículas en *S. acidocaldarius* (fig. 42), el cual debería de corroborarse en el futuro realizando otras mutantes como por ejemplo una mutante que no acumule PoliP en la mutante KO de AbfR1 de *S. acidocaldarius*, además de estudios moleculares.

En el modelo, PoliP fosforila el regulador AbfR1 de manera directa o indirecta (se degrada para liberar Pi o formar ATP o actúa a través de quinasas que pueden utilizar el polímero). Al fosforilarse AbfR1, este no puede ejercer su rol de represor de biopelículas, por lo que la formación de éstas ocurre normalmente.

Sin embargo, en la condición PoliP (-) la carencia de PoliP hace que el regulador no pueda ser controlado por fosforilación (fig. 42), lo que llevaría no solo a su sobre expresión, sino consecuentemente a un aumento en la expresión del arquel y de la síntesis de EPS.

Además, PoliP también ayuda en la generación de energía para la motilidad del arquel. Cuando hay ausencia del polímero, también hay defectos en la motilidad, a pesar de que el arquel esté expresado en mayores cantidades.

Es probable que PoliP regule la formación de biopelículas por otros mecanismos, ya que posee diversas funciones en la célula.

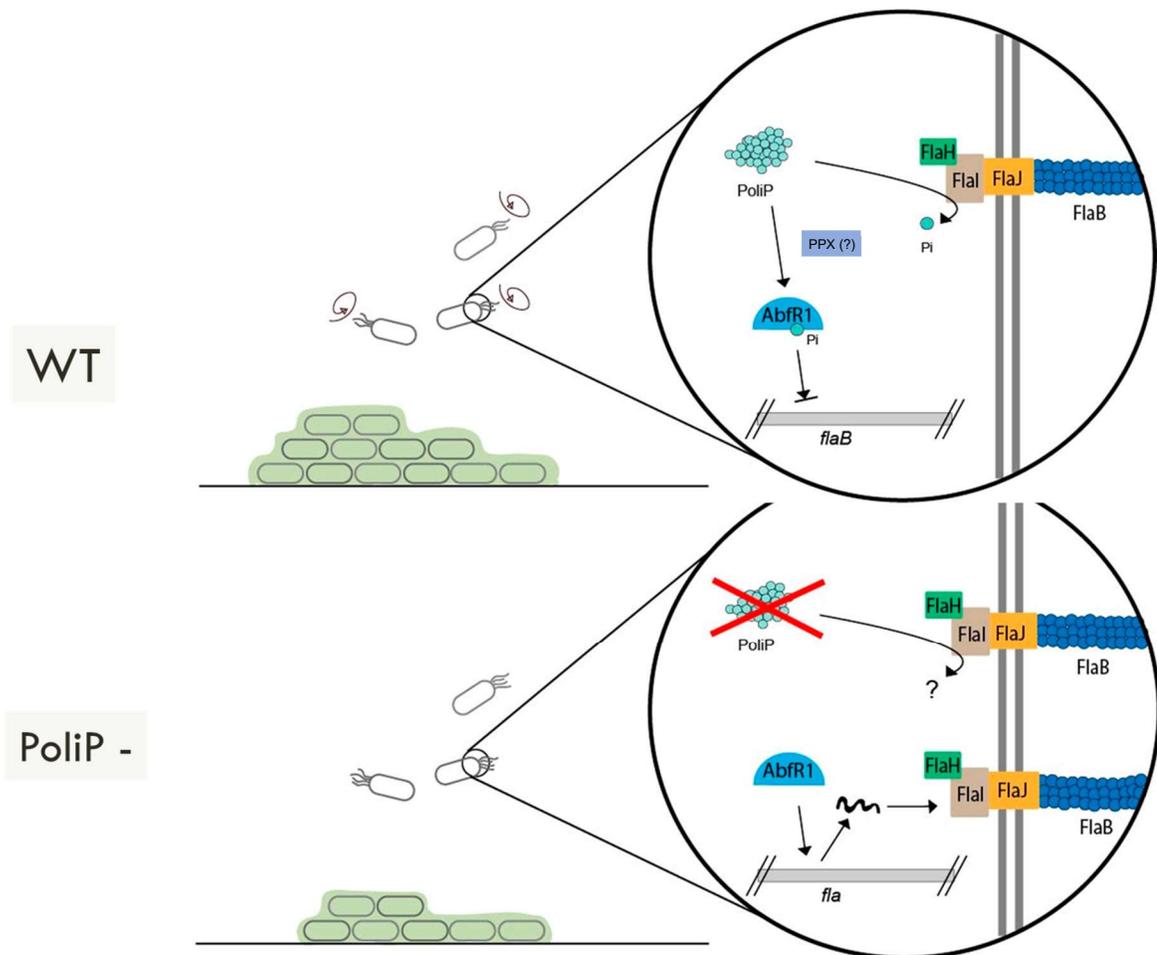


Figura 42. Posible modelo del rol de PoliP en la formación de biopelículas en *S. acidocaldarius*.

6.1.6 Perfil metabólico de *S. solfataricus* en ausencia de PoliP en modo de vida sésil y planctónico

Con respecto a la proteómica, como se mencionó anteriormente, se observan diferencias al contrastar las proteómicas de las células sésiles y planctónicas cuando se comparan la cepa PoliP (-) versus la WT. En general, en las células sésiles, se observa un metabolismo donde se busca generar ATP por vías no oxidativas como el ciclo de Krebs, en detrimento de la cadena de transporte de electrones. Esto generaría un ahorro ATP por la menor expresión de transportadores de membrana (fig. 26). También se ve disminuida la síntesis de bases nitrogenadas, lo que podría relacionarse con una menor síntesis de ácidos nucleicos y quizás una menor división celular, lo que se corresponde con la menor cantidad de células en la biopelícula observada por la microscopía.

En el caso de las células planctónicas se observa un aumento en las proteínas de la cadena de transporte de electrones y una disminución en las proteínas del Ciclo de Krebs (fig. 24).

No se detectan cambios en ninguna de las Fosfoquinasas de *S. solfataricus* (SSO0197, SSO0433, SSO2291, SSO2387, SSO2605, SSO3182, SSO3207, SSO0469), tampoco la familia de reguladores transcripcionales Arn (SSO1088, SSO1089, SSO1091, SSO2327). Ambas familias de proteínas tienen que ver con la fosforilación de proteínas (Reimann y col., 2013) y podrían estar relacionadas con la acción directa o indirecta de PoliP.

También cabe mencionar que las enzimas del metabolismo energético y de carbohidratos en *S. solfataricus* se ven reguladas por fosforilación (Brasen y col., 2014; Esser y col., 2012), lo que podría ser afectado por la falta de PoliP en la célula.

Aparentemente la producción de ATP no se vio afectada, ya que los niveles de ATP, ADP y la razón ADP/ATP no fueron significativamente diferentes en ambas cepas (fig. 32), aunque estuvieron ligeramente aumentados en la cepa PoliP (-). Esto puede deberse a las

adaptaciones que realizó la cepa PoliP (-) mediante la expresión diferencial de proteínas involucradas en la producción de energía, como la ATP sintasa, la cual es de gran importancia para la producción de energía en acidófilos.

6.2 Efecto del Cu^{2+} durante la formación de biopelículas en *S. solfataricus*.

6.1.1 Formación de biopelículas en presencia de Cu^{2+}

Es sabido que el modo de vida biopelícula favorece la resistencia a diversos factores de estrés, entre los cuales se encuentran los metales (Harrison y col., 2007). Las células sésiles de un biofilm están expuestas a condiciones variables de pH, oxígeno y nutrientes en dicha estructura, algo que no ocurre en células planctónicas (Stewart y Franklin, 2008), esto causa heterogeneidad entre la población y se cree podría colaborar en la resistencia a los factores de estrés. Las diversas capas de una biopelícula también causan que las células del interior de la misma estén menos expuestas. Así también, los EPS poseen en su mayoría carga negativa y por consiguiente pueden atrapar los cationes metálicos impidiendo que penetren en la célula (Koechler y col., 2015). Como mencionamos anteriormente, adicionalmente las arqueas también tienden a modificar la capa S en respuesta al estrés mediante cambios en el patrón de glicosilación de sus proteínas (Eichler, 2013).

Se observó que, en presencia de ciertas concentraciones de Cu^{2+} la cantidad de biopelícula formada por *S. solfataricus* es mayor, alcanzando un máximo a 0,5 mM de Cu^{2+} (fig. 33). A 1 mM de Cu^{2+} se observó la menor cantidad de biopelícula formada (fig. 33), lo que podría indicar que el microorganismo prefiere otras formas de resistencia al metal en estas condiciones. La CMI de Cu^{2+} de *S. solfataricus* es de 5 mM (Remonsellez y col., 2006).

Se estudio entonces la formación de biopelículas por 3 días en presencia de 0,5 mM de Cu^{2+} mediante MCL. En estas biopelículas se observa que la estructura formada en presencia de 0,5 mM del metal posee más células, pero menor cantidad de polisacáridos, lo que se evidencia por la menor cantidad de cúmulos en forma de “nubes” de azúcares marcados con ConA en comparación con la condición WT, y aumento en la cantidad de azúcares marcados por IB4.

En la proteómica de respuesta a Cu^{2+} en células planctónicas vs. sésiles, se encuentra disminuida una enzima involucrada en la glicosilación del arqueolo (SSO2583), algo que no ocurría en ausencia de metal.

En *S. acidocaldarius* se sabe que mutantes de la enzima Agl3 de glicosilación de proteínas tienen problemas para crecer en medio con cantidades crecientes de NaCl (Meyer y col., 2011), al igual que la mutante Agl16 (Meyer y col., 2013). En *H. volcanii* también se ha visto que las proteínas de la capa S sufren cambios en su glicosilación como respuesta al estrés ambiental (Guan y col., 2012), estos cambios podrían permitir a la arquea a adaptarse a los desafíos del medio. Por ello es posible pensar que se presenten diferentes patrones de glicosilación en respuesta al estrés por metal en *Sulfolobus*. Esto podría corroborarse aislando las proteínas de la capa S y realizando geles de poliacrilamida para buscar cambios en los patrones migratorios de dichas proteínas, o aislando los EPS y caracterizándolos por HPLC.

6.1.2 Respuesta del sistema Cop al Cu^{2+} en la forma de vida biopelícula

El sistema Cop es el principal sistema de respuesta a Cu^{2+} en *S. solfataricus* (Ettema y col., 2006). Se midió la expresión de *copA*, la ATPasa de transporte de Cu^{2+} , mediante qRT-PCR a diferentes concentraciones del metal y en estilo de vida sésil y planctónico (fig. 36).

Se observó un aumento en la expresión del gen a la par con el aumento en la concentración de Cu^{2+} tanto en células sésiles como planctónicas. Sin embargo, al comparar el aumento de la expresión de *copA* a una misma concentración de Cu^{2+} en ambos estilos de vida, encontramos que existe una menor inducción del gen en condición de biopelícula.

En la proteómica con Cu^{2+} también se observa que este transportador está disminuido en células sésiles.

Se ha descrito que el sistema Cop responde a la cantidad de Cu^{2+} intracelular (Villafane y col., 2010). Estos resultados sugieren que en la forma de vida sésil podría ingresar menos Cu^{2+} a las células, gracias a la protección ofrecida por los azúcares externos y la modificación de la capa S que ayudaría a disminuir la concentración efectiva de metal que llega al interior de las células.

6.1.3 Perfil transcriptómico y proteómico global de respuesta a Cu^{2+} en células planctónicas vs. sésiles

El mecanismo de toxicidad del Cu^{2+} es a través de la producción de radicales hidropéroxidos $\text{OH}^{\cdot-}$ mediante la reacción de Fenton con radicales y oxígeno molecular (Nies, 1999). Estos radicales libres pueden generar estrés oxidativo, que en el caso de los radicales hidroxiperóxidos se traducen generalmente en daño al ADN, oxidación de proteínas y un efecto en cascada debido a la generación de aminoácidos radicalarios (Lemire y col., 2017).

Una respuesta al cobre de *S. solfataricus* sería la formación de biopelículas. La formación de éstas podría ser un mecanismo de respuesta al estrés como se pudo observar según el crecimiento de las biopelículas en presencia del metal (fig. 33), así como la respuesta de *copA* en ese estilo de vida (fig. 36).

Si bien no se observaron cambios en los genes seleccionados en la condición de biopelícula (alfa manosidasa y regulador SSO1101), esto podría deberse a que en dicho estado las células ya no necesitan responder al cobre. En el caso de la concentración a 1 mM de cobre sí se observa una disminución de la expresión de ambos genes.

Bajo la hipótesis que estos genes podrían estar cambiando en las células planctónicas expuestas a Cu^{2+} , se procedió a analizar estos genes en dicha condición. El cobre indujo la expresión de la arqueína tras 24 horas de exposición en células planctónicas (fig. 35). La inducción de este gen podría ser un mecanismo por el cual la célula intente nadar alejándose del metal, así como también podría provocar mayor adherencia de las células a superficies, ya que esta estructura es responsable de dicho fenómeno en *S. solfataricus* (Zolghadr y col., 2010)

La alfa manosidasa también se encuentra sobreexpresada en el caso de 0,75 y 1 mM Cu^{2+} tras 24 h y en 0,5 mM Cu^{2+} tras 1 h de exposición (fig. 34).

Mediante el análisis de la formación de biopelículas y algunos los genes involucrados en este proceso por qRT-PCR a diferentes concentraciones de cobre y tiempos de exposición, se pudo seleccionar las que pensamos serían las mejores condiciones para la proteómica con Cu^{2+} . En base a los resultados encontrados, se decidió exponer las biopelículas a 0,5 mM Cu^{2+} y 24 h para poder comprobar la hipótesis sobre la inducción de formación de biopelículas con Cu^{2+} y la protección de las células frente al estrés mediante la forma de vida sésil.

También en la proteómica se observaron resultados que apoyan esta hipótesis. Como ya mencionamos, la CopA se encontraba aumentada en células planctónicas al compararlas con células sésiles. Muchas proteínas de estrés también se encontraban aumentadas en este estilo de vida (fig. 40), como las proteínas de respuesta al daño del ADN, Rad50 y HerA, la proteína Fur (Cárdenas y col., 2012), todas las unidades del termosoma, varias peroxirredoxinas, proteínas del sistema tiorredoxina, etc.

Además de ello, hay una sobre expresión de los componentes de la cadena de electrones y del ciclo del Krebs (fig. 40), algo que no se observó al comparar ambos estilos de vida en ausencia de Cu^{2+} mediante proteómica (datos no mostrados). Esto llevaría a pensar que la célula necesita más ATP en la forma de vida plantónica para responder al estrés por Cu^{2+} , podría ser porque sus niveles de PoliP están disminuyendo y por ende necesitan generar más energía.

6.1.4 Respuesta de la cepa PoliP (-) al Cu^{2+} en la forma de vida biopelícula

Como observamos al principio, la cepa PoliP (-) genera menor cantidad de biopelícula que la cepa WT tanto en *S. solfataricus* como en *S. acidocaldarius*. Estas cepas también presentan menor resistencia a Cu^{2+} que sus contrapartes WT (Soto y col., 2019) (fig. 22).

Quisimos entonces probar si la cepa PoliP (-) de *S. solfataricus* era capaz de generar mas biopelícula como respuesta a Cu^{2+} , al igual que la cepa WT. Los ensayos de MCL indican que la biopelícula generada en presencia de Cu^{2+} por la cepa PoliP (-) es similar a la generada en ausencia del metal, ya que prácticamente carece de los cúmulos de azúcares que se observan en la cepa WT.

En resultados no publicados de nuestro laboratorio se ha descrito que en la proteómica de la cepa PoliP (-) vs. WT en presencia de Cu^{2+} en forma de vida plantónica se observa un aumento de proteínas de respuesta a estrés, así como del gen *copA* a nivel transcripcional (Soto, 2012).

Es posible que el estrés generado por el Cu^{2+} en la cepa PoliP (-) sea tal que no le permita generar biopelícula de manera eficiente. La MIC de Cu^{2+} de la cepa PoliP (-) es 0.75 mM (Soto y col., 2019), concentración muy cercana a la de ensayo de 0,5 mM. En la cepa WT habíamos observado que a medida que la concentración se acerca a la MIC, la cantidad de biopelícula disminuye, probablemente porque el microorganismo prefiera otros métodos de resistencia al

metal. En este caso, el PoliP también es un sistema de respuesta a Cu^{2+} , y junto con el sistema Cop son los únicos descritos hasta el momento en *S. solfataricus* (Martínez-Bussenius y col., 2016). Comparando con *S. metallicus*, *S. solfataricus* no posee grandes cantidades de PoliP, por tanto no genera gránulos visibles en la célula ni posee una CMI de Cu^{2+} alta ya que carece también de otros sistemas (Remonsellez y col., 2006). En ausencia de PoliP, la célula debe reaccionar por otros mecanismos como una respuesta más alta del sistema Cop, activación de sistemas de reparación de daño a proteínas y ADN, respuesta metabólica metabólica, etc. Es posible que el gasto energético que supone esto, sumado a que la carencia de PoliP ya es un impedimento de por sí para la generación de biopelículas, hace que las biopelículas generadas en estas condiciones posean menor contenido de azúcares que en ausencia del metal, como se observa en las imágenes de MCL (fig. 38).

7. CONCLUSIONES

En carencia de PoliP, disminuye la formación de biopelículas por las crenarqueotas: *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*. Esta es la primera evidencia de que la ausencia de PoliP afecta la formación de biopelículas en arqueas.

La carencia de PoliP también ocasiona menor generación de azúcares extracelulares en las biopelículas, menor adherencia de las células a superficies de vidrio y menor motilidad en *S. solfataricus* y *S. acidocaldarius*.

En la proteómica cuantitativa, las diferencias entre la cepa PoliP (-) y WT fueron más bien a nivel de proteínas del metabolismo energético y proteínas de estrés. Los niveles de ATP, ADP y razón ADP/ATP se mantuvieron constantes entre la cepa WT y PoliP (-) en forma de vida planctónica.

La biopelícula ofrecería protección contra el estrés por Cu^{2+} . Este metal es capaz de inducir la formación de biopelículas en la cepa WT de *S. solfataricus*. Los niveles de transcrito y proteínas relacionadas a la resistencia a Cu, como CopA, y otras proteínas de respuesta a estrés oxidativo, se encontraban aumentadas en la forma de vida planctónica al comparar con las biopelículas, apoyando su posible rol protector en el estilo de vida sésil.

En ausencia de PoliP, el Cu^{2+} no fue capaz de inducir la formación de biopelículas a la concentración ensayada, lo que apoya la idea que este polímero es necesario para la formación de biopelículas.

8. FINANCIAMIENTO

La tesis forma parte del Proyecto FONDECYT 1150791 titulado “Search of mechanisms for extreme metal resistance in acidophilic bacteria and thermoacidophilic archaeae of importance in bioleaching of minerals”. También recibió financiamiento parcial del Proyecto FONDECYT 1191554 “Polyphosphate associated proteins and role of the polymer as an inorganic chaperone and in defense against stress in bacteria and archaea”.

La estudiante cuenta con beca de aranceles de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, además de la Beca de Estudios de Post grado en el Exterior “Don Carlos Antonio López”, otorgada por el Gobierno de la República del Paraguay para la realización del doctorado y su estadía en el extranjero.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Albi, T., & Serrano, A. (2016). Inorganic polyphosphate in the microbial world. Emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1983-2>
- Alvarez, S., & Jerez, C. A. (2004). Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5177–5182. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5177-5182.2004>
- Auernik, K. S., & Kelly, R. M. (2008). Identification of components of electron transport chains in the extremely thermoacidophilic crenarchaeon *Metallosphaera sedula* through iron and sulfur compound oxidation transcriptomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7723–7732. <https://doi.org/10.1128/AEM.01545-08>
- Berg, I. A., Kockelkorn, D., Ramos-Vera, W. H., Say, R. F., Zarzycki, J., Hügler, M., Alber B. E., Fuchs, G. (2010). Autotrophic carbon fixation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 447–460. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2365>
- Brasen, C., Esser, D., Rauch, B., & Siebers, B. (2014). Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), 89–175. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-13>
- Brouns, S. J. J., Ettema, T. J. G., Stedman, K. M., Walther, J., Smidt, H., Snijders, A. P. L., Young, M., Bernander, R., Wright, P. C., Siebers, B. & van der Oost, J. (2005). The hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus*: from exploration to exploitation. In W. Inskeep & McDermont TR (Eds.), *Geothermal Biology and Geochemistry in Yellowstone National Park: Proceeding of the Thermal Biology Institute Workshop* (pp. 261–276).
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3(1), 3–8. <https://doi.org/10.2436/im.v3i1.9235>

- Cárdenas, J. P., Moya, F., Covarrubias, P., Shmaryahu, A., Levicán, G., Holmes, D. S., & Quatrini, R. (2012). Comparative genomics of the oxidative stress response in bioleaching microorganisms. *Hydrometallurgy*, 127–128, 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2012.07.014>
- Cardona, S. T., Chavez, F. P., & Jerez, C. A. (2002). The exopolyphosphatase gene from *Sulfolobus solfataricus*: Characterization of the first gene found to be involved in polyphosphate metabolism in Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4812–4819. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4812>
- Drozd, M., Chandrashekhar, K., & Rajashekara, G. (2014). Polyphosphate-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* biofilm growth and stability. *Virulence*, 5(6), 680–690. <https://doi.org/10.4161/viru.34348>
- Eichler, J. (2013). Extreme sweetness: protein glycosylation in archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 151–156. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2957>
- Esser, D., Pham, T. K., Reimann, J., Albers, S. V., Siebers, B., & Wright, P. C. (2012). Change of carbon source causes dramatic effects in the phospho-proteome of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Proteome Research*, 11(10):4823-33. doi: 10.1021/pr300190k.
- Ettema, T. J. G., Brinkman, A. B., Lamers, P. P., Kornet, N. G., de Vos, W. M., & van der Oost, J. (2006). Molecular characterization of a conserved archaeal copper resistance (cop) gene cluster and its copper-responsive regulator in *Sulfolobus solfataricus* P2. *Microbiology*, 152(7), 1969–1979. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28724-0>
- Fröls, S. (2013). Archaeal biofilms: widespread and complex. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 393–398. <https://doi.org/10.1042/BST20120304>
- Golyshina, O. V., Ferrer, M., & Golyshin, P. N. (2016). Diversity and physiologies of acidophilic Archaea. En: R. Quatrini & B. Johnson (Eds.), *Acidophiles: Life in Extremely Acidic Environments* (pp. 93–106). Caister Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.21775/9781910190333>
- Gray, M. J., & Jakob, U. (2015). Oxidative stress protection by polyphosphate - new roles for and old player. *Current Opinion in Microbiology*, (24), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.12.004>.Oxidative

- Gray, M., Wholey, W. Y., Wagner, N., Cremers, C., Mueller-Schickert, A., Hock, N., Krieger, A., Smith, E., Bender, R., Bardwell, A. J. & Jakob, U. (2014). Polyphosphate is a primordial chaperone. *Molecular Cell*, 53, 689–699. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.012>
- Grillo-Puertas, M., Rintoul, R., Villegas, J. M., & Rapisarda, V. A. (2012). Polyphosphate degradation in stationary phase triggers biofilm formation via LuxS quorum sensing system in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050368>
- Guagliardi, A., Cerchia, L., Moracci, M., & Rossi, M. (2000). The chromosomal protein Sso7d of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* rescues aggregated proteins in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 31813–31818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002122200>
- Guan, Z., Naparstek, S., Calo, D., & Eichler, J. (2012). Protein glycosylation as an adaptive response in Archaea: growth at different salt concentrations leads to alterations in *Haloflex volcanii* S-layer glycoprotein N-glycosylation. *Environmental Microbiology*, 14(3), 743–753. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02625.x>.Protein
- Harrison, J. J., Ceri, H., & Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 5(12), 928–938. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1774>
- Harrison, J. J., Turner, R. J., & Ceri, H. (2005). Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 7(7), 981–994. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00777.x>
- Henche, A. L., Koerdt, A., Gosh, A., & Albers, S.V. (2012). Influence of cell surface structures on crenarchaeal biofilm formation using a thermostable green fluorescent protein. *Environmental Microbiology*, 14(3), 779–793. <https://doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02638.x>.

- Harrison, S. (2016). Biotechnologies that utilize acidophiles. En: R. Quatrini & B. Johnson (Eds.), *Acidophiles: Life in extremely acidic environments* (pp. 256–284). Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190333.16>
- Koechler, S., Farasin, J., Cleiss-Arnold, J., & Arsène-Ploetze, F. (2015). Toxic metal resistance in biofilms: Diversity of microbial responses and their evolution. *Research in Microbiology*, 166(10), 764–773. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.03.008>
- Koerdt, A., Jachlewski, S., Ghosh, A., Wingender, J., Siebers, B. & Albers, S. V. (2012). Complementation of *Sulfolobus solfataricus* PBL2025 with an α -mannosidase : effects on surface attachment and biofilm formation. *Extremophiles*, 115–125. <https://doi.org/10.1007/s00792-011-0411-2>
- Koerdt, Andrea, Gödeke, J., Berger, J., Thormann, K. M., & Albers, S. V. (2010). Crenarchaeal biofilm formation under extreme conditions. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014104>
- Koerdt, Andrea, Orell, A., Pham, T. K., Mukherjee, J., Wlodkowski, A., Karunakaran, E., Biggs, C. A., Wright, P. C. & Albers, S. V. (2011). Macromolecular fingerprinting of *Sulfolobus* species in biofilm: a transcriptomic and proteomic approach combined with spectroscopic analysis. *Journal of Proteome Research*, 10(9), 4105–4119. <https://doi.org/10.1021/pr2003006>
- Kornberg, A., Rao, N. N., & Ault-riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 89–125.
- Laplagia, C., & Hartzell, P. L. (1997). Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3158–3163.
- Lemire, J., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Tharmalingam, S., & Appanna, V. D. (2017). Metabolic defense against oxidative stress: the road less travelled so far. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4):798-809. <https://doi.org/10.1111/jam.13509>
- Li, L., Banerjee, A., Bischof, L. F., Maklad, H. R., Hoffmann, L., Henche, A. L., Veliz, F., Bildl, W., Schulte, U., Orell, A., Essen, L. O., Peeters, E. & Albers, S. V. (2017). Wing phosphorylation is a major functional determinant of the Lrs14-type biofilm and motility

- regulator AbfR1 in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Molecular Microbiology*, 105(5), 777–793. <https://doi.org/10.1111/mmi.13735>
- Limauro, D., Pedone, E., Galdi, I., & Bartolucci, S. (2008). Peroxiredoxins as cellular guardians in *Sulfolobus solfataricus*- characterization of Bcp1, Bcp3 and Bcp4. *FEBS Journal*, 275(9), 2067–2077. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06361.x>
- Maaty, W. S., Wiedenheft, B., Tarylkov, P., Schaff, N., Heinemann, J., Robison-Cox, J., Valenzuela, J., Dougherty, A., Blum, P., Lawrence, C. M., Douglas, T., Young, M. J. & Bothner, B. (2009). Something old, something new, something borrowed; how the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* responds to oxidative stress. *PLoS ONE*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006964>
- Martínez-Bussenius, C., Navarro, C. A., & Jerez, C. A. (2016). Microbial copper resistance: importance in biohydrometallurgy. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12450>
- Martínez-Bussenius, C., Navarro, C. A., Orellana, L., Paradela, A., & Jerez, C. A. (2016). Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach. *Journal of Proteomics*, 145, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.039>
- Matsubara, M., & Mizuno, T. (2000). The SixA phospho-histidine phosphatase modulates the ArcB phosphorelay signal transduction in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 470, 118–124.
- Maupin-furlow, J. (2011). Proteasomes and protein conjugation across domains of life. *Nature Reviews Microbiology*, 10(2), 100–111. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2696>
- McCarthy, S., Ai, C., Wheaton, G., Tevatia, R., Eckrich, V., Kelly, R., & Blum, P. (2014). Role of an Archaeal PitA transporter in the copper and arsenic resistance of *Metallosphaera sedula*, an extreme thermoacidophile. *Journal of Bacteriology*, 196(20), 3562–3570. <https://doi.org/10.1128/JB.01707-14>
- Meyer, B. H., & Albers, S.V. (2013). Hot and sweet: protein glycosylation in Crenarchaeota. *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 384–392. <https://doi.org/10.1042/BST20120296>

- Meyer, B. H., Peyfoon, E., Dietrich, C., Hitchen, P., Panico, M., Morris, H. R., Dell, A. & Albers, S. V. (2013). Agl16, a thermophilic glycosyltransferase mediating the last step of N-glycan biosynthesis in the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology*, 195(10), 2177–2186. <https://doi.org/10.1128/JB.00035-13>
- Meyer, B. H., Zolghadr, B., Peyfoon, E., Pabst, M., Panico, M., Morris, H. R., Haslam, S. M., Messner, P., Schäffer, C., Dell, A. & Albers, S. V. (2011). Sulfoquinovose synthase – an important enzyme in the N-glycosylation pathway of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Molecular Microbiology*, 82(5):1150-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07875.x>
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 730–750. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>
- Nocek, B., Kochinyan, S., Proudfoot, M., Brown, G., Evdokimova, E., & Osipiuk, J. (2008). Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(46): 17730–17735. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807563105>
- Norris, P. R., Burton, N. P., & Clark, D. A. (2013). Mineral sulfide concentrate leaching in high temperature bioreactors. *Minerals Engineering*, 48, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2013.01.001>
- Orell, A., Navarro, C. A., Arancibia, R., Mobarec, J. C., & Jerez, C. A. (2010). Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals. *Biotechnology Advances*, 28(6), 839–848. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.07.003>
- Orell, A., Navarro, C. A., Rivero, M., Aguilar, J. S., & Jerez, C. A. (2012). Inorganic polyphosphates in extremophiles and their possible functions. *Extremophiles*, 16(4), 573–583. <https://doi.org/10.1007/s00792-012-0457-9>
- Orell, A., Fröls, S., & Albers, S.V. (2013a). Archaeal biofilms: The great unexplored. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 337–354. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155616>

- Orell, A., Peeters, E., Vassen, V., Jachlewski, S., Schalles, S., Siebers, B., & Albers, S.V. (2013b). Lrs14 transcriptional regulators influence biofilm formation and cell motility of Crenarchaea. *The ISME Journal*, 768(10), 1886–1898. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.68>
- Orell, A., & Guiliani, N. (2016). Biofilm formation by acidophile bacteria and archaea. En: D. B. Johnson & R. Quatrini (Eds.), *Acidophiles: Life in Extremely Acidic Environments* (pp. 139–152). Caister Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.21775/9781910190333.09>
- Oren, A., & Gurevich, P. (1995). Isocitrate lyase activity in halophilic archaea. *FEMS Microbiology Letters*, 130(1), 91–95. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(95\)00189-C](https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00189-C)
- Outten, F. W. (2015). Recent advances in the Suf Fe – S cluster biogenesis pathway : Beyond the Proteobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(6), 1464–1469. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.001>
- Peyfoon, E., Meyer, B., Hitchen, P. G., Panico, M., Morris, H. R., Haslam, S. M., Albers, S. V., Dell, A. (2010). The S-Layer glycoprotein of the crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius* is glycosylated at multiple sites with chitobiose-linked N-Glycans. *Archaea*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/754101>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pham, A. N., Xing, G., Miller, C. J., & Waite, T. D. (2013). Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. *Journal of Catalysis*, 301, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.jcat.2013.01.025>
- Rashid, M. H., Rao, N. N., & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of Bacteriology*, 182(1), 225–227. <https://doi.org/10.1128/jb.182.1.225-227.2000>
- Rashid, M. H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D. G., Hamood, a N., Iglewski, B. H., & Kornberg, a. (2000). Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9636–9641. <https://doi.org/10.1073/pnas.170283397>
- Reichmann, D., Voth, W., & Jakob, U. (2018). Maintaining a healthy proteome during oxidative stress. *Molecular Cell*, 69(2), 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.021>.
- Reimann, J., Esser, D., Orell, A., Amman, F., Pham, T. K., Noirel, J., Lindås A. C., Bernander, R., Wright, P. C., Siebers, B. & Albers, S. V. (2013). Archaeal signal transduction: impact of protein phosphatase deletions on cell size, motility, and energy metabolism in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 12(12), 3908–3923. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.027375>
- 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. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28241-0>
- Rigden, D. J. (2008). The histidine phosphatase superfamily : structure and function. *The Biochemical Journal*, 348, 333–348. <https://doi.org/10.1042/BJ20071097>
- Rinker, K. D., & Kelly, R. M. (1996). Growth physiology of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: Development of a sulfur-free defined medium, characterization of an exopolysaccharide, and evidence of biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4478–4485.
- Rivero, M., Torres-Paris, C., Muñoz, R., Cabrera, R., Navarro, C. A., & Jerez, C. A. (2018). Inorganic polyphosphate, exopolyphosphatase , and Pho84-like transporters may be involved in copper resistance in *Metallosphaera sedula* DSM 5348 T. *Archaea*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5251061>
- Salzano, A. M., Febbraio, F., Farias, T., Cetrangolo, G. P., Nucci, R., Scalon, A., & Manco, G. (2007). Redox stress proteins are involved in adaptation response of the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* to nickel challenge. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-25>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y. , White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for

- biological-image analysis. *Nature Methods*, 9, 676. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Shi, X., Rao, N. N., & Kornberg, A. (2004). Inorganic polyphosphate in *Bacillus cereus*: motility, biofilm formation, and sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(49), 17061–17065. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407787101>
- Soto, D.F., Recalde, A., Orell, A., Albers, S. V., Paradela, A., Navarro, C. A., & Jerez, C. A. (2019). Global effect of the lack of inorganic polyphosphate in the extremophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*: A proteomic approach. *Journal of Proteomics*, 191, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.024>
- Soto, Daniela Fernanda. (2012). Efecto de la carencia de polifosfatos inorgánicos en la expresión global de proteínas y en los determinantes de resistencia a cobre en el arqueón *Sulfolobus solfataricus*. Tesis para optar al grado de Bioquímico. Universidad de Chile.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Ulas, T., Riemer, S. A., Zaparty, M., Siebers, B., & Schomburg, D. (2012). Genome-scale reconstruction and analysis of the metabolic network in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus Solfataricus*. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043401>
- van Wolferen, M., Orell, A., & Albers, S. V. (2018). Archaeal biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0058-4>
- Varela, C., Mauriaca, C., Paradela, A., Albar, J. P., Jerez, C. A., & Chávez, F. P. (2010). New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: a cellular and proteomic study. *BMC Microbiology*, 10, 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-7>
- Villafane, A., Voskoboynik, Y., Cuebas, M., Ruhl, I., & Bini, E. (2010). Response to excess copper in the hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus* strain 98/2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385(1), 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.05.013>.Response

- Völlmecke, C., Drees, S. L., Reimann, J., Albers, S., Lu, M., & Lu, M. (2012). The ATPases CopA and CopB both contribute to copper resistance of the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Microbiology*, 158, 1622–1633. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055905-0>
- Wagner, M., Wolferen, M. Van, Wagner, A., Lassak, K., Meyer, B. H., Reimann, J., & Albers, S. V. (2012). Versatile genetic tool box for the crenarchaeote *Sulfolobus acidocaldarius*. *Frontiers in Microbiology*, 3:214, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00214>
- Wheaton, G. H., Mukherjee, A., & Kelly, R. M. (2016). Transcriptomes of the extremely thermoacidophilic archaeon *Metallosphaera sedula* exposed to metal “ shock ” reveal generic and specific metal responses. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4613–4627. <https://doi.org/10.1128/AEM.01176-16>
- Zhang, C., Phillips, A. P. R., Wip, R. L., Olsen, G. J., & Whitaker, R. J. (2018). The essential genome of the crenarchaeal model *Sulfolobus islandicus*. *Nature Communications*, (2018), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07379-4>
- Zhang, R., Neu, T. R., Bellenberg, S., Kuhlicke, U., Sand, W., & Vera, M. (2015). Use of lectins to in situ visualize glycoconjugates of extracellular polymeric substances in acidophilic archaeal biofilms. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 448–461. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12188>
- Zhang, R., Neu, T. R., Blanchard, V., Vera, M., & Sand, W. (2019). Biofilm dynamics and EPS production of a thermoacidophilic bioleaching archaeon. *New Biotechnology*, 51, 21–30. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2019.02.002>
- Zolghadr, B., Kling, A., Koerdt, A., Driessen, A. J. M., Rachel, R., & Albers, S. V. (2010). Appendage-mediated surface adherence of *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 192(1), 104–110. <https://doi.org/10.1128/JB.01061-09>

10. ANEXOS

ANEXO 1. Verificación de cepa

Se realizó la verificación de las cepas M16-PPX [PoliP (-)] y M16 (WT) almacenadas en el laboratorio. Para ello se midieron los niveles de PoliP en ambas cepas en presencia del inductor D-Arabinosa (D-Ara) o Glucosa (Glu) como control (fig. S1). Los niveles de PoliP se normalizaron por la cantidad de proteínas. Las mediciones de PoliP se realizaron según el método descrito en la sección de materiales y métodos luego de 3 h de inducción.

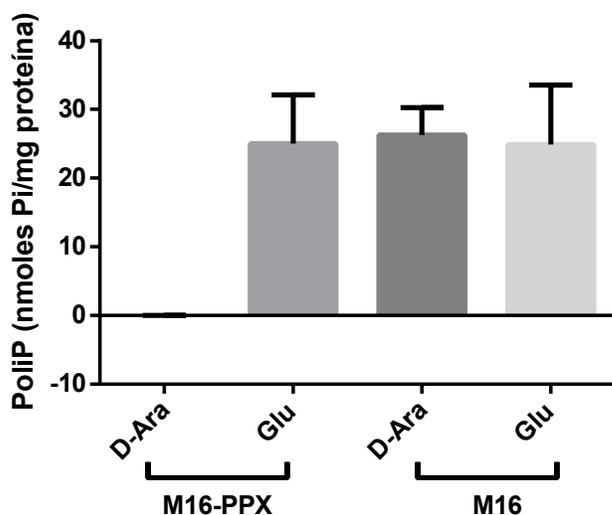


Figura S1. Confirmación de cepa mediante medición de niveles de PoliP ante diferentes inductores. Niveles de PoliP normalizados por cantidad de proteína, al cabo de 3 h de inducción con D-Ara o Glu, en las cepas M16 y M16-PPX en fase exponencial de crecimiento.

Según se observa en la fig. S1, en presencia de D-Ara se pudo comprobar la desaparición de PoliP a niveles no detectables por nuestro método, según lo esperado para la cepa M16-PPX. Mientras que en la cepa M16 los niveles se mantuvieron constantes en presencia de ambos inductores, así como en la M16-PPX en presencia de glucosa.

ANEXO 2. Lista de partidores utilizados en esta tesis

Tabla S1. Lista de partidores utilizados para qPCR

Locus	Gen	Primer Foward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')
SSO0749	16s	GGTAGCAAGTAGACCCTATGC	GGTATCAGCAAAAGCGACAA
SSO0067	30s – <i>Rps2P</i>	GGTAGCAAGTAGACCCTATGC	GGTATCAGCAAAAGCGACAA
SSO1101	Reg transcripcional	GTTTTTCTAGATCTGCCTCC	GACTACTGATGATCTCTCCC
SSO1108	Lrs14-like	AGTTAGGCTCCCATCTGG	CGATGATGAGTCCTTTACCC
SSO0458	Probable <i>abfR1</i>	GGTCTTCCTCCTCTACTCAC	TGGTCTATCAGAGGCAGATG
SSO0120	<i>upsE</i>	CCTCACGAGATACTGTAGCTGC	CCCTGTCACTGTAGTTCATAGGA
SSO2323	<i>flaB</i>	TGCAGTAAACGAGATGGCTG	TGACACAGAAAGCCAAATCCAC
SSO0053	Transportador ABC	ACTCTTCGTACATAACCCCC	AGGTACCGAATGAGTGTGG
SSO3006	<i>α manosidasa</i>	TCTATCCCTCATCCTTAGCG	CGTGGGATATCGAGAAGGG
SSO2651	<i>copA</i>	TGGTGTAAGATGCCGAAG	TGGAGTAGTGGTCTCTGGATTG
saci_0446	<i>abfR1</i>	TCACCCTTTCCAACCCTATC	GCTAGTACCTACACCGAGAC
saci_1300	16s	CTTTTCGAGGTAGCATCCCG	GTGAAATGTCCGGTTAAGTCC
saci_1178	<i>flaB</i>	ACTGCGTCTACTGCGTTATCTT TATC	GGAGATAAGTCTACACTAGATAC ACCAGAA
saci_2317	<i>aapE</i>	GGGGCTCATTACATTAACCTCTT TAT	GAAAGGAGATTACGCTAATGGA CTT

Tabla S2. Lista de partidores utilizados para clonamiento

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Gen diana / Sitio de corte
10900	GACTCCATGGGCCCTCTACGGTCTAAGTTG	Saci_2018_US_FW_Ncol
10901	GCTATGAGAATACCCTTCATTCACATCAACTTCATTACCTTC	Saci_2018_US_RV
10902	GAAGGTAATGAAGTTGATGTGAATGAAGGGTATTCTCATAGCC	Saci_2018_DS_FW
10903	GACTGGGCCCCTACTTTATGAAGCCCTCCTC	Saci_2018_DS_RV_Apal
10904	ATATATGCTCTTCTAGTCGATATGCGGTAATAGACACGGGTTAC	Saci_2018_FX_fw_Sapl
10905	TATATAGCTCTTCATGCTAGCACACCAGCCACTGACGACTCTAC	Saci_2018_FX_rv_Sapl

Tabla S3. Lista de partidores utilizados para secuenciamiento

Nombre	Secuencia (3'→ 5')	Gen diana / Sitio de corte
10906	AGATGAAGAGAGTTGCGTCATTACT	Saci_2018_KO_fw for seq
10907	CAGGGGTAAGGTTAGGGAATACATC	Saci_2018_KO_rv for seq

ANEXO 3.

Imágenes de Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas

Figura S2. Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16 (WT)

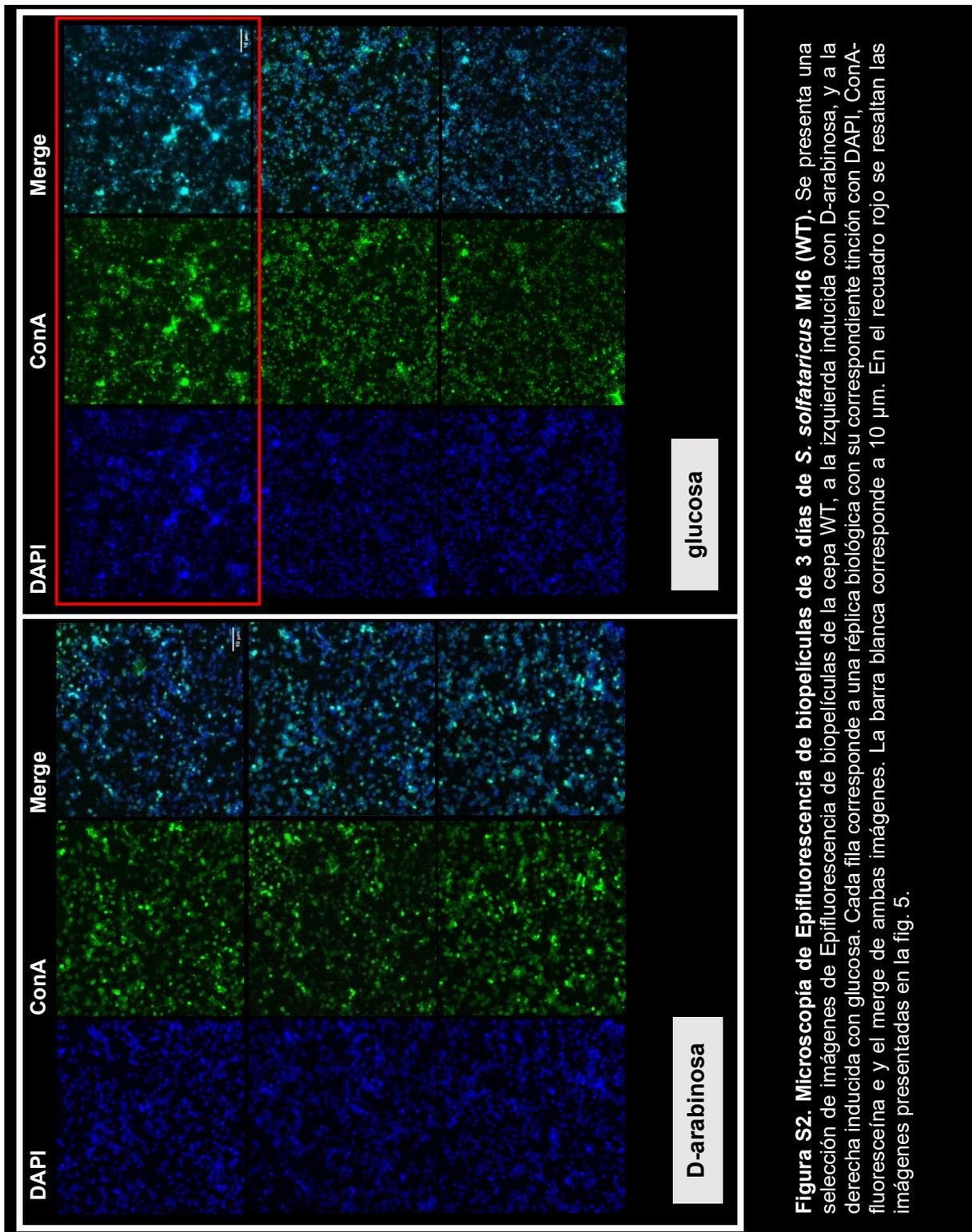
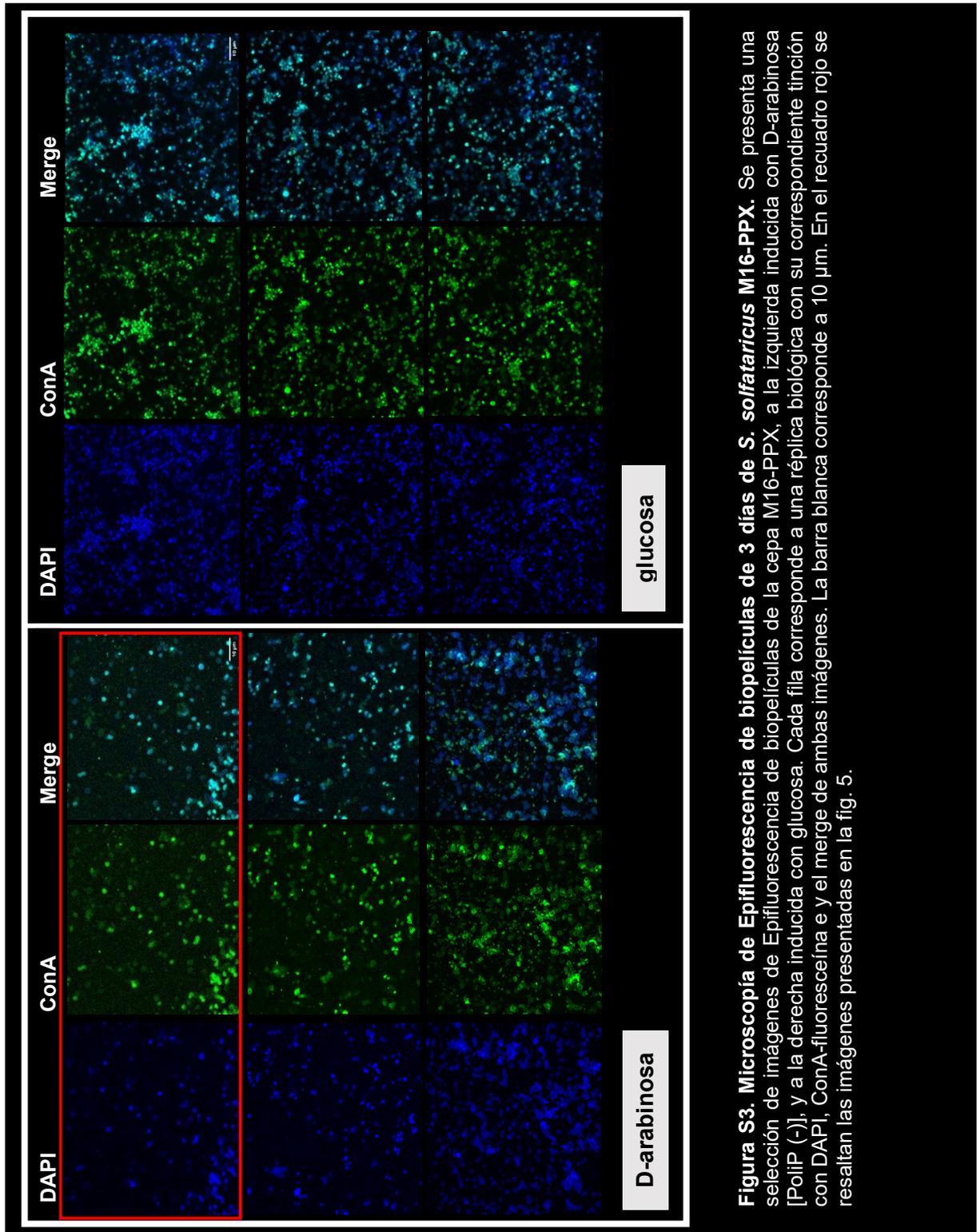


Figura S2. Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16 (WT). Se presenta una selección de imágenes de Epifluorescencia de biopelículas de la cepa WT, a la izquierda inducida con D-arabinosa, y a la derecha inducida con glucosa. Cada fila corresponde a una réplica biológica con su correspondiente tinción con DAPI, ConA-fluoresceína e y el merge de ambas imágenes. La barra blanca corresponde a 10 µm. En el recuadro rojo se resaltan las imágenes presentadas en la fig. 5.

Figura S3. Microscopía de Epifluorescencia de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16-PPX [PoliP (-)]



ANEXO 4.

Imágenes de Microscopía Confocal Laser de biopelículas

Figura S4. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16 (WT).

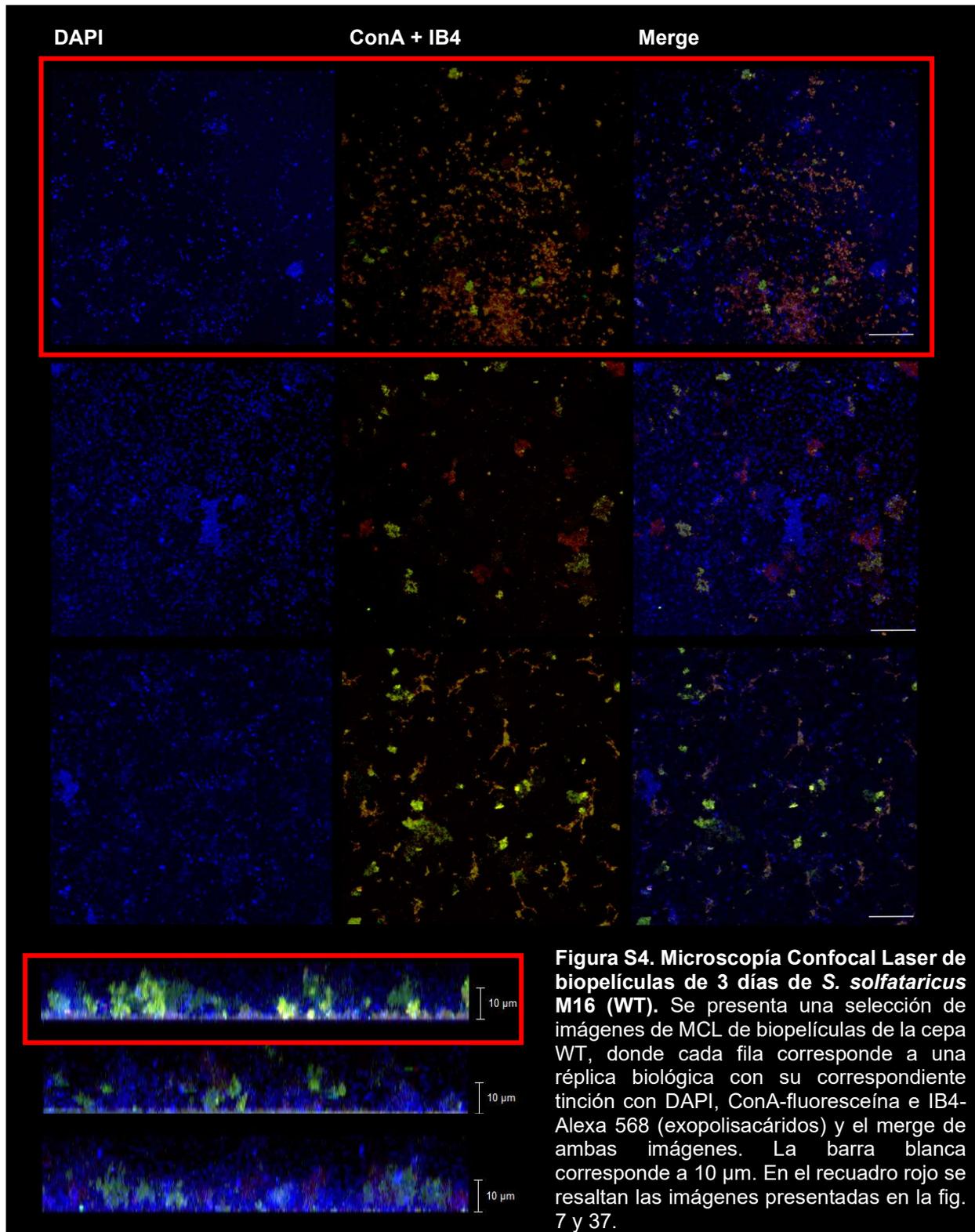


Figura S5. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16-PPX [(PoliP (-))]

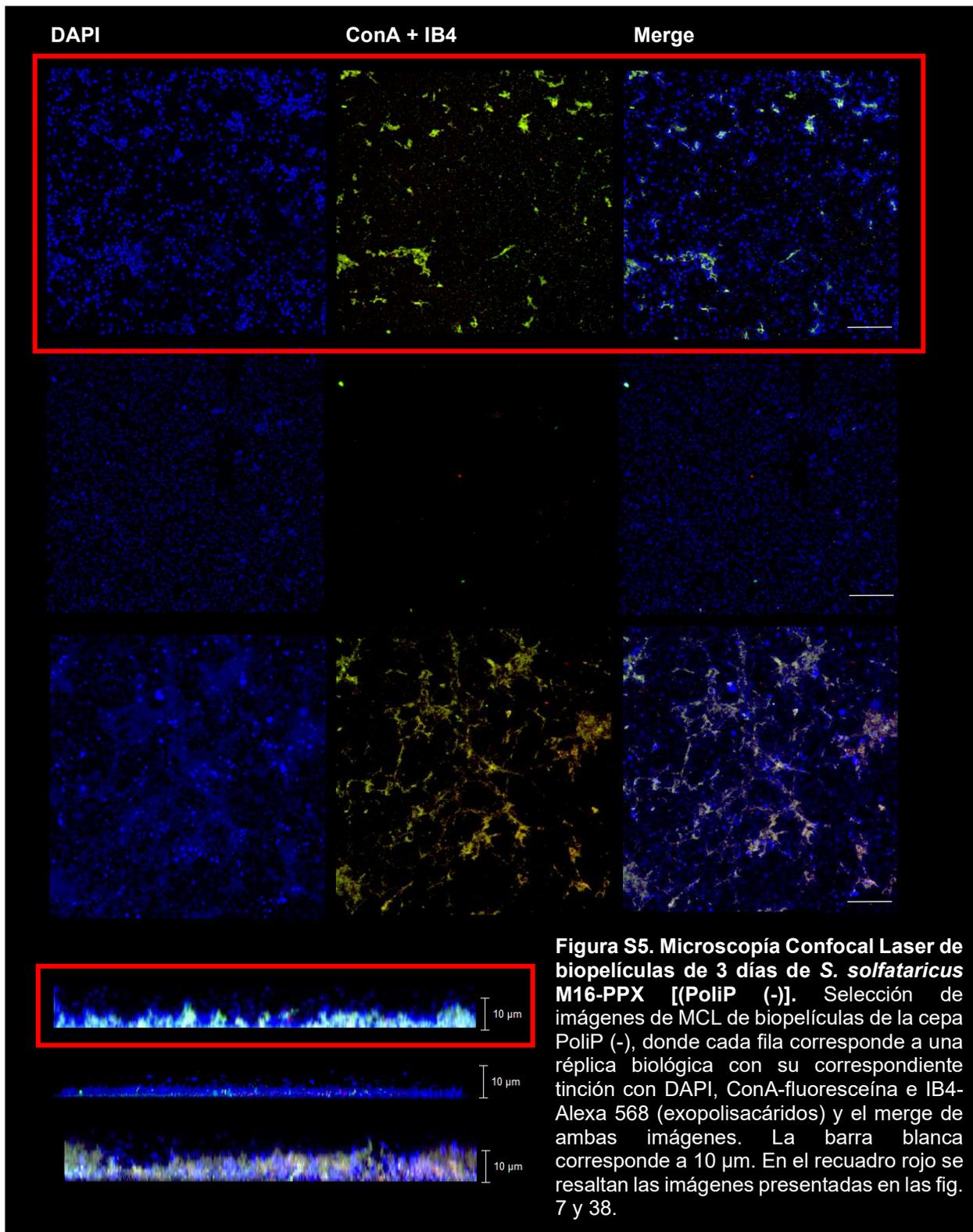


Figura S5. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16-PPX [(PoliP (-))]. Selección de imágenes de MCL de biopelículas de la cepa PoliP (-), donde cada fila corresponde a una réplica biológica con su correspondiente tinción con DAPI, ConA-fluoresceína e IB4-Alexa 568 (exopolisacáridos) y el merge de ambas imágenes. La barra blanca corresponde a 10 µm. En el recuadro rojo se resaltan las imágenes presentadas en las fig. 7 y 38.

Figura S6. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. acidocaldarius* MW001 (WT)

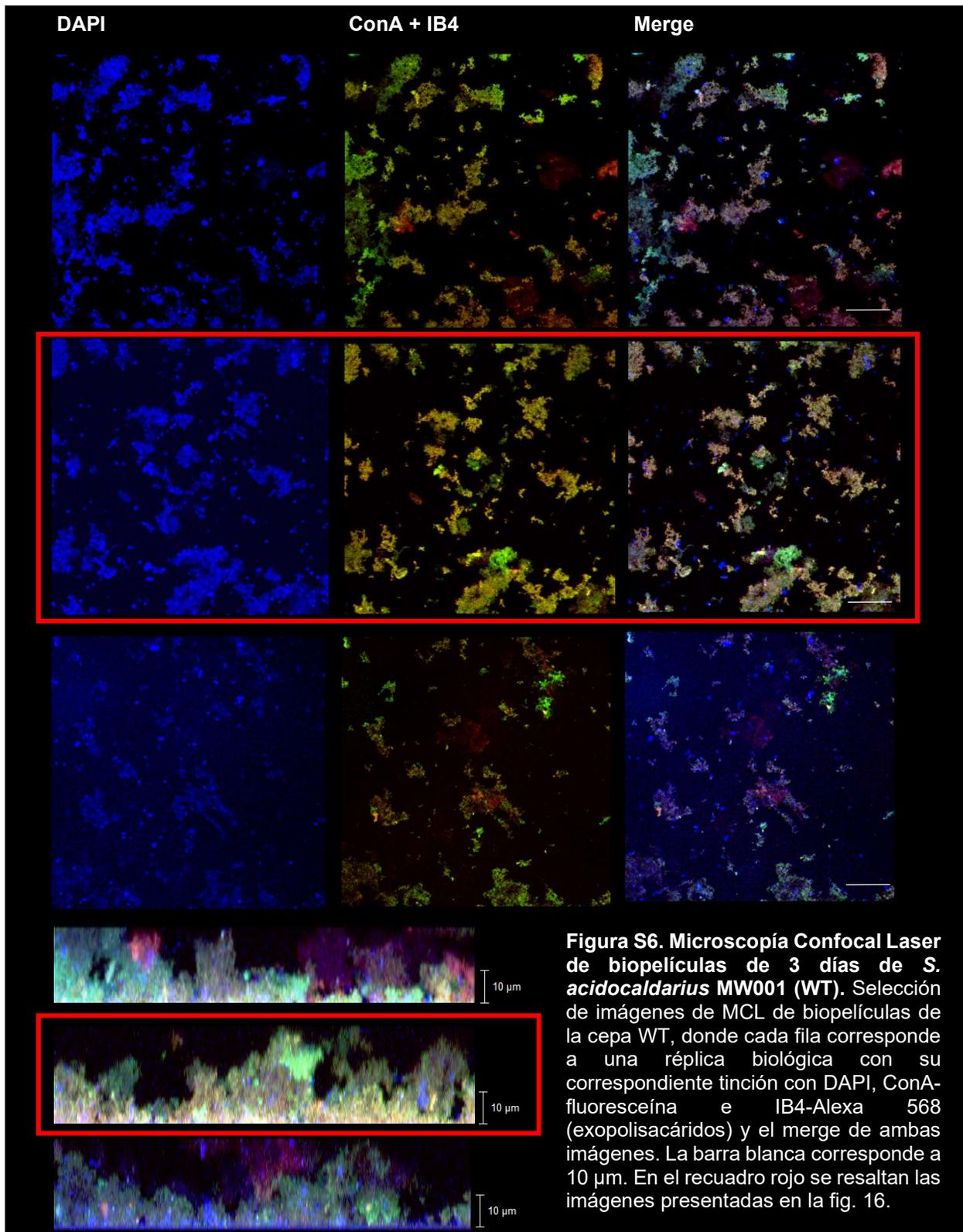


Figura S6. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. acidocaldarius* MW001 (WT). Selección de imágenes de MCL de biopelículas de la cepa WT, donde cada fila corresponde a una réplica biológica con su correspondiente tinción con DAPI, ConA-fluoresceína e IB4-Alexa 568 (exopolisacáridos) y el merge de ambas imágenes. La barra blanca corresponde a 10 µm. En el recuadro rojo se resaltan las imágenes presentadas en la fig. 16.

Figura S7. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. acidocaldarius* MW-001-PPX [PoliP (-)]

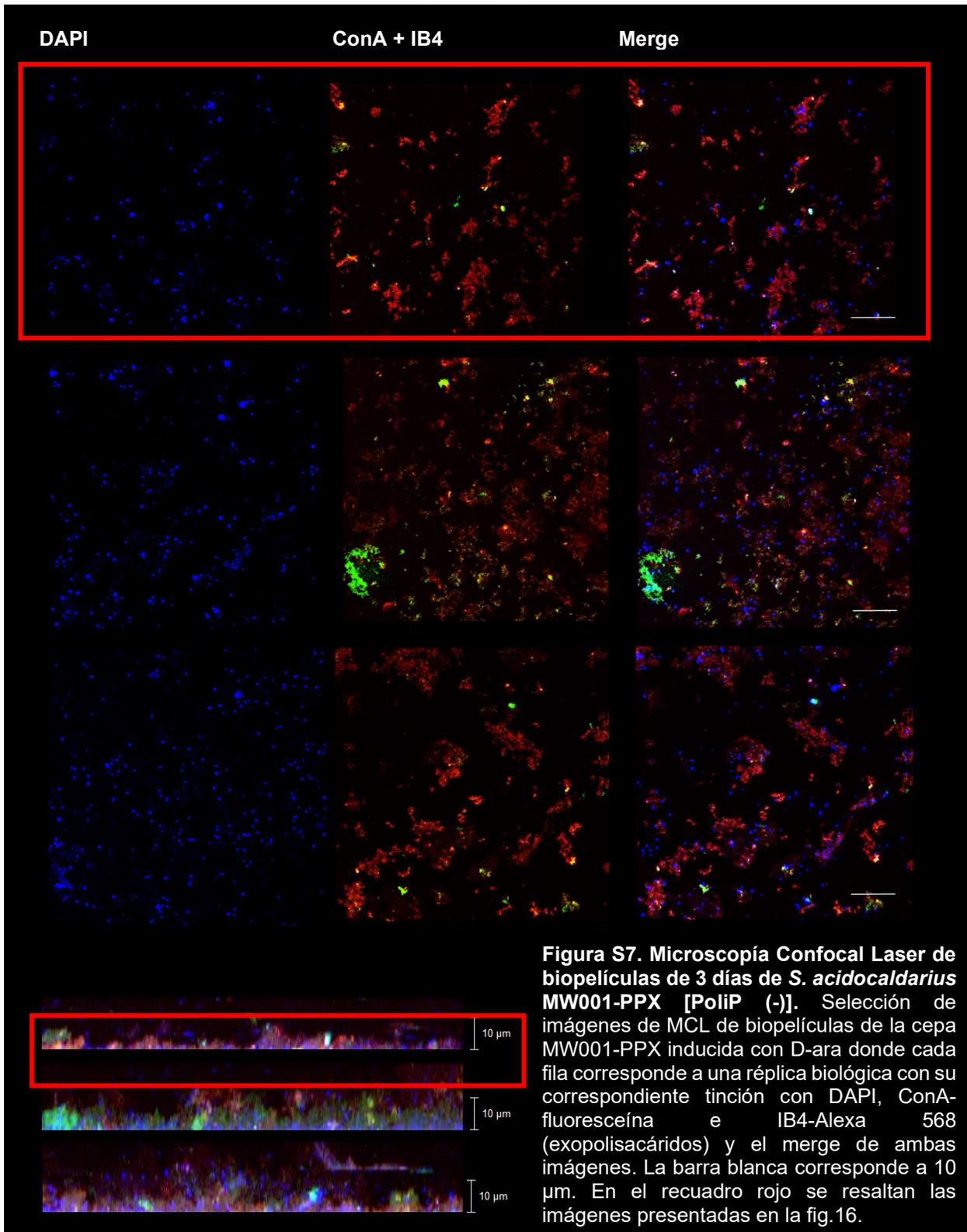


Figura S8. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16 en presencia de 0,5 mM Cu₂

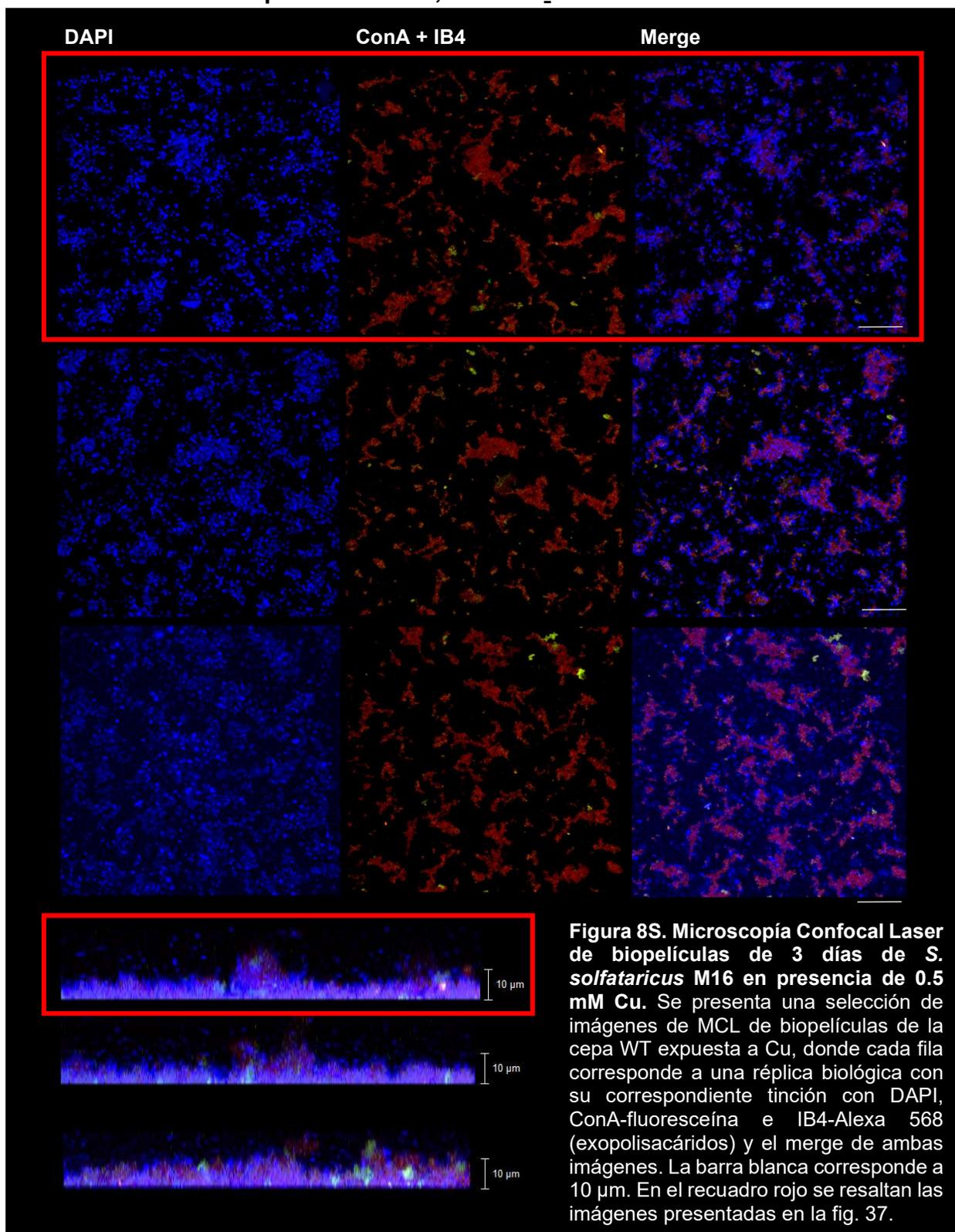
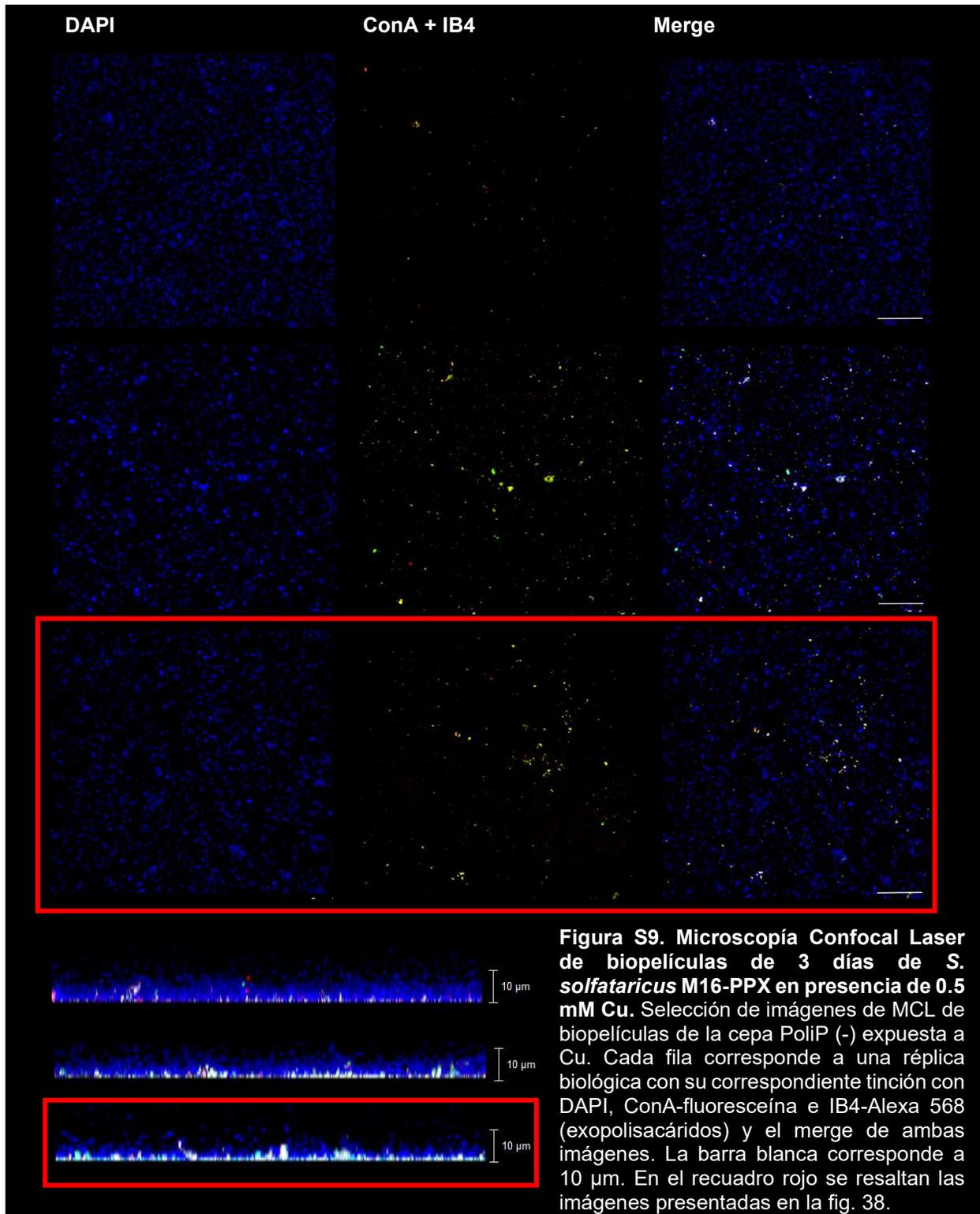


Figura S9. Microscopía Confocal Laser de biopelículas de 3 días de *S. solfataricus* M16-PPX en presencia de 0,5 mM Cu.



ANEXO 5.

Tablas de proteómicas

Tabla S4. Proteínas aumentadas en *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT en células planctónicas

ID protein	Locus		log2 fold change
Metabolism			
Energy production and conversion			
Q97VI0	SSO2643	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain C (Anaerobic) (GlpC)	0.409
Q9UWW5	SSO0561	V-type ATP synthase subunit E	0.391
Q97VH0	SSO2656	Quinol oxidase (SoxABC), cytochrome B subunit (SoxC)	0.456
Q97YT9	SSO1218	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	0.719
Q97VG9	SSO2657	Quinol oxidase (SoxABC), cytochrome aa3 subunit (SoxB)	0.509
Q980G8	SSO0329	NADH dehydrogenase subunit N (NuoN)	0.471
Q97VP2	SSO2574	Zinc-containing ferredoxin	0.44
Q9UWW3	SSO0559	V-type ATP synthase subunit I	0.235
Q97VG8	SSO2658	Quinol oxidase (SoxABC), subunit II (SoxA)	0.364
Q97V18	SSO2819	FIXC protein homolog (FixC)	0.201
Q97V19	SSO2817	Electron transfer flavoprotein alpha and beta-subunit (EtfAB/fixAB)	0.199
Q7LXY8	SSO0106	Uncharacterized protein	0.19
Q7LX54	SSO2150	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-3)	0.18
Q97ZR2	SSO6175	ATP synthase subunit G (AtpG)	0.286
Amino acid transport and metabolism			
Q97VK5	SSO2619	Dipeptide ABC transporter, periplasmic dipeptide binding protein (DppA)	0.441
Q97YQ1	SSO1273	Uncharacterized protein	0.5
Q97U33	SSO3189	Amino acid transporter, putative	0.817
Q97VK8	SSO2616	Dipeptide ABC transporter ATP binding protein (DppD-3)	0.611
Q97W70	SSO2367	Homoserine kinase	0.345
Q9UX31	SSO0638	Argininosuccinate synthase	0.238
Q97Z63	SSO1069	Amino acid transporter	0.504
Q7LYI9	SSO3003	Glucose 1-dehydrogenase 1	0.199
Q97YP8	SSO1276	Oligo/dipeptide transport, ATP binding protein (DppD-1)	0.36
Q97VM5	SSO2597	Serine-pyruvate aminotransferase (AgxT)	0.199
Q97ZL7	SSO0876	Aspartokinase	0.205
Carbohydrate transport and metabolism			
Q97YY1	SSO1171	Maltose ABC transporter	0.382
Q97VC2	SSO2712	Uncharacterized protein	0.32

Q97UZ1	SSO2847	Sugar-binding periplasmic protein	0.287
Coenzyme transport and metabolism			
Q97W72	SSO10285	Uncharacterized protein	0.458
Q97WC7	SSO2303	Probable cobalt-precorrin-6B C(15)-methyltransferase (decarboxylating)	0.379
Q97W45	SSO2399	Uncharacterized protein	0.254
Lipid transport and metabolism			
Q97VV0	SSO2507	Uncharacterized protein	0.414
Q9UWU0	SSO0535	UPF0219 protein SSO0535	0.393
Inorganic ion transport and metabolism			
Q97ZT8	SSO0489	Phosphate-binding protein	0.452
Nucleotide transport and metabolism			
Q97YV9	SSO1193	Exopolyphosphatase (Metaphosphatase), putative	1.156
Cellular processes and signaling			
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning			
Q97ZL3;Q97ZX1	SSO0881/SS00451	Uncharacterized protein/Uncharacterized protein	0.529
Q97ZW4	SSO0460	Iron-sulfur cluster carrier protein	0.248
Cell wall/ Membrane/ Envelope biogenesis			
Q980X4	SSO0151	D-arabino 3-hexulose 6-phosphate formaldehyde lyase (HpS-1)	0.25
Q97VG1	SSO2665	Muconate cycloisomerase related protein	0.22
Q97V08	SSO2829	Uncharacterized protein	0.302
Defense mechanism			
Q97ZI2	SSO0925	ABC transporter	0.275
Q97Y94	SSO1439	Uncharacterized protein	0.435
Q97WX3	SSO1988	CRISPR system CMR subunit Cmr5	0.292
Q97VL7	SSO2606	Uncharacterized protein	0.257
Intracellular trafficking, secretion and vesicular transport			
Q9UX84	SSO0695	Protein translocase subunit SecY	0.363
Q980W2	SSO0165	Signal recognition particle 19 kDa protein	0.38
Information storage and processing			
Translation ribosomal structure and biogenesis			
Q97ZQ4	SSO6401	50S ribosomal protein L23	0.429
P96037	SSO0346	50S ribosomal protein L11	0.368
Q97ZN1	SSO0857	Arginine--tRNA ligase	0.267
Q980J7	SSO0294	50S ribosomal protein L10e	0.232
Transcription			
Q97X74	SSO1879	ATP-dependent helicase, putative	0.426
Q980S7	SSO0200	Uncharacterized protein	0.881
P96036	SSO0347	Transcription elongation factor Spt5	0.255
Q980R4	SSO0220	Probable transcription termination protein NusA	0.223
Replication, Recombination and Repair			
Q97WH8	SSO2241	BPS2 protein homolog (Bps2)	0.3

P95980	SSO0079	DNA primase DnaG	0.231
Q9UXF5	SSO0768	Replication factor C small subunit	0.213
Q9UXF6	SSO0769	Replication factor C large subunit	0.256
Postranscriptional modification, Protein Turnover, Chaperones			
Q97VL0	SSO2613	Peroxiredoxin, bacterioferritin comigratory protein homolog (Bcp-4)	0.348
Q97ZI0	SSO0928	Uncharacterized protein	0.284
Q97X00	SSO1960	Uncharacterized protein	0.228
P95895	SSO2121	Peroxiredoxin	0.232
Q97Z06	SSO1141	Protease related protein	0.263
Q97WN1	SSO2181	Peptidase related protein	0.321
Q7LY06	SSO0052	Hydrogenase expression/formation protein (HypE)	0.374
P58179	SSO0349	Prefoldin subunit alpha	0.592
Poorly Characterized			
Function unknown			
Q97U74	SSO12067	Second ORF in partial transposon ISC1160	1.497
Q97V24	SSO2812	Uncharacterized protein	0.833
Q97VJ3	SSO2629	Oxidoreductase (Flavoprotein)	0.331
Q9Y8K9	SSO0428	Uncharacterized protein	0.388
Q97ZF7	SSO0961	Uncharacterized protein	0.354
Q7LXZ0	SSO0097	Uncharacterized protein	0.302
Q97ZR0	SSO6206	Uncharacterized protein	0.745
Q97VF0	SSO2677	Uncharacterized protein	0.519
Q97XX6	SSO1583	Uncharacterized protein	1.163
Q97UB8	SSO3099	Uncharacterized protein	0.51
P95962	SSO0099	Metal-dependent hydrolase	0.264
Q7LYJ5	SSO2083	Uncharacterized protein	0.407
Q980C7	SSO0389	S-layer protein A	0.248
rev_Q97V Q8	SSO2555	Uncharacterized protein	0.545
Q980S3	SSO0205	Uncharacterized protein	0.261
Q980B2	SSO0403	Uncharacterized protein	0.263
Q97VZ4	SSO2457	Uncharacterized protein	0.444
Q980V6	SSO0171	Uncharacterized protein	0.257
Q97W32	SSO2410	Uncharacterized protein	0.238
Q97ZU6	SSO0481	Uncharacterized protein	0.315
Q97XX4	SSO1586	Uncharacterized protein	0.651

Tabla S5. Proteínas disminuidas en *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT en células planctónicas

ID protein	Locus		log2 fold change
Metabolism			
Energy production and conversion			
Q97XP8	SSO1663	N-methylhydantoinase A (HuyA-1)	-0.66
Q97YI8	SSO1333	Isocitrate lyase (AceA/icl)	-0.507
Q97UA1	SSO3117	2,5-dioxopentanoate dehydrogenase	-0.44
Q97Y23	SSO1525	Pyruvate dehydrogenase, alpha subunit (Lipoamide). (PdhA-2)	-0.887
Q97YM2	SSO1300	Alcohol dehydrogenase (Zn containing) (Adh-4)	-0.379
Q97XA5;Q97XS9	SSO1842/SO1629	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NADP dependent (GapN-1) / (GapN-2)	-0.399
Q97VN4	SSO2585	Malate dehydrogenase	-0.286
Q97UG6	SSO3054	Oxidoreductase	-0.394
P80148	SSO2589	Citrate synthase	-0.252
Q97V74	SSO2760	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-5)	-0.298
Q97YV0	SSO1206	Pyruvate synthase beta chain (Pyruvic-ferredoxin oxidoreductase beta chain) (PorB-1)	-0.541
Q97XA5	SSO1842	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NADP dependent (GapN-2)	-0.238
Q97UJ7	SSO3014	Oxidoreductase	-0.206
Q97ZB9	SSO1004	Uncharacterized protein	-0.202
Amino acid transport and metabolism			
Q97UI2	SSO3035	Dihydrodipicolinate synthase (DapA-2)	-0.397
Q97XP9	SSO1662	N-methylhydantoinase B (HuyB-1)	-0.44
Q97XP3	SSO1668	N-methylhydantoinase A related protein (HuyA-like)	-0.646
Q97UR7;Q97WV3	SSO2934/SO2010	N-methylhydantoinase B (HuyB-3)/N-methyl hydantoinase B (HuyB-2)	-0.573
Q97UH6	SSO3042	Glucose 1-dehydrogenase 2	-0.267
Q97WV3	SSO2010	N-methyl hydantoinase B (HuyB-2)	-0.24
Q97W36	SSO2407	Probable 2-isopropylmalate synthase	-0.297
Q97UB2	SSO3107	Dihydroxy-acid dehydratase	-0.223
Q980I7	SSO0307	Chorismate synthase	-0.367
Q97WV4	SSO2008	N-methyl hydantoinase A (HuyA-2)	-0.201
Q97Y99	SSO1433	Uncharacterized protein	-0.342
Q97ZM1	SSO0871	Ornithine carbamoyltransferase	-0.192
Q980J1	SSO0302	Chorismate mutase/prephenate dehydratase, putative (TyrA)	-0.258
Nucleotide transport and metabolism			

Q9UX08	SSO0614	Aspartate carbamoyltransferase	-0.388
Q9UX07	SSO0613	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	-0.362
Q97VV7	SSO2498	Ribonucleotide reductase small subunit, probable (NrdB)	-0.584
Q980Q7	SSO0230	Nucleoside diphosphate kinase	-0.243
Q97WH6	SSO2243	Purine nucleosidase, putative (IunH-2)	-0.222
Q9UX29	SSO0636	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo-ligase	-0.646
Carbohydrate transport and metabolism			
Q97U18	SSO3029	Uncharacterized protein	-0.415
Q97ZG6	SSO0950	Uncharacterized protein	-0.601
Q97U29	SSO3195	2-dehydro-3-deoxygluconokinase/2-dehydro-3-deoxygalactonokinase	-0.278
Q7LX99	SSO2094	Glycogen debranching enzyme (TreX)	-0.45
Coenzyme transport and metabolism			
Q980B4	SSO0401	Riboflavin synthase	-0.594
Q7LXS2	SSO0612	Uncharacterized protein	-0.533
Q97W49	SSO2393	Phosphomethylpyrimidine kinase (ThiD-2)	-0.284
Lipid transport and metabolism			
Q97VU7	SSO2510	Medium-chain-fatty-acid--CoA ligase (AlkK-2)	-0.265
Q97W61	SSO2377	Acetyl-CoA c-acetyltransferase (Acetoacetyl-CoA thiolase) (AcaB-4)	-0.428
Q97U78	SSO3145	Acyl-CoA dehydrogenase (Acd-7)	-0.343
Q97WQ0	SSO2070	Acetyl-CoA synthetase (Acetate-CoA ligase) (AcsA-7)	-0.224
Q97YZ6	SSO1153	Acyl-CoA dehydrogenase (Acd-1)	-0.196
Q97VU6	SSO2511	Acyl-CoA dehydrogenase (Acd-4)	-0.232
Q97UK3	SSO3008	Dehydrogenase, putative	-0.263
Q97UK0	SSO3011	Dehydrogenase, putative	-0.197
Inorganic ion transport and metabolism			
Q97XC6	SSO1817	Sulfurtransferase	-0.587
Q97UG5	SSO3055	Maltose ABC transporter, ATP-binding protein	-0.324
Q97V99	SSO2735	Uncharacterized protein	-0.237
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism			
Q97VV3	SSO2503	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (AbfD-1)	-0.253
Q97UR3	SSO2939	Maleate cis-trans isomerase, probable (MaiA)	-0.274
Cellular processes and signaling			
Cell wall/ Membrane/ Envelope biogenesis			
Q97VL4	SSO2609	Trehalose phosphorylase, putative	-0.393
Q97U96	SSO3124	Arabinonate dehydratase	-0.343
P95871	SSO2098	Tricorn protease homolog	-0.196
Q97ZD1	SSO0989	Sugar phosphate nucleotidyl transferase	-0.198
Defense mechanism			

Q7LX64	SSO2137	ABC transporter, ATP binding protein	-0.355
Q7LXM6	SSO0686	Uncharacterized protein	-0.387
Q97YA6	SSO1426	Uncharacterized protein	-0.206
Information storage and processing			
Translation ribosomal structure and biogenesis			
P96040	SSO0342	50S ribosomal protein L12	-0.373
Q97ZG0	SSO6855	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit C	-0.537
P39573	SSO0219	30S ribosomal protein S12	-0.262
Q980Q6	SSO5478	50S ribosomal protein L24e	-0.492
Q980F9	SSO5672	50S ribosomal protein L39e	-0.376
Q9UX92	SSO0703	30S ribosomal protein S8	-0.207
Q7LXK5	SSO0750	Uncharacterized protein	-0.506
Q7LXR5	SSO0627	Methionyl-tRNA synthetase N-term homolog (MetS-like)	-0.278
P58084	SSO0711	50S ribosomal protein L29	-0.237
Q9UX95	SSO0707	50S ribosomal protein L24	-0.2
Transcription			
Q97Z30	SSO1110	Transcriptional regulator, putative	-0.46
O93774	SSO1108	HTH-type transcriptional regulator lrs14	-0.45
Q97VX8	SSO10449	Uncharacterized protein	-0.342
Q7LXS6	SSO0606	Transcriptional regulator, putative	-0.288
rev_Q7LX67	SSO2131	Transcriptional regulator homolog (Lrp/AsnC family)	-0.48
Q981A1	SSO0048	Transcriptional regulator, putative	-0.252
Q97VL3	SSO2610	Uncharacterized protein	-1.012
Q7LX63	SSO2138	Uncharacterized protein	-0.467
Q97ZW5	SSO0458	Transcriptional regulator, putative	-0.379
Q97XA7	SSO1839	Coenzyme PQQ synthesis protein E (PqqE-4)	-0.503
Q97XS8	SSO1631	Coenzyme PQQ synthesis protein E (PqqE-2)	-0.564
Q7LXK4	SSO0751	DNA-directed RNA polymerase, subunit F (RpoF)	-0.341
Q980R0	SSO3254	DNA-directed RNA polymerase, subunit B'' (RpoB2)	-0.191
Replication, Recombination and Repair			
Q97ZE3	SSO6901	Chromatin protein Cren7	-0.5
Q7LX34	SSO1202	Transposase ISC1058	-1.406
Q97UP9	SSO2956	First ORF in transposon ISC1212	-0.637
P81552	SSO0046.1	Repressor-like protein SSo7c4	-0.346
rev_Q97Y87	SSO1448	Transposase ISC1359	-0.939
Q981A2	SSO0046	Uncharacterized protein	-0.442
Postranscriptional modification, Protein Turnover, Chaperones			
Q97WU9	SSO9500	Uncharacterized protein	-0.992

Poorly Characterized			
Function unknown			
Q97VK3	SSO2621	Uncharacterized protein	-0.658
Q97UA0	SSO3118	2-dehydro-3-deoxy-D-arabinonate dehydratase	-0.404
Q97Z85	SSO1046	Uncharacterized protein	-0.807
Q97X44	SSO1911	Uncharacterized protein	-0.542
Q7LXP5	SSO0661	Zn-dependent protease, tldE protein homolog, putative (TldE)	-0.335
Q97YH1	SSO1350	Uncharacterized protein	-0.345
Q97XD3	SSO1812	Uncharacterized protein	-0.593
Q97ZB8	SSO1005	Uncharacterized protein	-0.313
Q97Z40	SSO1098	Uncharacterized protein	-0.59
Q97WV2	SSO2012	Uncharacterized protein	-0.468
Q97WR6	SSO2049	Uncharacterized protein	-0.474
Q97YJ0	SSO1331	Uncharacterized protein	-0.372

Tabla S6. Proteínas aumentadas en *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT en células sésiles

ID protein	Locus		log2 fold change
Metabolism			
Energy production and conversion			
Q97V21	SSO2815	2-oxoacid--ferredoxin oxidoreductase, alpha chain	0.16
P39461	SSO1077	Fumarate hydratase class II	0.184
Q97Y24	SSO1524	Dihydrolipoamide dehydrogenase (PdhD-2)	0.227
Q97V74	SSO2760	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-5)	0.227
P80148	SSO2589	Citrate synthase	0.234
Q97VG9	SSO2657	Quinol oxidase (SoxABC), cytochrome aa3 subunit (SoxB)	0.312
Amino acid transport and metabolism			
P58156;P8092	SSO1952 / SSO1355	Thermostable carboxypeptidase 1 / Thermostable carboxypeptidase 2	0.195
P14909	SSO0897	Aspartate aminotransferase	0.244
Q9UX32	SSO0639	Argininosuccinate lyase	0.266
Q9UX31	SSO0638	Argininosuccinate synthase	0.318
Q7LYI9	SSO3003	Glucose 1-dehydrogenase 1	0.441
Carbohydrate transport and metabolism			
Q980S5	SSO0202	D-arabino 3-hexulose 6-phosphate formaldehyde lyase (HpS-2)	0.205
Q97VC7	SSO2705	Regucalcin homolog	0.227
Q97U07	SSO3218	Uncharacterized protein	0.305
Coenzyme transport and metabolism			
Q97ZZ7	SSO0422	Uncharacterized protein	0.264
Q9Y8K8	SSO0437	Flavin prenyltransferase UbiX	0.266
Q97ZC5	SSO0997	L-aspartate oxidase	0.295
Q97VJ6	SSO2627	CoA-ligase / coenzyme F390 synthetase, putative	0.298
Q97X14	SSO1941	Phosphomethylpyrimidine synthase 2	0.33
Q97X14;Q97YJ8	SSO1324 / SSO1941	Phosphomethylpyrimidine synthase 1 / Phosphomethylpyrimidine synthase 2	0.33
Q97YJ8	SSO1324	Phosphomethylpyrimidine synthase 1	0.496
Q97ZC4	SSO0998	Quinolinate synthase A	0.538
Lipid transport and metabolism			
Q97WQ0	SSO2070	Acetyl-CoA synthetase (Acetate-CoA ligase) (AcsA-7)	0.183
Q97VY8	SSO2463	Propionyl-CoA carboxylase beta subunit (PpcB)	0.189
Q97UW7	SSO2875	Medium-chain-fatty-acid--CoA ligase (AlkK-4)	0.196

Q97WQ7	SSO2061	Acetyl-CoA C-acetyltransferase (Acetoacetyl-CoA thiolase) (AcaB-2)	0.228
Q97UK6	SSO3004	3-oxoacyl-(Acyl carrier protein) reductase (FabG-9)	0.23
Q97YZ3	SSO1156	Acyl-CoA dehydrogenase related protein (Acd-like1)	0.233
Q97VD4	SSO2697	Acetyl-CoA c-acetyltransferase (Acetoacetyl-CoA thiolase) (AcaB-8)	0.255
Q97ZE5	SSO0974	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0.373
Q97Z58	SSO1075	Uncharacterized protein	0.381
Q97W21	SSO2425	Methylmalonyl-CoA mutase, alpha-subunit, chain A (McmA1)	0.571
Inorganic ion transport and metabolism			
Q97Z65	SSO1067	Intracellular proteinase	0.265
Q97UT2	SSO2912	Sulfate adenylyltransferase (Sat)	0.385
Nucleotide transport and metabolism			
Q980P5	SSO0242	Adenylosuccinate synthetase (purA)	0.407
Q97YV9	SSO1193	Exopolyphosphatase (Metaphosphatase), putative	1.515
Cellular processes and signaling			
Cell wall/ Membrane/ Envelope biogenesis			
Q97V80	SSO2755	Glycosyltransferase, putative	0.242
Signal transduction mechanisms			
Q97VZ8	SSO2452	Uncharacterized protein	0.537
Defense mechanisms			
Q97YA7	SSO1425	Uncharacterized protein	0.193
Q97YA4	SSO1428	Uncharacterized protein	0.225
Q97YA6	SSO1426	Uncharacterized protein	0.283
Information storage and processing			
Translation ribosomal structure and biogenesis			
P96040	SSO0342	50S ribosomal protein L12	0.24
Q980G0	SSO0351	Translation initiation factor 6	0.241
Q97Z81	SSO7111	50S ribosomal protein L44e	0.245
rev_P95970	SSO0090	Lysine--tRNA ligase	0.324
Q97ZR1	SSO6179	LSU ribosomal protein S26E (Rps26E)	0.427
rev_Q97Z91	SSO1040	RNA 2',3'-cyclic phosphodiesterase	0.527
Q97WJ1	SSO2225	Ribonuclease P protein component 4	0.599
Transcription			
Q97ZZ5	SSO0426	Uncharacterized protein	0.495
Q97XS8	SSO1631	Coenzyme PQQ synthesis protein E (PqqE-2)	0.719
Q97VL3	SSO2610	Uncharacterized protein	1.142
Postranslational modification, Protein Turnover, Chaperones			
Q97WJ5	SSO2222	Ferredoxin--NADP reductase	0.175
Q9UXC6	SSO0738	Proteasome subunit alpha	0.182

Q97W27	SSO2416	Thioredoxin reductase (TrxB-3)	0.233
Q97TW4;Q97WU9	SSO7239 / SSO9500	Uncharacterized protein/Uncharacterized protein	0.289
Q97VJ4	SSO10788	Uncharacterized protein	0.297
P58202	SSO1607	Pyrrolidone-carboxylate peptidase 2	0.414
Poorly Characterized			
Function unknown			
Q97W32	SSO2410	Uncharacterized protein	0.198
Q97YZ7	SSO1152	Uncharacterized protein	0.209
Q97Z17	SSO1126	Uncharacterized protein	0.218
Q97VJ3	SSO2629	Pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	0.256
Q97W95	SSO2342	Purine phosphoribosyltransferase (GpT-1)	0.259
Q97U17	SSO3209	Oxidoreductase, aldo/keto reductase family	0.26
Q97UL1	SSO2994	Uncharacterized protein	0.282
Q980V6	SSO0171	Uncharacterized protein	0.33
Q97WQ4	SSO2064	Uncharacterized protein	0.436

Tabla S7. Proteínas disminuidas en *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT en células sésiles

ID protein	Locus		log2 fold change
Metabolism			
Energy production and conversion			
Q97UG6	SSO3054	Oxidoreductase	-0.624
Q981C7	SSO0018	Uncharacterized protein	-0.483
Q97U89	SSO3131	Heterodisulfide reductase related protein	-0.41
Q980G8	SSO0329	NADH dehydrogenase subunit N (NuoN)	-0.371
Q97W77	SSO2358	Succinate dehydrogenase subunit C (SdhC)	-0.336
Q97Y23	SSO1525	Pyruvate dehydrogenase, alpha subunit (Lipoamide). (PdhA-2)	-0.322
Q7LXP2	SSO0665	NADH dehydrogenase subunit B (NuoB)	-0.28
Q97ZB9	SSO1004	Uncharacterized protein	-0.276
Q97YM2	SSO1300	Alcohol dehydrogenase (Zn containing) (Adh-4)	-0.222
Q97Y19	SSO1530	Dihydrolipoamide S-acetyltransferase, carboxy-end (PdhC)	-0.625
Amino acid transport and metabolism			
Q97VQ9	SSO2554	Glutamine synthetase (Glutamate ammonia ligase) (GS). (GlnA-3)	-0.542
Q7LXT8	SSO0579	Acetolactate synthase	-0.456
Q97UG7	SSO3053	Maltose ABC transporter, maltose binding protein	-0.433
Q97ZE0	SSO0977	Putative homocitrate synthase	-0.391
Q97XP3	SSO1668	N-methylhydantoinase A related protein (HuyA-like)	-0.378
Q97UH5	SSO3043	ABC transporter, binding protein	-0.354
Q97XP9	SSO1662	N-methylhydantoinase B (HuyB-1)	-0.329
Q97ZL6	SSO0878	Threonine synthase	-0.314
Q97XP8	SSO1663	N-methylhydantoinase A (HuyA-1)	-0.313
Q97ZI6	SSO0920	Probable glycine cleavage system H protein 1	-0.292
Q97ZL7	SSO0876	Aspartokinase	-0.257
Q97YQ1	SSO1273	Uncharacterized protein	-0.23
Q97W36	SSO2407	Probable 2-isopropylmalate synthase	-0.225
Q97UB2	SSO3107	Dihydroxy-acid dehydratase	-0.207
Q97VY2	SSO2471	3-isopropylmalate dehydratase large subunit	-0.194
Q980X0	SSO0156	[LysW]-aminoadipate/[LysW]-glutamate kinase	-0.193
Nucleotide transport and metabolism			
Q9UX07	SSO0613	Aspartate carbamoyltransferase regulatory chain	-0.695
rev_Q980 Q4	SSO0231	Uracil phosphoribosyltransferase Upp	-0.611
Q97WP0	SSO2171	Nucleoside-triphosphatase THEP1	-0.524

Q97ZQ8	SSO6264	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurS	-0.472
Q9UX08	SSO0614	Aspartate carbamoyltransferase PyrB	-0.447
Q9UX24	SSO0629	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurL	-0.406
Q980S6	SSO0201	CTP synthase PyrG	-0.369
Q9UX09	SSO0615	Orotate phosphoribosyltransferase PyrE	-0.364
Q7LXR2	SSO0635	Phosphoribosylamine--glycine ligase PurD	-0.336
Q9UX05	SSO0611	Dihydroorotate synthase PyrC	-0.332
Q97ZE2	SSO0976	Uridylate kinase PyrH	-0.305
Q7LXR3	SSO0633	Amidophosphoribosyltransferase PurF-2	-0.303
Q9UX21	SSO0628	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurQ	-0.273
Q9UX20	SSO0626	Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase PurC	-0.243
Q9UX04	SSO0610	Dihydroorotate dehydrogenase B (NAD(+)), catalytic subunit (pyrD)	-0.267
Carbohydrate transport and metabolism			
Q97UF5	SSO3066	Arabinose ABC transporter, arabinose binding protein	-0.757
Q97YY4	SSO1168	Sugar ABC transporter	-0.507
Q97UY7	SSO2852	Proline/betaine transporter, putative	-0.308
Q97YR5	SSO1254	Citryl-CoA lyase beta subunit homolog (CitE)	-0.298
Q97U20	SSO3205	Uncharacterized protein	-0.213
Coenzyme transport and metabolism			
Q7LXS2	SSO0612	Uncharacterized protein	-0.596
Q980A7	SSO0410	Sirohydrochlorin cobaltochelataze	-0.345
Q97W45	SSO2399	Uncharacterized protein	-0.328
Q97WJ8	SSO2219	NAD kinase	-0.282
Q980B3	SSO0402	GTP Cyclohydrolase II (3,4-Dihydroxy-2-Butanone 4-Phosphate Synthase (DHBP synthase) (RibA))	-0.236
Q9UWX3	SSO0570	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS	-0.206
Lipid transport and metabolism			
Q97U22	SSO3203	Acetyl-CoA synthetase (Acetate-CoA ligase) (AcsA-10)	-0.314
Q9UWU0	SSO0535	UPF0219 protein SSO0535	-0.296
Q7LXW2	SSO0534	Acetyl-CoA c-acetyltransferase (Acetoacetyl-CoA thiolase) (AcaB-1)	-0.22
Q97ZL1	SSO0886	Uncharacterized protein (Myo-inositol-1-phosphate synthase)	-0.218
Q97UH0	SSO3049	Dehydrogenase, putative	-0.269
Inorganic ion transport and metabolism			
Q97WH5	SSO2244	Ferric uptake regulation protein (Fur)	-0.435
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism			

Q97YR6	SSO1253	Putative esterase SSO1253	-0.39
Q7LXY9	SSO0102	Esterase, tropinesterase related protein	-0.371
Q7LXU8	SSO0554	Ribosomal protein L11 methyltransferase, putative	-0.254
Q97VS3	SSO2539	Uncharacterized protein	-0.23
Q7LXG2	SSO0814	Uncharacterized protein	-0.195
Cellular processes and signaling			
Cell wall/ Membrane/ Envelope biogenesis			
Q7LXM9	SSO0681	Uncharacterized protein	-0.692
Q97YG5	SSO1357	Dolichyl-phosphate mannose synthase related protein	-0.524
Q7LXF8	SSO0819	Uncharacterized protein	-0.277
Q97U96	SSO3124	Arabinonate dehydratase	-0.24
Signal transduction mechanisms			
Q97YV8	SSO1195	Phosphohistidine phosphatase (SixA)	-0.442
Q97V57	SSO2778	Uncharacterized protein	-0.345
Q97X90	SSO1865	Universal Stress Protein (uspA)	-0.185
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning			
Q97WA3	SSO2331	Uncharacterized protein	-0.379
Q97ZL3	SSO0881	Uncharacterized protein	-0.294
Intracellular trafficking, secretion and vesicular transport			
Q97ZJ0	SSO0916	Signal peptidase, putative	-0.415
Q980G1	SSO0348	Signal recognition particle receptor FtsY	-0.285
Defense mechanism			
Q97Y93	SSO1440	ATP-dependent RNA helicase homolog	-0.88
Q7LXM4	SSO0688	ABC transporter, ATP binding protein	-0.534
Q97Y94	SSO1439	Uncharacterized protein	-0.437
Q97XJ0	SSO1746	Uncharacterized protein	-0.386
Q97YC4	SSO1402	ATP-dependent RNA helicase related protein	-0.248
Information storage and processing			
Translation ribosomal structure and biogenesis			
rev_Q9UX A6	SSO0718	50S ribosomal protein L4	-0.844
rev_Q9UX C4	SSO0736	Exosome complex component Rrp4	-0.573
Q7LXR5	SSO0627	Methionyl-tRNA synthetase N-term homolog (MetS-like)	-0.495
Q97ZY3	SSO0439	tRNA-splicing endonuclease	-0.486
Q97WJ2	SSO10051	Uncharacterized protein	-0.474
Q980T0	SSO0198	Uncharacterized protein	-0.427
Q97Z91	SSO1040	RNA 2',3'-cyclic phosphodiesterase	-0.329
P35027	SSO0215	30S ribosomal protein S10	-0.256
P30925	SSO0728	Elongation factor 2	-0.238
P95963	SSO0098	Methionine aminopeptidase	-0.211

Q97ZN1	SSO0857	Arginine--tRNA ligase	-0.185
Transcription			
Q7LXY1	SSO0115	Uncharacterized protein	-0.46
Q97ZF4	SSO6877	DNA/RNA-binding protein Alba 2	-0.28
Q97TY9	SSO3242	Uncharacterized protein	-0.271
O93774	SSO1108	HTH-type transcriptional regulator Irs14	-0.255
P96036	SSO0347	Transcription elongation factor Spt5	-0.244
Q7LXY4	SSO0110	Uncharacterized protein	-0.195
Replication, Recombination and Repair			
Q97ZA2	SSO1028	Uncharacterized protein	-0.693
Q980U8	SSO0179	Flap endonuclease 1	-0.612
Q97W56	SSO2384	Ribonuclease HII	-0.525
Q97YN7	SSO1287	Uncharacterized protein	-0.523
Q97X15	SSO1939	Uncharacterized protein	-0.494
Q97VY9	SSO2462	ATP-dependent DNA helicase Hel308	-0.493
Q97ZJ8	SSO0907	DNA topoisomerase I family A (TopA)	-0.49
Q97ZF0	SSO0968	Type 2 DNA topoisomerase 6 subunit B	-0.473
Q97ZY8	SSO0434	tRNA N6-adenosine threonylcarbamoyltransferase	-0.465
Q97WH8	SSO2241	BPS2 protein homolog (Bps2)	-0.311
Q97WT0; Q97X64	SSO2036/S SO1889	ATP-dependent RNA helicase/ATP-dependent RNA helicase	-0.259
Q97W73	SSO2364	Single-stranded DNA binding protein Ssb	-0.21
Q7LXU1	SSO0572	Uncharacterized protein	-0.206
Q9UXF5	SSO0768	Replication factor C small subunit	-0.191
Postranslational modification, Protein Turnover, Chaperones			
Q97WI4	SSO2232	Thioredoxin (TrxA-2)	-0.537
Q980I1	SSO0314	Uncharacterized protein	-0.407
Q97ZI0	SSO0928	Uncharacterized protein	-0.393
Q97TZ9	SSO3231	Protease HtpX homolog 2	-0.317
Q97ZI1	SSO0927	Uncharacterized protein (Fe-S cluster assembly protein SufB)	-0.307
Q97W19	SSO2427	Small heat shock protein hsp20 family	-0.274
Q97Z06	SSO1141	Protease related protein	-0.272
P95895	SSO2121	Peroxiredoxin Bcp-2	-0.269
Q97UW4	SSO2879	Uncharacterized protein	-0.268
Q97WL2	SSO2204	Uncharacterized protein	-0.26
Q97VC5	SSO2708	Hydrogenase expression/formation factor related protein	-0.234
Poorly Characterized			
Function unknown			
Q97XD3	SSO1812	Uncharacterized protein	-0.876

rev_Q97V Q8	SSO2555	Uncharacterized protein	-0.848
Q97YR7	SSO1252	Uncharacterized protein	-0.847
Q97WT6	SSO2028	2-haloalkanoic acid dehalogenase	-0.674
Q97U74	SSO12067	Second ORF in partial transposon ISC1160	-0.608
Q97Y95	SSO1438	Uncharacterized protein	-0.578
Q97W93	SSO2344	Uncharacterized protein	-0.564
Q980Z4	SSO0123	Uncharacterized protein	-0.499
Q97U45	SSO3179	Uncharacterized protein	-0.474
Q7LXL8	SSO0724	Uncharacterized protein	-0.452
Q9UX78	SSO0689	Archaemetzincin	-0.448
Q97XP4	SSO1667	Uncharacterized protein	-0.444
Q97UB8	SSO3099	Uncharacterized protein	-0.436
Q980P4	SSO0244	Uncharacterized protein	-0.398
Q97W74	SSO2363	Uncharacterized protein	-0.389
Q97WL7	SSO2199	Uncharacterized protein	-0.386
Q97UL7	SSO2987	Uncharacterized protein	-0.381
Q97XC0	SSO1824	Uncharacterized protein	-0.38
Q9Y8K9	SSO0428	Uncharacterized protein	-0.345
Q97XX4	SSO1586	Uncharacterized protein	-0.345
Q97VP7	SSO2569	Uncharacterized protein	-0.338
Q7LX46	SSO2159	2-haloalkanoic acid dehalogenase	-0.316
Q97YD6	SSO1388	Uncharacterized protein	-0.286
Q7LXU9	SSO0553	Uncharacterized protein	-0.284
Q980F3	SSO0359	Uncharacterized protein (Peroxiredoxin-like protein)	-0.232
Q97WI9	SSO2227	Uncharacterized protein	-0.214

Tabla S8. Proteínas aumentadas en *S. solfataricus* M16 con Cu, en células sésiles versus planctónicas

ID Protein	Locus		log2 fold change
Metabolism			
Energy production and conversion			
Q97ZK8	SSO0898	Uncharacterized protein	1.187
Q97V17	SSO11231	Ferredoxin like protein (Zfx-like2)	0.855
Q7LX43	SSO2162	Dehydrogenase, putative	0.76
Q97W16	SSO2431	Uncharacterized protein	0.729
Q97ZZ2	SSO0429	Uncharacterized protein	0.683
Q9UWW5	SSO0561	V-ATPase subunit E	0.635
Q980H4	SSO0323	NADH dehydrogenase subunit C (NuoC)	0.618
Q980G9	SSO0328	NADH dehydrogenase subunit L (NuoL)	0.509
Q7LX70	SSO2128	Pyruvate synthase delta chain (Pyruvic-ferredoxin oxidoreductase delta chain) (PorD-like)	0.498
Q97YI8	SSO1333	Isocitrate lyase (AceA/icl)	0.481
Q9UXE7	SSO0760	sn-glycerol-1-phosphate dehydrogenase	0.462
Q97VG9	SSO2657	Quinol oxidase (SoxABC), cytochrome aa3 subunit (SoxB)	0.454
Q97ZR3	SSO0560	ATP synthase subunit F (AtpF)	0.441
Q97W83	SSO2353	Geranylgeranyl hydrogenase, putative	0.433
Q97VH0	SSO2656	Quinol oxidase (SoxABC), cytochrome B subunit (SoxC)	0.433
Q9UWW3	SSO0559	V-ATPase subunit I	0.386
Q97UA1	SSO3117	Alpha-ketoglutaric semialdehyde dehydrogenase AldhT	0.377
Q980G8	SSO0329	NADH dehydrogenase subunit N (NuoN)	0.371
Q97VI0	SSO2643	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase chain C (Anaerobic) (GlpC)	0.367
Q97UR0;Q97YU6	SSO2942/ Q97YU6	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-6) / Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-1)	0.352
Q980H1	SSO0326	NADH dehydrogenase subunit I (NuoI)	0.349
Q7LXS8	SSO0604	Elp3 domain-containing protein	0.348
Q980H3	SSO0324	NADH dehydrogenase subunit D (NuoD)	0.337
Q9UXB2	SSO0723	Beta-IPM dehydrogenase	0.334
Q97W78	SSO2357	Succinate dehydrogenase subunit B (SdhB)	0.307
Q97W77	SSO2358	Succinate dehydrogenase subunit C (SdhC)	0.3
Q7LXY8	SSO0106	Uncharacterized protein	0.281
Q97W79	SSO2356	Succinate dehydrogenase subunit A (SdhA)	0.273
Q97V59	SSO2776	Electron transfert oxidoreductase	0.272
Q97V18	SSO2819	FIXC protein homolog (FixC)	0.265
Q97V19	SSO2817	Electron transfer flavoprotein alpha and beta-subunit (EtfAB/fixAB)	0.244
Q97YM2	SSO1300	Alcohol dehydrogenase (Zn containing) (Adh-4)	0.236

Q7LXP2	SSO0665	NADH dehydrogenase subunit B (NuoB)	0.236
Q7LXA2	SSO2091	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-2)	0.231
Q97V74	SSO2760	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-5)	0.221
Q97W14	SSO2433	Carbon monoxide dehydrogenase, small chain (CutC-1)	0.217
Q7LX54	SSO2150	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-3)	0.178
Q97V20	SSO2816	2-oxoacid--ferredoxin oxidoreductase, beta chain	0.158
Q97V71	SSO2763	Electron transfer flavoprotein, subunit beta (EtfB)	0.153
Q97V21	SSO2815	2-oxoacid--ferredoxin oxidoreductase, alpha chain	0.147
Q97VS5	SSO2537	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP]	0.133
Q9UWW8	SSO0564	V-ATPase subunit B	0.127
Q9UWW6	SSO0563	V-ATPase subunit A	0.108
Amino acid transport and metabolism			
O33777	SSO0600	ImGP synthase subunit HisH	1.154
Q97WS2	SSO2044	Glutamate dehydrogenase 4	0.985
P80053;Q97WS2	SSO1907/ SSO2044	Glutamate dehydrogenase 2 / Glutamate dehydrogenase 4	0.925
P80053;Q97X22;Q97Y81	SSO1907/ SSO1930/ SSO1457	Glutamate dehydrogenase 2 / Glutamate dehydrogenase 3 / Glutamate dehydrogenase 1	0.923
Q97WS2;Q97X22;Q97Y81	SSO2044/ SSO1930/ SSO1457	Glutamate dehydrogenase 4 / Glutamate dehydrogenase 3 / Glutamate dehydrogenase 1	0.882
P80053;Q97WS2;Q97X22;Q97Y81	SSO1907/ SSO2044/ SSO1930/ SSO1457	Glutamate dehydrogenase 2 / Glutamate dehydrogenase 4 / Glutamate dehydrogenase 3 / Glutamate dehydrogenase 1	0.876
P80053	SSO1907	Glutamate dehydrogenase 2	0.827
Q97YQ1	SSO1273	SBP_bac_5 domain-containing protein	0.682
Q97ZX4	SSO0448	Histidinol-phosphate aminotransferase, putative (HisC-like)	0.674
Q980W5	SSO0162	[LysW]-lysine/[LysW]-ornithine hydrolase	0.629
Q97UH5	SSO3043	ABC transporter, binding protein	0.605
Q97VI8	SSO2635	AIRS_C domain-containing protein	0.601
Q97X22;Q97Y81	SSO1930/ SSO1457	Glutamate dehydrogenase 3 / Glutamate dehydrogenase 1	0.568
Q97UG7	SSO3053	Maltose ABC transporter, maltose binding protein	0.559
Q97VX6	SSO2476	Metabolite permease, putative	0.516
Q97ZL7	SSO0876	Aspartokinase	0.503
Q97VK5	SSO2619	Dipeptide ABC transporter, periplasmic dipeptide binding protein (DppA)	0.473
Q980I8	SSO0306	Shikimate dehydrogenase (NADP(+))	0.461
Q97YB2	SSO1419	Acylaminoacyl-peptidase, putative (ApeH-1)	0.419
Q980P1	SSO0248	Threonine dehydratase catabolic (Threonine deaminase) (TdcB)	0.38
P50384	SSO0890	Anthranilate phosphoribosyltransferase	0.371
Q97UI2	SSO3035	Dihydrodipicolinate synthase (DapA-2)	0.333

Q980I7	SSO0307	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate phospholyase	0.331
Q97U33	SSO3189	Amino acid transporter, putative	0.312
Q97VY3	SSO2470	Isopropylmalate isomerase	0.31
P50383	SSO0888	Tryptophan synthase beta chain 1	0.296
Q97W07	SSO2440	Glutamine synthetase (Glutamate ammonia ligase) (GS). (GlnA-2)	0.292
Q97U16	SSO3210	Acetolactate synthase large subunit homolog (IlvB-6)	0.263
Q97VY2	SSO2471	Isopropylmalate isomerase	0.255
Q06121	SSO0895	Indole-3-glycerol phosphate synthase	0.229
Q97ZB3	SSO1012	Acetolactate synthase large subunit homolog (IlvB-3)	0.212
Q97ZE0	SSO0977	Putative homocitrate synthase	0.179
Q97UB2	SSO3107	Dihydroxy-acid dehydratase	0.172
Q980V7	SSO0170	Acetolactate synthase large subunit homolog (IlvB-1)	0.156
P23794	SSO0366	Glutamate--ammonia ligase	0.152
Q97VM5	SSO2597	Serine-pyruvate aminotransferase (AgxT)	0.109
Q97VF1	SSO2675	Probable aminopeptidase 1	0.088
Nucleotide transport and metabolism			
Q97ZQ8	SSO6264	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit III	0.366
Q9UX05	SSO0611	Dihydroorotase	0.358
Q97TZ8	SSO3232	GMP synthetase	0.341
Q9UX24	SSO0629	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit II	0.276
Q7LXR2	SSO0635	Phosphoribosylglycinamide synthetase	0.24
Q980S6	SSO0201	UTP--ammonia ligase	0.164
Q9UX08	SSO0614	Aspartate transcarbamylase	0.14
Carbohydrate transport and metabolism			
Q97UF5	SSO3066	Arabinose ABC transporter, arabinose binding protein	1.239
Q97ZY5	SSO0436	Thiamine thiazole synthase	1.051
Q97V16	SSO2820	Phosphoenolpyruvate synthase (PpsA-2)	0.692
Q980J3	SSO0297	Transketolase, N-terminal section (Tkt-1)	0.493
Q97YY1	SSO1171	Maltose ABC transporter	0.464
Q97ZC0	SSO1003	Sugar ABC transporter	0.434
Q97UZ1	SSO2847	Glucose-binding protein GlcS	0.401
Q980K6	SSO0286	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase	0.356
Q97YR5	SSO1254	Citryl-CoA lyase beta subunit homolog (CitE)	0.352
Q97VC2	SSO2712	Uncharacterized protein	0.349
Q97ZC3	SSO0999	ABC Transporter	0.317
Q97UY8	SSO2850	Glucose import ATP-binding protein GlcV	0.317
Q97ZL2	SSO0883	Pyruvate, water dikinase	0.3
Q97UF2	SSO3069	Arabinose ABC transporter, ATP-binding protein	0.275
P39460	SSO0528	NAD(P)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.12
Coenzyme transport and metabolism			
Q97ZC5	SSO0997	Quinolinate synthase B	1.028
Q97W72	SSO10285	Uncharacterized protein	0.746

Q97ZC6	SSO0996	Quinolinate phosphoribosyltransferase [decarboxylating]	0.558
Q97ZG3	SSO0955	Flavokinase	0.525
Q97ZC4	SSO0998	Quinolinate synthase A	0.506
Q97WC7	SSO2303	Probable cobalt-precorrin-6B C(15)-methyltransferase (decarboxylating)	0.465
Q97WC9	SSO2299	Cobalamin biosynthesis precorrin-3 methylase, putative (CbiF)	0.389
Q97X14	SSO1941	Thiamine biosynthesis protein ThiC 2	0.277
Q97X14;Q97YJ8	SSO1941/ SSO1324	Thiamine biosynthesis protein ThiC 2 / Thiamine biosynthesis protein ThiC 1	0.271
Q97W71	SSO2365	Molybdopterin biosynthesis protein (MoeA-2)	0.144
Lipid transport and metabolism			
Q97YZ5	SSO1154	Monoamine oxidase regulatory protein	0.601
Q97V73	SSO2761	Acyl-CoA dehydrogenase (Acd-5)	0.433
Q97WQ9	SSO2059	Acetyl-CoA synthetase (Acetate-CoA ligase) (AcsA-6)	0.383
Q7LXW2	SSO0534	Acetyl-CoA c-acetyltransferase (Acetoacetyl-CoA thiolase) (AcaB-1)	0.25
Q7LXQ1	SSO0654	Enoyl CoA hydratase (PaaF-2)	0.226
Q97VV6	SSO2500	3-oxoacyl-(Acyl carrier protein) reductase (FabG-7)	0.182
Q97WQ7	SSO2061	Acetyl-CoA C-acetyltransferase (Acetoacetyl-CoA thiolase) (AcaB-2)	0.141
Q97YZ6	SSO1153	Acyl-CoA dehydrogenase (Acd-1)	0.124
Inorganic ion transport and metabolism			
Q97WH5	SSO2244	Ferric uptake regulation protein (Fur)	1.065
rev_Q7LYK3	SSO2072	Lactamase_B domain-containing protein	0.772
Q97ZY2	SSO0440	Uncharacterized protein	0.629
Q97ZU2	SSO0485	ABC transporter	0.462
Q97VH4	SSO2651	Cation transporting ATPase (PacS)	0.289
Q97VG6	SSO2660	Rieske iron-sulfur protein-1 (SoxL-1)	0.24
Q97XC6	SSO1817	Sulfurtransferase	0.238
Q980F5	SSO0356	Phosphate regulatory protein, putative	0.129
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism			
P95914	SSO2140	Putative esterase SSO2140	0.42
Q7LXF9	SSO0818	SAM_MT_TRM5_TYW2 domain-containing protein	0.349
Q7LXG2	SSO0814	Methyltransf_21 domain-containing protein	0.246
Q981B8	SSO0028	Acetylpolyamine aminohydrolase	0.248
Cellular processes and signaling			
Cell wall/ Membrane/ Envelope biogenesis			
Q7LXF8	SSO0819	Glycos_transf_1 domain-containing protein	0.952
Q97UK8	SSO2998	MR_MLE domain-containing protein	0.807
Q97VG1	SSO2665	Muconate cycloisomerase related protein	0.627
Q97V08	SSO2829	Uncharacterized protein	0.544
Q97U96	SSO3124	Arabinonate dehydratase	0.451
Q7LXF7	SSO0820	Glyco_trans_2-like domain-containing protein	0.451

Q980X4	SSO0151	D-arabino 3-hexulose 6-phosphate formaldehyde lyase (HpS-1)	0.339
Q980H9	SSO0317	Sugar phosphate nucleotydyl transferase	0.207
P95871	SSO2098	Tricorn protease homolog	0.17
Q97U06	SSO3219	Sugar phosphate nucleotydyl transferase	0.164
Defense mechanism			
Q97TX9	SSO0001	CRISPR-associated exonuclease Cas4	0.69
Q97Y37	SSO1513	Uncharacterized protein	0.644
Q97ZL2	SSO0925	ABC transporter	0.54
Q97YC8	SSO1398	CRISPR type I-A cluster 1/Apern-associated protein Csa5-1	0.416
Q97WX3	SSO1988	CRISPR type III-B/RAMP module-associated protein Cmr5	0.372
Q97Y90	SSO1443	Probable CRISPR toxin Csa5	0.336
Q97Y38	SSO1512	Uncharacterized protein	0.267
Q97Y36	SSO1514	Uncharacterized protein	0.23
Q97Y91	SSO1442	CRISPR-associated aCascade subunit Cas7/Csa2, subtype I-A/Apern 2	0.15
Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning			
Q97WA3	SSO2331	CbiA domain-containing protein	0.638
Q97ZL3;Q97ZX1	SSO0881/ SSO0451	Uncharacterized protein / Uncharacterized protein	0.477
Q97ZL3	SSO0881	Uncharacterized protein	0.39
Signal transduction mechanisms			
Q980T1	SSO0197	Protein kinase domain-containing protein	0.8
Q97Z47	SSO1088	Uncharacterized protein	0.66
Q97ZD6	SSO0983	Uncharacterized protein	0.642
Q97X90	SSO1865	Usp domain-containing protein	0.641
Q97U40	SSO3183	Usp domain-containing protein	0.513
Q97V57	SSO2778	Usp domain-containing protein	0.316
Information storage and processing			
Translation ribosomal structure and biogenesis			
P96039;P96040	SSO0344/ SSO0342	50S ribosomal protein L10/50S ribosomal protein L12	1.044
P96041	SSO0341	Alanyl-tRNA synthetase	0.718
Q97ZV5	SSO0470	Uncharacterized protein	0.696
P96039	SSO0344	50S ribosomal protein L10	0.691
P30925	SSO0728	Elongation factor 2	0.685
P96040	SSO0342	50S ribosomal protein L12	0.661
Q980R3	SSO0221	50S ribosomal protein L30e	0.625
Q980Q8	SSO0228	Probable translation initiation factor IF-2	0.576
Q9UX91	SSO0702	50S ribosomal protein L6	0.5
Q97W96	SSO2339	Translation termination factor aRF1	0.423
Q7LXP3	SSO0664	L-threonylcarbamoyladenylylate synthase	0.403
P96037	SSO0346	50S ribosomal protein L11	0.383

Q97ZN1	SSO0857	Arginyl-tRNA synthetase	0.353
Q97W04	SSO2446	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	0.341
Q97ZQ4	SSO6401	50S ribosomal protein L23	0.331
Q980C1	SSO5763	50S ribosomal protein L14e	0.305
P58222	SSO5668	50S ribosomal protein LX	0.3
Q9UXC0	SSO0732	Exosome complex component Rrp42	0.283
Q9UXC2	SSO0735	Exosome complex component Rrp41	0.231
Q9UXC4	SSO0736	Exosome complex component Rrp4	0.198
Q97U19	SSO3206	RutC family protein SSO3206	0.159
Q97ZG1	SSO0957	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	0.156
P35027	SSO0215	30S ribosomal protein S10	0.151
P95982	SSO0078	Tyrosyl-tRNA synthetase	0.145
Q9UXA6	SSO0718	50S ribosomal protein L4	0.14
P35021	SSO0216	Elongation factor Tu	0.132
Q97ZH6	SSO0936	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit E	0.125
P95993	SSO0067	30S ribosomal protein S2	0.119
P95968	SSO0093	Glutamyl-tRNA synthetase	0.117
Q9UX90	SSO0701	50S ribosomal protein L32e	0.108
Transcription			
P96036	SSO0347	Transcription elongation factor Spt5	0.524
Q97W00	SSO2450	TATA binding protein (TBP)-interacting protein (TIP49-like), putative	0.504
Q97ZQ0	SSO6454	Small nuclear riboprotein protein (SnRNP-2)	0.477
P58178	SSO0951	TATA-box factor	0.451
Q980S8	SSO5410	Small nuclear riboprotein protein (SnRNP-1)	0.388
Q980R9	SSO0209	N-terminal acetyltransferase	0.35
Q7LXY4	SSO0110	Uncharacterized protein	0.301
Q980L6	SSO0276	Lsm_C domain-containing protein	0.283
P58111	SSO0446	Transcription initiation factor IIB 1	0.234
Q980R4	SSO0220	Probable transcription termination protein NusA	0.185
Q7LXS6	SSO0606	Transcriptional regulator, putative	0.142
Q981A1	SSO0048	Transcriptional regulator, putative	0.12
P95957	SSO0104	AspB-1	0.106
Replication, Recombination and Repair			
Q97WH8	SSO2241	BPS2 protein homolog (Bps2)	0.92
Q97X15	SSO1939	ATPase_2 domain-containing protein	0.591
Q9UXF5	SSO0768	SsoRFC small subunit	0.42
P95980	SSO0079	DNA primase DnaG	0.39
Q97W73	SSO2364	Single-stranded DNA binding protein Ssb	0.349
Q97ZE3	SSO6901	Chromatin protein Cren7	0.291
Q97WH0	SSO2249	DNA double-strand break repair Rad50 ATPase	0.281
Q97Z84	SSO1047	Proliferating cell nuclear antigen homolog 2	0.252
Q97WG8	SSO2251	DNA double-strand break repair helicase HerA	0.224
Q7LXU1	SSO0572	PINc domain-containing protein	0.146

P39476;P61991	SSO10610/SSO9535	DNA-binding protein 7d/DNA-binding protein 7a	0.127
Postranscriptional modification, Protein Turnover, Chaperones			
Q9V2S9;Q9V2T7	SSO0862/SSO3000	Thermosome subunit 1 / Thermosome subunit 3	1.115
Q9V2T7	SSO3000	Thermosome subunit 3	0.888
Q9V2T8	SSO0282	Thermosome subunit 2	0.888
Q9V2S9	SSO0862	Thermosome subunit 1	0.846
P58179	SSO0349	GimC subunit alpha	0.676
Q97WL9	SSO2195	Erythrocyte band 7 membrane protein homolog	0.633
rev_Q97VR2	SSO2551	Serine protease, subtilase family, putative	0.598
Q97WL2	SSO2204	Thioredox_DsbH domain-containing protein	0.512
Q97Z06	SSO1141	Protease related protein	0.441
Q97ZI1	SSO0927	Uncharacterized protein	0.434
Q9UXB8	SSO0730	GimC subunit beta	0.361
Q97X00	SSO1960	PHB domain-containing protein	0.352
Q980G4	SSO0335	Uncharacterized protein	0.338
Q97ZI0	SSO0928	Uncharacterized protein	0.332
Q97W19	SSO2427	Small heat shock protein hsp20 family	0.312
Q97VL0	SSO2613	Peroxiredoxin, bacterioferritin comigratory protein homolog (Bcp-4)	0.287
Q7LYL6	SSO0758	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	0.282
Q980U9	SSO0176	AAA family ATPase	0.276
Q97VJ4	SSO10788	UPF0033 domain-containing protein	0.257
Q980I1	SSO0314	Thioredoxin-like_fold domain-containing protein	0.234
Q97ZZ9;Q980U9	SSO0421	AAA family ATPase	0.232
P95895	SSO2121	Peroxiredoxin	0.194
Q97ZZ9	SSO0421	AAA family ATPase	0.118
Q980L4	SSO0278	Proteasome core protein PsmB 1	0.091
Pooly characterized			
Function unknown			
Q97Z85	SSO1046	Uncharacterized protein	1.786
Q97Z23	SSO1119	Uncharacterized protein	0.931
Q7LXS3	SSO0609	Uncharacterized protein	0.754
Q980C7	SSO0389	Surface layer large protein	0.723
Q97WE9	SSO2277	Uncharacterized protein	0.723
Q97V87	SSO2748	Uncharacterized protein	0.694
Q97XI5	SSO1752	Uncharacterized protein	0.684
Q7LX46	SSO2159	2-haloalkanoic acid dehalogenase	0.683
Q9Y8K9	SSO0428	Uncharacterized protein SSO0428	0.631
Q980F3	SSO0359	DrsE domain-containing protein	0.622
Q97UL7	SSO2987	Uncharacterized protein	0.601
Q97U00	SSO3230	Uncharacterized protein	0.581
Q97YD6	SSO1388	Uncharacterized protein	0.577

Q97XG7	SSO1774	Uncharacterized protein	0.57
Q97X01	SSO1959	Uncharacterized protein	0.56
Q7LXZ0	SSO0097	Uncharacterized protein	0.558
Q97UX4	SSO2867	DrsE domain-containing protein	0.516
Q97ZB8	SSO1005	Uncharacterized protein	0.509
Q981B7	SSO0029	Uncharacterized protein	0.493
Q97XD8	SSO1807	Uncharacterized protein	0.493
Q980L8	SSO5544	Uncharacterized protein	0.49
Q97UA0	SSO3118	2-keto-3-deoxy-D-arabinonate dehydratase	0.473
Q97VJ1	SSO2632	Uncharacterized protein	0.472
Q97W74	SSO2363	AAA domain-containing protein	0.457
Q97W75	SSO2360	VWFA domain-containing protein	0.436
Q97VQ8	SSO2555	Uncharacterized protein	0.398
Q980S3	SSO0205	Uncharacterized protein	0.378
Q97ZF7	SSO0961	Uncharacterized protein	0.371
Q97WG7	SSO2253	Ferritin-like diiron domain-containing protein	0.369
Q97ZJ1	SSO0915	Uncharacterized protein	0.309
Q7LXU9	SSO0553	Uncharacterized protein	0.294
Q97ZI5	SSO0921	Uncharacterized protein	0.283
Q980Q0	SSO0235	Radical SAM domain-containing protein	0.264
Q7LX84	SSO2112	Amidohydro-rel domain-containing protein	0.257
Q97VP7	SSO2569	Uncharacterized protein	0.256
Q97WI7	SSO2229	Menaquinone biosynthetic enzyme MqnD	0.179
Q97VJ3	SSO2629	Oxidoreductase (Flavoprotein)	0.178
Q97Y47	SSO1500	Uncharacterized protein	0.173
Q980P4	SSO0244	Uncharacterized protein	0.143
Q97U12	SSO3214	tRNA(Met) cytidine acetyltransferase TmcA	0.135
Q97VN3	SSO2586	Uncharacterized protein	0.122
Q97WM4	SSO2190	Uncharacterized protein	0.122
P95962	SSO0099	UPF0173 metal-dependent hydrolase SSO0099	0.101

Tabla S9. Proteínas disminuidas en *S. solfataricus* M16 con Cu, en células sésiles versus planctónicas

ID Protein	Locus		log2 fold change
Metabolism			
Energy production and conversion			
Q97UK2	SSO3009	Carbon monoxide dehydrogenase, large chain (CutA-7)	-0.147
Q97VI1	SSO2642	Rubryerythrin (Rr)	-0.345
Amino acid transport and metabolism			
P14909	SSO0897	Transaminase A	-0.093
Q59969	SSO0641	Carbamoyl-phosphate synthetase ammonia chain	-0.1
Q97ZK0	SSO0906	Soluble hydrogenase, small subunit	-0.103
Q980J0	SSO0304	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase /chorismate mutase (AroG)	-0.128
Q9UX32	SSO0639	Arginosuccinase	-0.134
P80092	SSO1355	Thermostable carboxypeptidase 1	-0.135
Q7LX61	SSO2141	Acylaminoacyl-peptidase, putative (ApeH-2)	-0.147
P80092/P58156	SSO1355/ SSO1952	Thermostable carboxypeptidase 1/ Thermostable carboxypeptidase 2	-0.156
Q7LXP8	SSO0657	Homoserine dehydrogenase (ThrA/hom)	-0.157
Q9UX31	SSO0638	Citrulline--aspartate ligase	-0.22
Q7LYI9	SSO3003	Glucose 1-dehydrogenase 1	-0.278
Nucleotide transport and metabolism			
Q980Q7	SSO0230	Nucleoside-2-P kinase	-0.126
Carbohydrate transport and metabolism			
Q97UK5	SSO3006	Alpha-mannosidase	-0.115
Q97UG9	SSO3050	AP_endonuc 2 domain-containing protein	-0.393
Coenzyme transport and metabolism			
Q980E8	SSO0364	GTP cyclohydrolase I	-0.215
Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism			
Q97V96	SSO2738	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (AbfD-2)	-0.798
Cellular processes and signaling			
Cell wall/ Membrane/ Envelope biogenesis			
Q97VN5	SSO2583	Sulfolipid biosynthesis protein (SqdB)	-0.25
Information storage and processing			
Translation ribosomal structure and biogenesis			
Q9UXA8	SSO0719	50S ribosomal protein L3	-0.069
Q9UX94	SSO0705	30S ribosomal protein S4e	-0.116
P95990	SSO0070	50S ribosomal protein L18e	-0.118
Q9UXD4	SSO0746	Ribosomal protein S1e	-0.121
Q97ZH3	SSO0939	Pre mRNA splicing protein	-0.125
Q9UX93	SSO0704	50S ribosomal protein L5	-0.13
P35026	SSO0217	30S ribosomal protein S7	-0.136
Q980A8	SSO0408	30S ribosomal protein S15	-0.144

Q980F7	SSO0353	30S ribosomal protein S19e	-0.154
Q97ZY6	SSO0435	30S ribosomal protein S24e	-0.173
Q9UWX2	SSO0569	Prolyl-tRNA synthetase	-0.201
Transcription			
P58192	SSO0223	DNA-directed RNA polymerase subunit A'	-0.131
Replication, Recombination and Repair			
Q97ZF2	SSO0966	tRNA-splicing ligase RtcB	-0.148
Postranscriptional modification, Protein Turnover, Chaperones			
Q97W27	SSO2416	Thioredoxin reductase (TrxB-3)	-0.135
Pooly characterized			
Function unknown			
Q97VU8	SSO2509	DUF35 N domain-containing protein	-0.305

ANEXO 6. Comparación de los resultados de proteómica ITRAQ e ICPL de *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT en células planctónicas.

Anteriormente se llevó a cabo en nuestro laboratorio un estudio por la técnica ICPL de los cambios en el proteoma de *S. solfataricus* PoliP (-) versus WT en células planctónicas (Soto y col., 2019). En esta tesis se realizó un estudio de iTRAQ para las células sésiles, pero debido a que esta técnica es más sensible que el ICPL, se optó por incluir muestras de células planctónicas de ambas cepas, para así lograr hacer una comparación más certera entre los estilos de vida planctónico y sésil.

Sin embargo, consideramos pertinente presentar una comparación de lo observado por ambas metodologías. En la fig. 10 se observa el número de proteínas que aumentan y disminuyen en cada método al comparar la cepa PoliP (-) con la WT, además del número de proteínas que coinciden por ambos métodos, que, en el caso de las proteínas que aumentan es 7 y en el que disminuyen: 4 proteínas. En la tabla S10 se listan las proteínas y las veces de cambio. Además, se detectaron 2 proteínas cuyos cambios fueron divergentes por ambas metodologías, las codificadas por los locus SSO2008 y SSO6901 que disminuyen por el método iTRAQ, mientras que por ICPL aumentan.

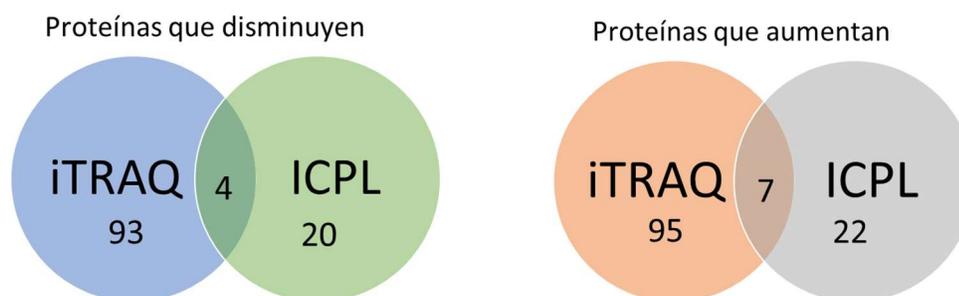


Figura S10. Numero de proteínas en las que se detectan cambios por los métodos de proteómica iTRAQ, ICPL o ambos.

Tabla S10. Identidad de las proteínas con cambios significativos en ambas metodologías de proteómica: iTRAQ e ICPL. En rosa se indican las proteínas que aumentan las veces de cambio por ambos métodos, en azul claro las que disminuyen, y en amarillo claro las que presentan veces de cambios contrarias en ambas condiciones.

Locus	Proteína	Veces de cambio	
		iTRAQ	ICPL
SSO1193	Exopolifosfatasa	1,56	1,27
SSO2613	Peroxirredoxina (Bcp-4)	0,35	1,61
SSO2121	Peroxirredoxina (Bcp-2)	0,23	0,74
SSO2597	Serina piruvato aminotransferasa	0,2	1,46
SSO0220	NusA (proteína de terminación)	0,22	1,09
SSO2303	Precorrina de cobalto probable	0,38	1,77
SSO2817	Electrontransferasa	0,2	0,74
SSO3118	2 dehidro 3 deoxi D arabinosa deshidratasa	-0,4	-0,69
SSO3029	Proteína no caracterizada	-0,42	-1,39
SSO2377	Acetil CoA acetil transferasa (AcaB-4)	-0,43	-0,81
SSO2939	Maleato cis trans isomerasa	-0,27	-0,86
SSO2008	N-metil hidantoniasa	-0,2	1,22
SSO6901	Proteína de cromatina Cren7	-0,5	1,65

En la fig. S11 se comparan los resultados de ambas metodologías de proteómica mediante un gráfico con los cambios observados en las principales rutas metabólicas. Se observa, que, si bien las proteínas que coinciden por ambos métodos son pocas, hay una tendencia general a que el ciclo de Krebs y el ciclo del glioxilato se encuentren disminuídos, mientras que la cadena de transporte de electrones se encuentre aumentada, sugiriendo así una mayor producción de ATP por vías oxidativas, antes que por fosforilación a nivel de sustrato, además de una menor producción probablemente de poder reductor. Proteínas de estrés como las peroxirredoxinas también se encuentran aumentadas.

En general, se observa que las vías con cambios significativos son las mismas por ambos métodos de detección.

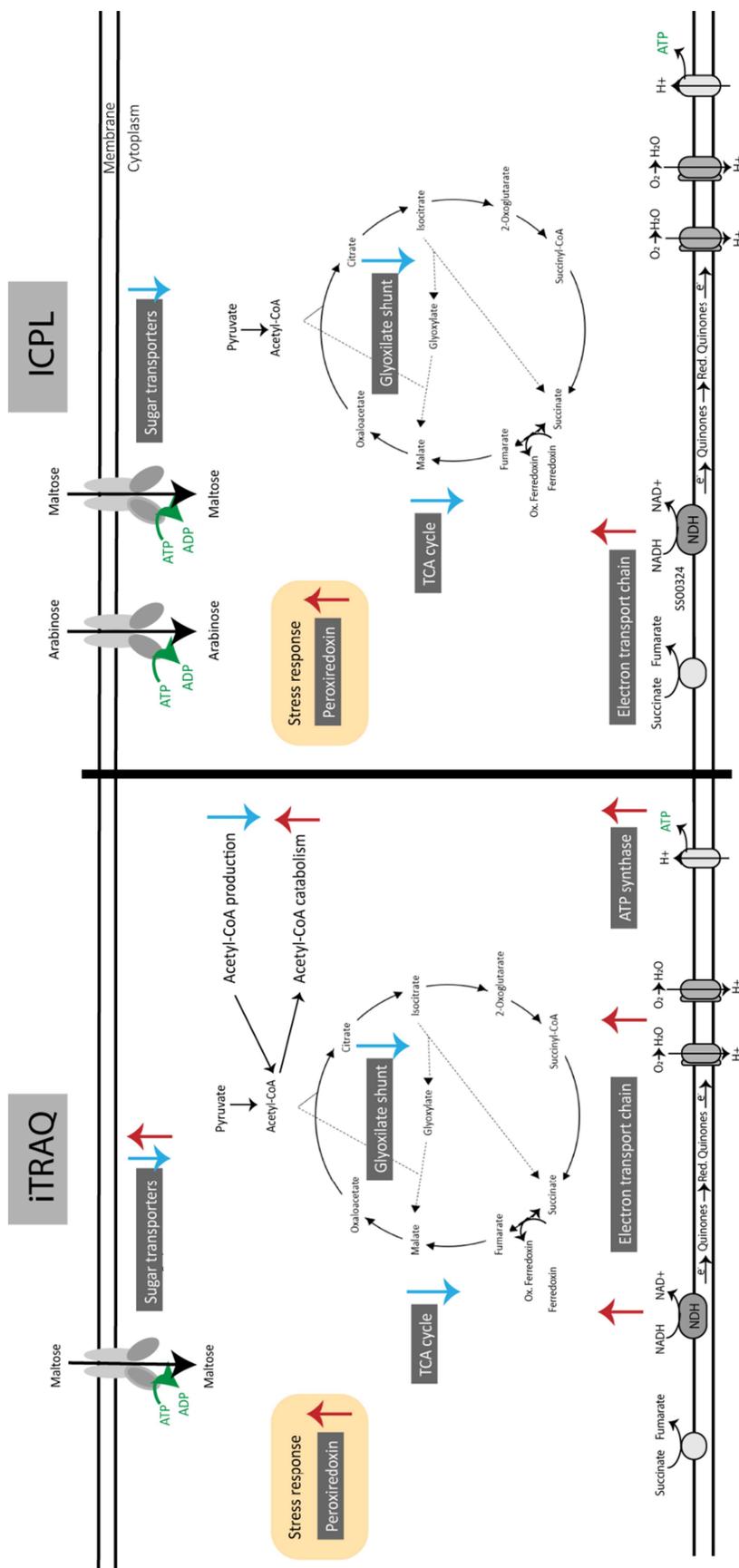


Figura S11. Estado general de las vías metabólicas al comparar células PolIP (-) versus WT de *S. solfataricus* por proteómica iTRAQ e ICPL. Las flechas rojas indican que varias proteínas de la vía se encuentran aumentadas, las flechas azules indican disminución.

ANEXO 7. Cálculos de las mediciones de ATP, ADP y razón ADP/ATP

Tabla S11. Valores de luminiscencia de los ensayos de ATP (UL), ADP (UL) y de proteína (mg) para las cepas PoliP (-) y WT de *S. solfataricus* en estado planctónico. Cálculo de los valores de ATP (UL/mg proteína), ADP (UL/mg proteína) y razón ATP/ADP.

WT (M16)					
1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
ATP (UL)					
1.5158,5	15.158,5	19.980	19.980	16.340	16.340
ADP (UL)					
36.044	30.417	51.021	45.468,5	48.594	42.662
Proteínas (mg)					
1,63	0,59	2,6	0,764	2,6	0,834
ATP (UL/mg proteína)					
1	2	3	promedio	desv. est.	
1.365,63	1.187,87	951,65	1.168,39	207,67	
ADP (UL/mg proteína)					
1	2	3	promedio	desv. est.	
2.579,43	1.746,38	1.820,78	2048.87	460.99	
Razon ADP/ATP					
1	2	3	promedio	desv. est.	
0,762	0,519	1,33	0,870	0,4166	
PoliP (-) (M16ppx)					
1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
ATP (UL)					
24.033	24.033	21.973	21.973	30.561,5	30.561,5
ADP (UL)					
54.820,5	61.482	70.803,5		64.997,5	69.998
Proteínas (mg)					
1	0,736	2,6	0,756	2,6	1,1
ATP (UL/mg proteína)					
1	2	3	promedio	desv. est.	
2.768,78	1.309,48	1.651,97	1.910,08	763,12	
ADP (UL/mg proteína)					
1	2	3	promedio	desv. est.	
4.771,28	1.029,48	2.242,5	2681.09	1909.07	
Razon ADP/ATP					
1	2	3	promedio	desv. est.	
1,027	1,572	0,506	1,0352	0,5330	