

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas - PEDECIBA**

**IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE  
EXPRESIÓN DIFERENCIAL A BAJAS  
TEMPERATURAS EN AISLAMIENTOS DE  
BACTERIAS DE LA ANTÁRTIDA MARÍTIMA**

**LIC. MARÍA CECILIA MARTÍNEZ ROSALES**

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Opción Microbiología

PEDECIBA

Montevideo, Uruguay

Julio 2012

**IDENTIFICACIÓN DE MOLÉCULAS DE EXPRESIÓN  
DIFERENCIAL A BAJAS TEMPERATURAS EN  
AISLAMIENTOS DE BACTERIAS DE LA ANTÁRTIDA  
MARÍTIMA**

**Lic. María Cecilia Martínez Rosales**

**Orientadora: Dra. Susana Castro Sowinski**

**Tribunal: Dra. Magela Laviña**

**Dra. Silvia Batista**

**Dra. Ana Ramón**

**Sección Bioquímica - Departamento de Biología Celular y Molecular**

**Facultad de Ciencias – Universidad de la República**

## AGRADECIMIENTOS

A Susana, por permitirme ser parte de este proyecto e introducirme en el mundo de las bacterias del frío que me resulta cada día más interesante, por su guía y paciencia.... Sobre todo para escribir esta tesis.

A mis queridos compañeros y amigos de la 314 (Nati F, Nati R, Leti, Cris, Fabi, Gabi, Mili, Guille, Mario, Susana), por el apoyo en varios momentos de mucho estrés, por el aguante de todos los días, y por hacer del laboratorio un verdadero segundo hogar. En especial a Nati Fullana por su colaboración con algunos ensayos.

A todos los compañeros de Bioquímica y también a toda la gente del IIBCE donde comencé este trabajo.

A mí querido Uriel, por sus consejos, por su interés en mi trabajo, por su eterna paciencia y apoyo incondicional. Y por su dedicado amor.

A mi familia, en especial a mis padres, por apoyarme siempre durante este trabajo, durante la carrera y en la vida en general. Por siempre creer en mí y aguantar los momentos de estrés.

A mis amigas de siempre, que nunca dejaron de alentarme durante los largos meses de escritura, y en cada momento en que estaba estancada por algún experimento que no salía, aunque entendieran poco o nada de mi trabajo.

A Mary, Dani y Vicky, por esas largas horas que estuvieron ayudándome a compaginar toda la tesis.

A Andrés Iriarte por los trabajos con la proteasa serínica de *Janthinobacterium* AU11.

A Lucía Garófalo y Silvia Soule por el análisis por GC de los EPS.

A Vicky Dardanelli y María Morel por el análisis de los lípidos por GC.

A la ANII por otorgarme la beca que me permitió dedicarme a esta maestría.

A los integrantes del tribunal por aceptar leer esta tesis y por la paciencia que han tenido por los largos meses de escritura.

# INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<i>I. Ambientes fríos: microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes .....</i>	<i>10</i>
1. Envoltura Celular .....	12
2. Acumulación de solutos compatibles y otras moléculas .....	21
3. Transcripción y traducción .....	22
4. Enzimas .....	26
5. Proteínas anti-congelamiento .....	27
6. Exopolisacáridos .....	28
<i>II. La Antártida como recurso genético .....</i>	<i>29</i>
<i>III. Enzimas proteolíticas.....</i>	<i>31</i>
Importancia tecnológica de las proteasas .....	34
<i>IV. El género Pseudomonas .....</i>	<i>36</i>
<i>V. El género Janthinobacterium.....</i>	<i>37</i>
<i>VI. Antecedentes del trabajo .....</i>	<i>38</i>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>40</b>
HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	41
OBJETIVOS.....	42
<i>Objetivos generales: .....</i>	<i>42</i>
<i>Objetivos específicos:.....</i>	<i>42</i>
<b>CAPITULO I:        EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS, LÍPIDOS Y</b>	
<b>EXOPOLISACÁRIDOS EN PSEUDOMONAS SP. AU10 .....</b>	<b>44</b>
INTRODUCCIÓN.....	45
MATERIALES Y MÉTODOS.....	46

I.	<i>Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento</i> .....	46
II.	<i>Expresión diferencial de proteínas de Pseudomonas sp. AU10 a 4 °C y 30 °C</i> .....	46
1.	Fraccionamiento celular .....	46
2.	Electroforesis bidimensional y espectrometría de masa.....	49
III.	<i>Identificación de los genes que codifican para las proteínas identificadas</i> .....	50
IV.	<i>Expresión de la enzima Carbamato Quinasa mediante RT-PCR</i> .....	54
V.	<i>Identificación de la secuencia promotora del gen de la Carbamato Quinasa</i> .....	56
VI.	<i>Análisis de exopolisacáridos</i> .....	58
VII.	<i>Análisis de lípidos</i> .....	59
	RESULTADOS .....	61
I.	<i>Expresión diferencial de proteínas a baja temperatura en Pseudomonas sp. AU10</i> .....	61
1.	Fraccionamiento celular y controles de calidad .....	61
2.	Electroforesis bidimensional .....	64
3.	Identificación de los genes codificantes .....	67
4.	Expresión de Carbamato Quinasa a bajas temperaturas .....	67
II.	<i>Identificación de la secuencia promotora de Carbamato Quinasa</i> .....	69
III.	<i>Análisis de la producción de EPS por Pseudomonas sp. AU10 a 4°C y 30°C</i> .....	69
IV.	<i>Análisis de lípidos</i> .....	70
	DISCUSIÓN I.....	73
<b>CAPÍTULO II:</b>	<b>IDENTIFICACIÓN DE PROTEASAS PRODUCIDAS POR</b>	
	<b>JANTHINOBACTERIUM SP. AU11</b> .....	<b>78</b>
	INTRODUCCIÓN.....	79
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	80
I.	<i>Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento</i> .....	80
II.	<i>Búsqueda de genes que codifican para serín proteasas</i> .....	80
III.	<i>Amplificación de la serín proteasa de Janthinobacterium sp. AU11 con cebadores específicos</i> ..	83
IV.	<i>Análisis filogenético de la proteasa JSP8A</i> .....	84
V.	<i>Identificación de proteasas extracelulares producida por Janthinobacterium sp. AU11</i> .....	84
VI.	<i>Identificación del gen que codifica para la proteasa extracelular</i> .....	86

RESULTADOS .....	87
I. <i>Identificación de serín proteasas – Estrategia genómica</i> .....	87
II. <i>Identificación de proteasas extracelulares – Estrategia proteómica</i> .....	93
DISCUSIÓN .....	96
<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>99</b>
CONCLUSIONES .....	100
PERSPECTIVAS .....	102
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>103</b>
REFERENCIAS .....	104
<b>ANEXOS .....</b>	<b>115</b>
I. MEDIOS DE CULTIVO .....	116
II. “BUFFERS” .....	117
III. BASES DEGENERADAS .....	119
IV. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS .....	120
V. ENSAYO DE ANTHRONE .....	121
VI. CÉLULAS COMPETENTES .....	122

# ***RESUMEN***

La Antártida es un continente que presenta condiciones de frío extremo, lo cual representa un desafío para el desarrollo de la vida. Las bajas temperaturas inducen la formación de hielo intracelular, modifican la fluidez de las membranas, y reducen las tasas de transporte de solutos y de las reacciones bioquímicas celulares, disminuyendo el metabolismo general. Sin embargo, los microorganismos han desarrollado diferentes estrategias a nivel fisiológico para enfrentar los desafíos impuestos por el frío. Según la temperatura ambiente, producen diferentes macromoléculas (lípidos, proteínas, polisacáridos) que cumplen importantes funciones de adaptación.

La vida a bajas temperaturas también requiere una adaptación molecular a nivel de las enzimas que participan en distintos procesos celulares. Entre ellas, las proteasas tienen una importante participación en varias funciones celulares, particularmente la degradación de nutrientes del medio. En un ambiente como el antártico, con condiciones de nutrientes que son limitadas, el poseer enzimas hidrolíticas que estén perfectamente adaptadas para trabajar a bajas temperaturas es fundamental.

Un primer objetivo de esta tesis fue contribuir al conocimiento general sobre los mecanismos involucrados en la adaptación al frío en bacterias. Nuestro microorganismo de estudio fue el aislamiento antártico sicrotolerante *Pseudomonas* sp. AU10. Describimos la identificación de proteínas que se expresan diferencialmente a bajas temperaturas, y también la caracterización de lípidos y exopolisacáridos producidos a 4 °C y 30 °C, durante la fase exponencial tardía de crecimiento.

La composición de lípidos y exopolisacáridos se analizó mediante cromatografía gaseosa, y la expresión diferencial de proteínas se estudió comparando “spots” en electroforesis bidimensionales de dos fracciones celulares (membrana externa/periplasma y membrana interna/citoplasma). Para identificar las proteínas expresadas diferencialmente a 4 °C se empleó espectrometría de masa MALDI-ToF, y

se diseñaron cebadores degenerados (basados en las secuencias aminoacídicas de los péptidos identificados) para la identificación de los genes correspondientes.

Se detectaron diferencias en la producción de exopolisacáridos y en el perfil de lípidos, sugiriendo que estas moléculas participan en los procesos de adaptación al frío en AU10. Además, se identificaron varias proteínas de expresión diferencial a bajas temperaturas: proteínas involucradas en los procesos de transcripción y traducción, una proteína de transporte, y una enzima del metabolismo de aminoácidos, entre otras. Estos resultados sugieren que los mecanismos de adaptación de AU10 involucran varios procesos celulares que actúan a distintos niveles.

Como segundo objetivo de esta tesis, se pretendía identificar una proteasa extracelular de expresión diferencial a bajas temperaturas, producida por el aislamiento antártico psicrotolerante *Janthinobacterium* sp. AU11. Se emplearon dos estrategias, una proteómica y otra genómica, mediante las cuales se pudo identificar dos enzimas proteolíticas. Por un lado se identificó una metalo proteasa extracelular, activa a bajas temperaturas, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y espectrometría de masa MALDI-ToF. Por otro lado, se identificó una serin proteasa mediante amplificación del gen con cebadores degenerados, que presentó alto porcentaje de identidad con serin proteasas de Cianobacterias, sugiriendo que fue adquirida durante un evento de transferencia horizontal del gen.

# ***INTRODUCCIÓN***

### ***I. Ambientes fríos: microorganismos psicrófilos y psicrotolerantes***

La mayoría de la biósfera terrestre se caracteriza por presentar bajas temperaturas. Un 85% de la misma permanece a temperaturas menores a 5 °C durante todo el año (Margesin & Miteva, 2011). Una amplia mayoría de los ecosistemas terrestres se encuentran permanentemente congelados, o permanecen descongelados únicamente por unas semanas en verano, mientras que el 90% de los océanos se encuentra a temperaturas inferiores a los 5 °C. Los ecosistemas fríos incluyen: profundidades oceánicas, lagos fríos, nieve, permafrost, hielo marino, glaciares, suelos fríos (principalmente subsuelos), desiertos fríos, cuevas, y zonas a alturas mayores a los 3000 m (la temperatura permanece constantemente por debajo de los 5 °C). Estos ambientes han sido colonizados por microorganismos (bacterias, arqueas, levaduras, hongos filamentosos y algas) tolerantes a las bajas temperaturas reinantes, que se han adaptado exitosamente a vivir en tales ambientes (Satayanarayana et al., 2005; Margesin et al., 2007; Rodrigues & Tiedje, 2008; Margesin & Miteva, 2011).

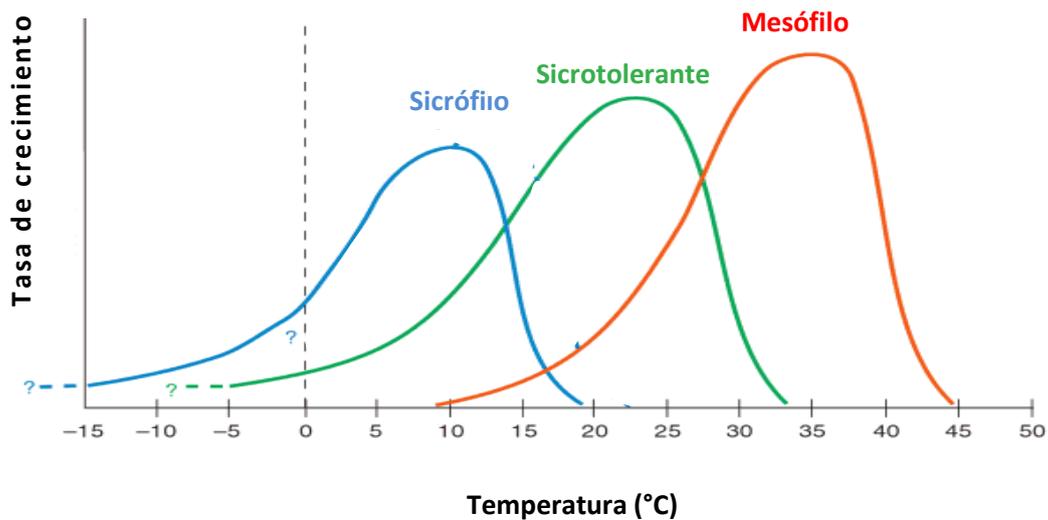
Los primeros reportes sobre vida microbiana en ambientes fríos datan del siglo IV A.C., y se trata de descripciones del filósofo griego Aristóteles sobre lo que siglos después fue identificado como un microorganismo eucariota fotosintético (*Protococcus nivalis*, un “alga roja”), responsable del color rojizo de la nieve (Lones, 1912; Deming, 2009). En el siglo XIX (1887) Forster, un científico alemán, describió la capacidad de una bacteria bioluminiscente (aislada de un pescado conservado en frío) de reproducirse a 0 °C (Ingraham & Stokes, 1959). Quince años después (1902) Schmidt-Nielsen introdujo el término psicrófilo (del griego *psychros* = frío, y *philos* = que ama) para denominar a aquellos microorganismos que podían crecer bien a temperaturas cercanas a 0 °C (Ingraham & Stokes, 1959; Gounot, 1986). En 1975, Morita propuso que los psicrófilos (o psicrófilos) fueran redefinidos como “organismos que tienen una temperatura óptima de crecimiento menor o igual a 15 °C, y una temperatura máxima no mayor a 20 °C” (Morita, 1975; Gounot, 1986; D’Amico et al., 2006). Esta definición se sigue empleando en la actualidad, aunque

## Introducción

---

algunos autores la cuestionan porque consideran que la aparente temperatura “óptima” de crecimiento no se relaciona con la capacidad de los microorganismos de desarrollarse apropiadamente a las bajas temperaturas prevalecientes en su ambiente natural (Margesin et al., 2007). Los sicrófilos se encuentran en ambientes que están permanentemente fríos, como las regiones polares, y son muy sensibles al aumento de la temperatura; no resistiendo incluso a leves aumentos de la misma (Madigan & Martinko, 2006a).

Los microorganismos que pueden crecer a 0 °C, pero cuyas temperaturas óptimas de crecimiento se encuentran entre 20 °C y 40 °C, se denominan psicrotolerantes (Singh & Ramana, 1998; Gerday et al., 2000; Cavicchioli et al., 2002; Van den Burg, 2003; Huston et al., 2004; Madigan & Martinko, 2006a; Morgan-Kiss et al., 2006; Rodrigues & Tiedje, 2008). Los microorganismos psicrotolerantes (o sicrotolerantes) presentan una distribución más amplia que los sicrófilos, y pueden aislarse de muestras obtenidas en ambientes templados, o ambientes mantenidos a bajas temperaturas, por ejemplo alimentos refrigerados (aproximadamente a 4 °C). Estos microorganismos pueden crecer a 0 °C pero de manera lenta, y se debe esperar varias semanas para observar crecimiento visible (Madigan & Martinko, 2006a). En la Fig. 1 se muestra esquemáticamente la relación entre la tasa y la temperatura de crecimiento microbiano.



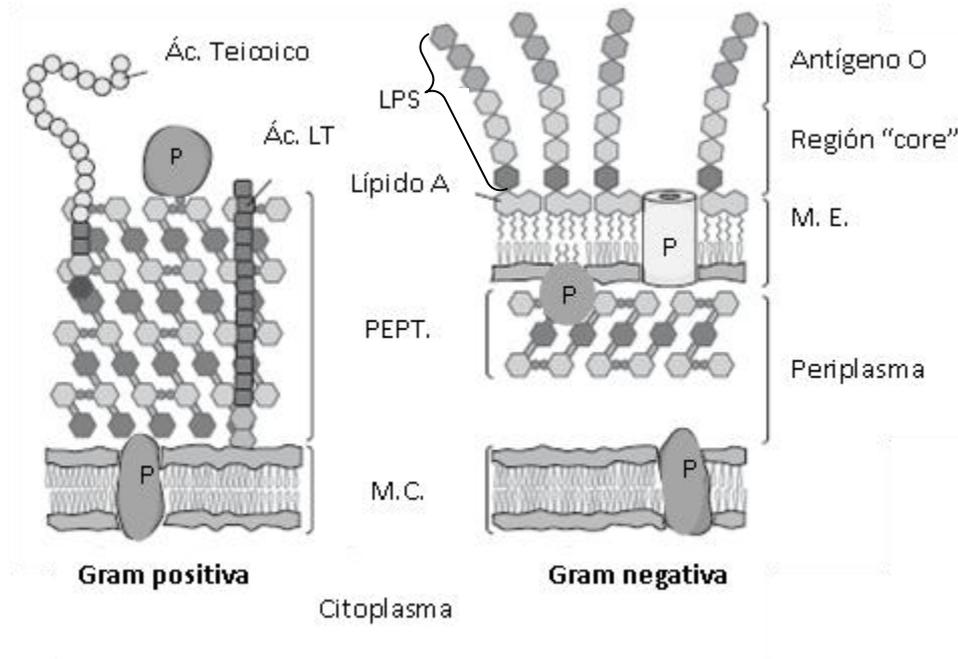
**Figura 1.** Relación entre la tasa de crecimiento y la temperatura para microorganismos sicrofílos, sicrotolerantes y mesófilos. Adaptado de Deming (2009).

## 1. *Envoltura Celular*

En las bacterias Gram-negativas, la envoltura celular está constituida por una membrana externa, una pared de peptidoglicanos y una membrana interna o membrana citoplasmática. Las bacterias Gram-positivas no presentan la membrana externa, y la pared de peptidoglicanos es más gruesa (Fig.2). La membrana externa de las bacterias Gram-negativas es una bicapa lipídica, en la cual la capa más interna está compuesta de fosfolípidos, y la más externa de glicolípidos, principalmente lipopolisacáridos (LPS). En la membrana externa también se encuentran lipoproteínas unidas a través de un grupo lipídico, y proteínas transmembrana, con conformación de barril  $\beta$ , que reciben el nombre de "Proteínas de Membrana Externa" (PME). Algunas de éstas intervienen en la transporte de moléculas a través de la membrana externa. El LPS es un polímero constituido por una parte lipídica compuesta por ácidos grasos unidos a un disacárido (dos moléculas de N-acetilglucosamina) y que se denomina *lípidio A*. Unida al lípidio A y proyectándose hacia el exterior se encuentra una cadena glicosídica que se divide en una parte central o "core" y el denominado Antígeno O, que difieren en composición dependiendo del microorganismo (Madigan &

## Introducción

Martinko, 2006b; Silhavy et al., 2010). Los grupos fosfatos presentes en los azúcares de la región central del LPS y en el lípido A, pueden unir cationes de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  que podrían intervenir en la estabilización de la capa más externa de la membrana externa (Ray et al., 1994a; Kumar & Jagannadham, 2002).

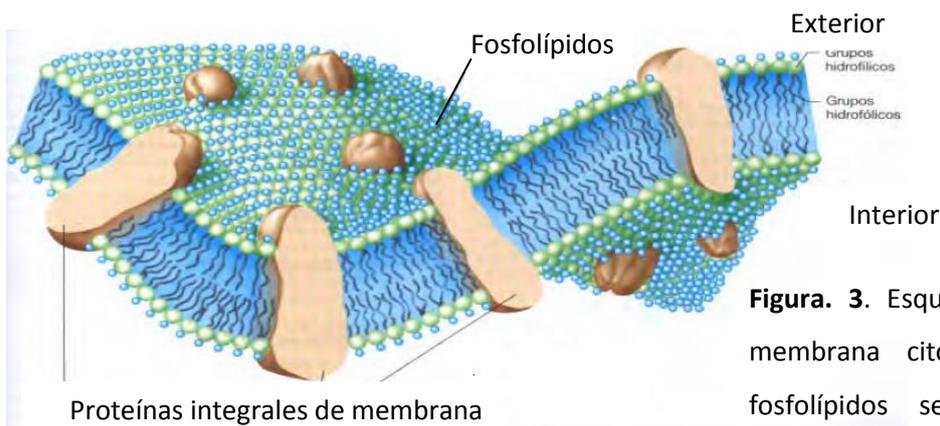


**Figura 2.** Representación de la envoltura celular de una bacteria Gram-positiva y una Gram-negativa. Se señalan: la membrana externa (ME), la membrana citoplasmática (MC), la pared de peptidoglicano (PEPT.), los lipopolisacáridos (LPS) y sus componentes (lípido A, región "core", y Antígeno O), los ácidos teicoicos (Ác. Teicoicos) y lipoteicoicos (Ác. LT) de la pared de bacterias Gram-positivas, y las proteínas (P) embebidas en la membrana citoplasmática y asociadas a la pared de peptidoglicanos y a la membrana externa. Tomado de Silhavi et al. (2010).

## Introducción

Siguiendo hacia el interior celular se encuentra, tanto en bacterias Gram-positivas como -negativas, la pared de peptidoglicano, la cual está formada por láminas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico entrecruzadas. En cuanto a la pared de peptidoglicano, las diferencias entre bacterias Gram-positivas y -negativas radican en el grosor (siendo mayor en las positivas), y en los entrecruzamientos que se dan entre las cadenas de glicanos. Además, en bacterias Gram-positivas hay otras moléculas asociadas a la pared de peptidoglicano, como son los ácidos teicoicos y lipoteicoicos (Madigan & Martinko, 2006b; Silhavy et al., 2010).

Finalmente, encontramos la membrana interna o citoplasmática, que es una bicapa de fosfolípidos con proteínas embebidas en ella (Fig. 3). Los fosfolípidos que se encuentran en mayor cantidad son el fosfatidilglicerol y la fosfatidiletanolamina, pero también hay en menor cantidad cardiolipina y fosfatidilserina (Silhavy et al., 2010). La estructura de la membrana se estabiliza por puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, pero también a través de interacciones iónicas establecidas entre los grupos polares de carga negativa de los fosfolípidos y cationes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  (Madigan & Martinko, 2006b).



**Figura. 3.** Esquema de la estructura de la membrana citoplasmática. La bicapa de fosfolípidos se forma con los grupos hidrofóbicos de los fosfolípidos orientados hacia el interior de la bicapa, y los hidrofílicos hacia afuera de la misma. Modificado de Madigan & Martinko (2006a).

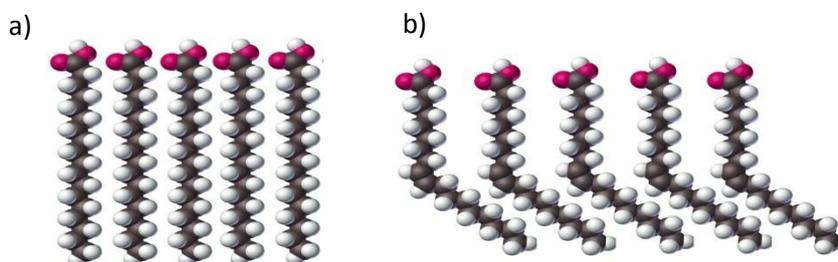
## Introducción

---

La temperatura ambiental afecta la estructura de las membranas celulares. A medida que disminuye, la membrana se vuelve menos fluida y va tomando consistencia de gel, lo cual lleva a una pérdida de sus funciones (permeabilidad, transporte, generación de energía, división celular). Existen varias estrategias empleadas por las bacterias para restaurar la fluidez de la membrana celular, y se describen a continuación.

### **Rol de los ácidos grasos**

Tanto la membrana citoplasmática como la membrana externa (en el caso de bacterias Gram-negativas) presentan ácidos grasos saturados e insaturados. Modificando su proporción los microorganismos controlan la fluidez de sus membranas. A mayor número de ácidos grasos insaturados, la fluidez de membrana aumenta. Este fenómeno se explica porque las cadenas alifáticas de los ácidos grasos insaturados no se empaquetan de manera firme, debido al ángulo que se forma en la molécula por el doble enlace en *cis*, mientras que para los ácidos grasos saturados la interacción entre las cadenas es fuerte, y se produce un ordenamiento mayor de las moléculas. Como consecuencia, las membranas con una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados tienen menor punto de fusión y son más fluidas respecto a las membranas con más cantidad de ácidos grasos saturados (Fig. 4).



**Figura 4.** Empaquetamiento de ácidos grasos saturados (a) e insaturados (b). (Modificado de [www.bionova.org.es](http://www.bionova.org.es)).

## Introducción

---

Se ha observado que las bacterias psicrófilas presentan una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en sus membranas en comparación con las mesófilas (Tabla 1). Además, cuando las bacterias mesófilas se someten a una disminución de la temperatura de crecimiento, se verifica una disminución de la relación ácidos grasos saturados/insaturados de membrana (Ray, 2006; Shivaji et al., 2007; Shivaji & Prakash, 2010).

## Introducción

**Tabla 1.** Composición de ácidos grasos de membranas en bacterias sicrófilas (sombreadas en celeste) y mesófilas.

ÁCIDO GRASO (a)	PROPORCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS (%) (b)					
	<i>Halomonas</i>		<i>Pseudomonas</i>		<i>Planococcus</i>	
	<i>variabilis</i>	<i>glacieri</i>	<i>orientalis</i>	<i>antarctica</i>	<i>okeanokoites</i>	<i>antarcticus</i>
C12:0	-	0,5	2,3	0,8	-	-
C14:0	-	0,3	0,4	0,3	-	-
C14:1	-	2,9	-	-	Traza	Traza
Iso-C14:0	-	-	-	-	33,9	1,0
C15:0	-	0,2	0,2	0,3	Traza	14,2
C15:1	-	-	-	0,8	-	9,8
Iso-C15:0	-	-	-	-	2,9	1,3
Anteiso-C15:0	-	-	-	-	14	43,2
C16:0	17,5	11,6	30,4	24,8	4,7	4,2
Iso-C16:0	-	-	-	-	28,1	4
C16:1	-	-	-	-	2,8	3,0
C16:1Δ7c	2,4	13,5	32	29,6	-	-
C16:1Δ9t	-	-	-	5,8	-	-
C16:1Δ9c	-	-	-	2,3	-	-
Iso-C16:1	-	-	-	-	11,7	1,2
C17:0	-	-	0,3	0,7	-	1,0
Ciclo-C17:0	11,4	5,5	4,9	1,4	-	-
Iso-17:0	-	-	-	-	Traza	0,3
Anteiso-17:0	-	-	-	-	Traza	9,5
Iso + anteiso-C17:1	-	-	-	-	-	4,2
C18:0	-	5	1,1	1,4	1,8	0,3
Iso-C18:0	-	-	-	-	Traza	-
C18:1	15,1	31,2	25,3	-	-	1,0
Ciclo-C19:0	50,9	-	0,7	-	-	-
A (c)	-	2,4	-	-	-	-
B (c)	-	10,0	-	-	-	-
C (c)	-	10,3	-	-	-	-

(a) Se indica la fórmula del ácido graso como el número de carbonos en la cadena (C) y de insaturaciones.

(b) Porcentajes relativos de cada ácido graso respecto al total.

(c) A: ácido hexadecanoico 9,10-dimetoxi metil éster; B: ácido octadecanoico 2-octil metil éster ciclopropano; C: ácido octadecanoico 11-metoxi metil éster

- : No se detectó el ácido graso; Traza <0,1%.

Modificado de Shivaji et al., 2007.

## Introducción

---

Otra modificación que se observa en los ácidos grasos para mantener la fluidez de membrana, es que las cadenas alifáticas de los mismos sean más cortas. Los ácidos grasos con cadenas cortas, y particularmente aquellas con menos de 12 carbonos, otorgan una mayor fluidez a la membrana celular (Ray et al., 19998; Chattopadhyay, 2006; D'Amico et al., 2006; Margesin et al., 2007; Moyer & Morita, 2007; Rodrigues & Tiedje, 2008). Esto se debe a que al presentar cadenas más cortas se reducen las interacciones de van der Waals entre las mismas, y así se reduce la viscosidad de los lípidos y se aumenta la fluidez. Este efecto se hace más pronunciado cuando una de las cadenas es corta y la otra larga, ya que esta última queda libre de las fuerzas de van der Waals en su extremo distal, y tiene por lo tanto más espacio para flexionarse y vibrar (Russell, 2008).

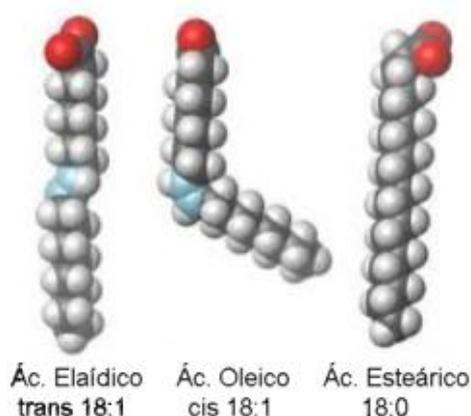
También se sabe que el tipo de isómero geométrico (*cis* y *trans*) del ácido graso es un factor más que afecta la fluidez de la membrana, siendo ésta mayor cuando hay una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en *cis* que en *trans*. Esto se debe a que el ángulo que produce el doble enlace en *cis* es mayor al que se produce cuando los átomos se encuentran en *trans* (Fig. 5). Se ha observado que las bacterias sicrófilas tienen mayor proporción de ácidos grasos insaturados en *cis* cuando crecen a bajas temperaturas, y que se produce un cambio hacia ácidos grasos insaturados en *trans* y saturados cuando se aumenta la temperatura de crecimiento (Ray, 2006; Shivaji et al., 2007; Shivaji & Prakash, 2010).

Se ha visto particularmente en bacterias Gram-negativas, pero no únicamente, un aumento en la ramificación de las cadenas de ácidos grasos como mecanismo de aumentar la fluidez de membrana. La ramificación consiste en el agregado de uno o más grupos metilo como sustituyentes en la cadena hidrocarbonada. Las ramificaciones en las cadenas de ácidos grasos hacen que las cadenas presenten un mayor ordenamiento en la fase líquida-cristalina, pero un mayor desorden en la fase de gel, en comparación con los ácidos grasos insaturados en *cis*, es decir, que le otorgan a la bicapa lipídica una fluidez intermedia. Si la ramificación está además en posición *anteiso* (antepenúltimo

## Introducción

---

carbono) la fluidez es mayor que en posición *iso* (penúltimo carbono) (Margesin et al., 2007; Shivaji et al., 2007; Russell, 2008; Shivaji & Prakash, 2010).



**Figura 5.** Conformación de un ácido graso de dieciocho átomos de carbono según su grado de saturación/insaturación y orientación geométrica en torno al doble enlace. (Modificada de [www.cdd-tum.de](http://www.cdd-tum.de))

### **Rol de los carotenoides**

Los carotenoides son pigmentos orgánicos producidos por un amplio rango de organismos: bacterias, algas, hongos y plantas. En las bacterias fotosintéticas, los carotenoides participan en la absorción y transferencia de energía hacia la clorofila, y protegen a la bacteria contra el daño causado por la foto-oxidación. En organismos no fotosintéticos, los carotenoides podrían conferir protección contra la radiación UV y también se ha observado que tendrían una función moduladora de la fluidez de membrana (Jagannadham et al., 2000; Ray, 2006; Cloksin et al., 2007; Shivaji et al., 2007). En bacterias antárticas y sicrófilas se ha observado la presencia de carotenoides asociados a la membrana celular (Jagannadham et al., 2000; Dieser et al., 2010). Los carotenoides con estructuras químicas polares confieren a la membrana una mayor estabilidad que los no polares, y la síntesis de

## Introducción

---

un tipo u otro de este pigmento (polar o no polar) aparentemente estaría relacionado a la temperatura de crecimiento (Jagannadham et al., 2000; Chattopadhyay, 2006; Clocksin et al., 2007; Shivaji et al., 2007; Dieser et al., 2010; Shivaji & Prakash, 2010).

Las modificaciones a nivel de ácidos grasos y carotenoides actúan en forma conjunta para mantener la fluidez de la membrana en un nivel “óptimo” para que lleve a cabo las funciones celulares. Cuando una bacteria crece a bajas temperaturas aumenta la cantidad de ácidos grasos insaturados y con cadenas ramificadas, lo que aumenta la fluidez de membrana. Concomitantemente, la producción de mayor cantidad de carotenoides polares le otorgaría a la membrana celular una mayor estabilidad en estas condiciones (Ray et al., 1998; Jagannadham et al., 2000; Chattopadhyay, 2006; Ray, 2006; Clocksin et al., 2007; Shivaji et al., 2007; Dieser et al., 2010; Shivaji & Prakash, 2010).

### **Rol de los lipopolisacáridos**

En las bacterias antárticas, se ha observado un cambio en el estado de fosforilación de la región central (“core”) de la molécula de LPS, que es dependiente de la temperatura de crecimiento, encontrándose un menor contenido en fosfatos a bajas temperaturas. Se ha propuesto que también hay una disminución a bajas temperaturas del contenido de cationes divalentes, como  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$ , que se encuentran formando puentes entre las moléculas de LPS, al unirse a ellos a través de los grupos fosfatos (Ray et al., 1994b; Ray et al., 1998; Kumar & Jagannadham, 2002; Ray, 2006). Esto reduciría el empaquetamiento de los LPS y así afectaría la permeabilidad de la membrana externa, al cambiar las propiedades de los canales de porinas de la membrana. También se ha observado un aumento de ácidos grasos insaturados o de ácidos grasos con grupos hidroxilo en el componente de lípido A del LPS. Esto ayudaría a mantener la homeoviscosidad de la membrana externa (Ray et al., 1998; Kumar & Jagannadham, 2002; Ray, 2006).

### **2. Acumulación de solutos compatibles y otras moléculas**

En respuesta a condiciones de estrés, las células bacterianas acumulan compuestos de bajo peso molecular (por ej.: polioles, azúcares, derivados de aminoácidos, poliaminas) que reciben el nombre de solutos compatibles. Reciben este nombre porque son *compatibles* con el metabolismo celular y se acumulan en el interior celular, hasta altas concentraciones. Por ejemplo, se producen en condiciones de estrés osmótico, como lo que ocurre en un ambiente acuoso salino ante la baja de temperatura. Los solutos compatibles ayudan a mantener el volumen celular y la presión de turgencia, y se ha sugerido que actúan como chaperonas de bajo peso molecular protegiendo la estructura de las proteínas (Deming, 2009). A nivel citoplasmático, los solutos compatibles reducen el punto de congelamiento de la fase acuosa y así previenen la desnaturalización y agregado de proteínas, ante una baja de la temperatura ambiental.

Uno de los compuestos que se produce bajo estrés osmótico es la glicina-betaína (derivado del aminoácido glicina), que actúa como osmolito evitando el agregado de proteínas en el interior celular (Chattopadhyay, 2002, 2006; Shivaji & Prakash, 2010).

En bacterias sicrotolerantes se ha detectado la producción de polihidroxialcanoatos (moléculas de alto peso molecular y por lo tanto no se ajustan a la definición de soluto compatible), que funcionan como moléculas de reserva de energía y carbono. También acumulan poliaminas como reserva de nitrógeno. Estos compuestos no son exclusivos de bacterias adaptadas a las bajas temperaturas, pero asegurarían en estos microorganismos una reserva intracelular de carbono y nitrógeno, evitando así cualquier disminución en la disponibilidad de estos nutrientes en ambientes donde se registran bajas temperaturas (Rodrigues & Tiedje, 2008).

También se han encontrado bacterias que producen polisacáridos extracelulares que actúan como crioprotectores (Rodrigues & Tiedje, 2008) que protegen y estabilizan las enzimas extracelulares producidas por estos microorganismos ante la desnaturalización térmica (Deming, 2009).

### **3. Transcripción y traducción**

Las bajas temperaturas afectan la síntesis proteica a varios niveles: reducen la actividad de las enzimas que participan en los procesos de transcripción y traducción, dificultan el plegamiento de las proteínas y estabilizan las estructuras secundarias de ADN y ARN. En organismos psicrófilos y psicrotolerantes, estos procesos y las enzimas que participan en los mismos están adaptados para tener una actividad óptima a bajas temperaturas.

Algunas proteínas de unión a ácidos nucleicos como la proteína de “choque frío” CspA (“cold shock protein A”) de *E. coli* y las ARN helicasas se encuentran sobre-expresadas en microorganismos psicrófilos (D’Amico et al., 2006). Las proteínas de “choque frío” (“cold-shock”, Csp) son una familia de pequeñas proteínas conservada, que se unen a ácidos nucleicos simple hebra y actúan como chaperonas manteniendo las moléculas de ARNm sin su estructura secundaria. Debemos considerar que estas proteínas de “choque frío”, que también se inducen en microorganismos mesófilos por una baja en la temperatura de crecimiento, se expresan de manera constitutiva en psicrófilos, y entonces estarían formando parte de la respuesta adaptativa al frío en estos microorganismos (Casanueva, 2010). Se ha descrito que las proteínas de unión al ADN como la subunidad A de la ADN girasa A (GyrA) y las proteínas tipo histonas (HU- $\beta$  y H-NS) se encuentran relacionadas a la supervivencia de microorganismos a bajas temperaturas. Esto se debe a que el superenrollamiento negativo del ADN aumenta a bajas temperaturas y entonces se hace necesaria la presencia de estas proteínas para relajarlo (Rodrigues & Tiedje, 2008).

## Introducción

---

En cuanto al proceso de transcripción, se ha observado que se encuentran sobre-expresados el factor de transcripción NusA (terminación y antiterminación de transcritos) y ARN helicasas (desestabilizan estructuras secundarias de ARN y promueven la degradación deARNm que se producen al inducirse la expresión de proteínas de “choque frío”) (Chattopadhyay, 2006; Rodrigues & Tiedje, 2008).

Para la síntesis de una proteína, el complejo ribosomal debe ensamblarse correctamente sobre el ARNm. Las bajas temperaturas afectan este proceso, y por ello se dan adaptaciones que se han descrito a nivel de los factores de iniciación de la traducción (IF1 y 2) y del factor A de unión a ribosomas (RBFA) (Rodrigues & Tiedje, 2008).

Algunas de estas proteínas que se expresan diferencialmente a bajas temperaturas se han identificado por estudios de proteómica en organismos sicrotolerantes y sicrófilos. Los resultados de algunos de estos estudios se muestran en la Tabla 2.

## Introducción

**Tabla 2.** Ejemplos de proteínas inducidas a bajas temperaturas en microorganismos psicrófilos. <sup>(a)</sup>

Función	Bacteria				
	<i>Methanococcoides burtoni</i>	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	<i>Psychrobacter articus</i>	<i>Shewanella livingstonensis</i>
Transcripción	Subunidad E de la ARN polimerasa, proteína de unión a la secuencia TATA	Factor de elongación de la transcripción	Factor antiterminador NusA	Subunidad $\alpha$ de la ARN polimerasa	Subunidad $\alpha$ de la ARN polimerasa, factor de elongación de la transcripción GreA
Traducción	Proteína de la subunidad ribosomal pequeña, Isomerasa <i>cis-trans</i> de Prolina	Proteína S30P de la subunidad ribosomal pequeña, Chaperonina HSP10	Proteínas ribosomales L25 y S2, Proteína de choque frío (CspA), Factores de elongación Tu (TypA) y Ts (Tsf)	Proteína ribosomal S15, Sintetasas de ARNt, Factor de elongación de la traducción EF-Tu, Chaperoninas putativas HSP10 y HSP60, Isomerasa <i>cis-trans</i> de Prolina	Proteína de choque frío (CspA), Factores de elongación Tubf y P, Factor de iniciación de la traducción, Isomerasa <i>cis-trans</i> de prolina, Sintetasa de ARNt de lisina
División celular					GTPasa de división celular (FtsZ)
Movilidad					Flagelina y otras proteínas flagelares (FlgE y FlgL)
Transporte		Proteína de unión a ATP/ Transportador ABC	ATPasa del sistema ABC, Transportador de Fe <sup>+2</sup> del tipo ABC, Transportador de la familia TRAP T, Sistema de eflujo de membrana externa TolC		Porina OmpC, Proteína de membrana externa OmpA

<sup>(a)</sup> Datos obtenidos a partir de trabajos de proteómica. Tomado de Kurihara (2008).

## Introducción

**Tabla 2.** Continuación. <sup>(a)</sup>

Función	Bacteria				
	<i>Methanococoides burtoni</i>	<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	<i>Psychrobacter articus</i>	<i>Shewanella livingstonensis</i>
Metabolismo	Subunidades $\alpha, \beta, \gamma$ de la reductasa de la metil coenzima M, Trimetilamina metiltransferasa, F,H Deshidrogenasa, Metilcobalamina, Glutamato deshidrogenasa, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, Catalasa, subunidad $\alpha$ de flavoproteína, subunidad $\beta$ de la ATP sintasa, fosforilasa de nucleósido de pirimidina, Subunidad $\alpha$ de la succinil Co-A sintetasa	Malato/Lactato deshidrogenasa, Isocitrato Liasa, Acetato quinasa, Subunidad $\beta$ de la ATP sintasa, NAD <sup>+</sup> sintetasa, Glicina deshidrogenasa, Aminotransferasa, Xanthina deshidrogenasa	Fosfoglicerato deshidrogenasa, Aminotransferasa, Fumarato hidratasa, Nucleósido difosfato quinasa, Aldehído deshidrogenasa	Pirofosfatasa, Deoxiribosa fosfato aldolasa, Subunidad $\alpha$ de la flavoproteína, Flavina oxidoreductasa,

<sup>(a)</sup> Datos obtenidos a partir de trabajos de proteómica. Tomado de Kurihara (2008).

## 4. Enzimas

La actividad de las enzimas depende en gran parte de la temperatura de reacción. La constante catalítica ( $k_{cat}$ ), que corresponde al número de moléculas de sustrato convertidas en producto por sitio activo por unidad de tiempo, presenta una dependencia exponencial con la temperatura. Para organismos mesófilos, una disminución de la temperatura de 37 °C a 0 °C implica una reducción de hasta 80 veces la actividad enzimática.

Existen dos tendencias en cuanto a la adaptación de las enzimas al frío:

- a. Las enzimas de los psicrófilos presentan actividades específicas que son hasta diez veces mayor comparadas con las actividades detectadas en mesófilos.
- b. La temperatura a la cual la enzima presenta la actividad máxima es baja, y por eso presentan poca estabilidad y se inactivan a temperaturas moderadas.

La estrategia adaptativa más común a nivel enzimático, para mantener la actividad celular a bajas temperaturas, es aumentar la eficiencia catalítica ( $k_{cat} / K_m$ ). Esto se ha logrado a través de modificaciones estructurales que le otorgan a la molécula una mayor flexibilidad (Morgan-kiss et al., 2006; Marx et al., 2007). Un aumento en la flexibilidad de la molécula conlleva una disminución de la estabilidad. En enzimas con múltiples dominios, el dominio catalítico es quien presenta mayor flexibilidad y es sensible al aumento de temperatura; mientras que los dominios no catalíticos mantienen una termoestabilidad similar a la que presentan las enzimas homólogas de mesófilos. Por ello, se habla de una flexibilidad local a nivel del sitio activo debido a su alta actividad, pero con la característica de ser termolábil (D'Amico et al., 2006; Casanueva et al., 2010; Piette et al., 2011).

## Introducción

---

Diferentes estrategias se combinan para alcanzar estas adaptaciones al frío. Se observa un aumento en el número de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas expuestas al solvente, un debilitamiento de enlaces intramoleculares (ej.: puentes de hidrógeno), y cambios en las proporciones de aminoácidos presentes (Rodrigues & Tiedje, 2008; Margesin & Miteva, 2011; Martínez-Rosales et al., 2012). Se han identificado algunos aminoácidos claves en este proceso de adaptación (Martínez-Rosales et al., 2012). Por ejemplo, se encuentra un aumento en el número de glicinas, que brindan una mayor amplitud en el movimiento de la estructura secundaria de la proteína. Se ha observado también un aumento de los aminoácidos alanina y asparagina entre enzimas psicrófilas comparándolas con homólogas mesófilas (Gianese et al., 2001), una mayor proporción de aminoácidos polares cargados (principalmente glutamato y treonina), y una reducción de aminoácidos hidrofóbicos (principalmente leucina) (Saunders et al., 2003)

### ***5. Proteínas anti-congelamiento***

En bacterias que viven en ambientes sometidos a muy bajas temperaturas, se producen las denominadas Proteínas Anti-Congelamiento (PAC) (Tabla 3) y Proteínas de Unión a Hielo (PUH) (Raymond et al., 2007), que se unen a los cristales de hielo y así evitan su crecimiento y recristalización (formación de cristales más grandes a partir de pequeños cristales). Estos mecanismos evitan el congelamiento citoplasmático y el daño a nivel de las membranas celulares, y permiten la sobrevivencia a bajas temperaturas (Chattopadhyay, 2006; D'Amico et al., 2006; Casanueva et al., 2010; Margesin & Miteva, 2011).

**Tabla 3.** Algunas proteínas anti congelamiento de origen bacteriano. <sup>(a)</sup>

ORGANISMO	FUENTE	TIPO
<i>Pseudomonas putida</i>	Rhizobacteria del Ártico	Lipoglicoproteína
<i>Marinomonas primoryensis</i>	Lago salino antártico	Proteína sin caracterizar
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Suelo antártico	Proteína sin caracterizar
<i>Moraxella</i> sp.	Suelo antártico	Lipoglicoproteína
<i>Flavobacterium xanthum</i>	Suelo antártico	Proteína sin caracterizar

<sup>(a)</sup> Modificada de Raymond *et al.* (2007).

## 6. Exopolisacáridos

Se ha encontrado que las bacterias antárticas marinas y del Ártico aumentan la producción de exopolisacáridos (EPS) cuando crecen a bajas temperaturas. Estos compuestos modifican el ambiente físico-químico en el que se encuentran las bacterias, participan en la adhesión de las células a las superficies y en la retención de agua, favorecen la captura de nutrientes, retienen y protegen a las enzimas extracelulares de la desnaturalización por frío, y actúan como crioprotectores (Mancuso *et al.*, 2005; D'Amico *et al.*, 2006).

Los EPS bacterianos son diversos a nivel de composición. La mayoría de los EPS de bacterias marinas están compuestos por entre tres a cinco tipos de monosacáridos. Los más frecuentes son las pentosas (arabinosa, ribosa, xilosa),

## Introducción

---

hexosas (glucosa, galactosa, fucosa, manosa), aminoazúcares (glucosamina y galactosamina) y ácidos urónicos (ácido galacturónico y glucurónico). Estos monosacáridos se presentan en diferentes cantidades relativas en cada bacteria (Mancuso et al., 2004; Poli et al., 2010). Los EPS se pueden encontrar unidos a la superficie celular (polisacáridos capsulares) o por interacciones leves, o libres en la matriz extracelular (Poli et al., 2010). Si bien se ha encontrado que la mayoría de las bacterias, estudiadas hasta el momento, presentan una producción máxima de EPS en la fase estacionaria de crecimiento; en algunos microorganismos como *Pseudoalteromonas antarctica* la producción es máxima en la fase exponencial (Poli et al., 2010). También se encontró que la producción de EPS disminuye cuando la temperatura de crecimiento sube a temperaturas alrededor de los 20 °C, lo que apoya el concepto del papel crioprotector de los EPS (Mancuso et al., 2005).

## **II. La Antártida como recurso genético**

El continente antártico se caracteriza por estar geográfica y climáticamente aislado, y no ha recibido en su mayor parte influencia antropogénica. Presenta una amplia diversidad de ambientes acuáticos (mares, lagos con distinta salinidad, y hielos) y también tiene una gran cantidad de ambientes terrestres que permanecen sin hielo. Desde el punto de vista antropogénico, este continente se encuentra bajo la presión de condiciones ambientales extremas, como ser su aridez, grandes fluctuaciones de temperatura, frío extremo y altas dosis de radiación solar. Sobre la mayoría del continente reina un clima polar, con temperaturas que en verano alcanzan los -40 °C en el centro del continente, y en invierno hasta -70 °C. En las zonas costeras (península Antártica, islas adyacentes e islas subantárticas) el clima es de tundra, y en verano la temperatura promedio apenas sobrepasa los 0 °C y en invierno llega cerca de -10 °C.

Si bien siempre se lo ha considerado como un ambiente prístino, y la diversidad de plantas y animales es acotada, la Antártida posee una gran diversidad microbiana (Chong et al., 2009; Teixeira et al., 2010; Peeters, Ertz, & Willems, 2011;

## Introducción

---

Sisinthu Shivaji et al., 2011). Este gran reservorio genético ha sido aprovechado por muchos investigadores para realizar el aislamiento de microorganismos con potencial biotecnológico (Vazquez et al., 2004; Vazquez et al., 2005; Wang et al., 2008; Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011; Martínez-Rosales et al., 2012). La búsqueda de nuevos productos biotecnológicos no sólo se lleva a cabo realizando aislamiento y selección de microorganismos de interés en medios selectivos, sino que también mediante técnicas independientes de cultivo como la metagenómica. Mediante la metagenómica funcional se han identificado varias enzimas activas a bajas temperaturas con potencial biotecnológico incluyendo proteasas, lipasas, esterases, y celulasas (Berlemont et al., 2009, 2011; Heath et al., 2009; Zhang, 2009; Kasana, 2011; Zhang et al., 2011; Hu et al., 2012).

Muchas enzimas obtenidas de psicrófilos se han producido de manera recombinante utilizando hospederos mesófilos, pero al bajar la temperatura de crecimiento de estos microorganismos se afecta la síntesis de proteínas, y muchas veces se producen agregados proteicos insolubles en el interior celular. Para solventar este problema, se están diseñando sistemas de expresión de proteínas empleando sistemas de expresión en “frío”. Un ejemplo de esto es el vector de expresión “p-Cold” que se ha empleado para la producción de proteínas en *E. coli* y contiene el promotor de la proteína de “choque frío” CspA para regular la transcripción. Pero también se están desarrollando sistemas de expresión de proteínas recombinantes utilizando bacterias psicrófilas como hospederas (Martínez-Rosales et al., 2012).

A pesar de los avances que se han hecho en el tema, aún estamos lejos de conocer toda la potencialidad de este continente para el desarrollo de productos biotecnológicos (Carpenter et al., 2000; Tindall, 2004; Xiao et al., 2007; Niederberger et al., 2008)

### ***III. Enzimas proteolíticas***

Las proteasas o enzimas proteolíticas catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos degradando proteínas en péptidos pequeños o aminoácidos. Se clasifican según diferentes criterios: preferencia de residuos aminoacídicos contiguos al sitio de hidrólisis, grupo funcional presente en su sitio activo, pH óptimo de actividad, temperatura de estabilidad, entre otras.

La hidrólisis puede comenzar por el extremo N-terminal de la proteína (aminoproteasas) o por el C-terminal (carboxipeptidasas), denominándose a este tipo de enzimas “exoproteasas” ya que comienzan la hidrólisis por un extremo de la proteína. Cuando la hidrólisis comienza en el interior de la molécula proteica la proteasa recibe el nombre de “endoproteasa” (Rao et al., 1998; Turk, 2006). También se clasifican en proteasas intra o extra-celulares, haciendo referencia a si la célula productora retiene la enzima en su interior o si la secreta al medio circundante, respectivamente. Las peptidasas pueden hidrolizar únicamente ciertos enlaces peptídicos dentro de la molécula (hidrólisis parcial), o hidrolizar completamente la proteína blanco hasta liberar todos los aminoácidos que la componen (hidrólisis completa) (Salahuddin & Khan, 2008).

La clasificación de estas enzimas no es fácil debido a que presentan gran diversidad estructural y de acción (Rao et al., 1998). El sistema de clasificación actual se basa en la comparación del sitio activo, mecanismo de acción y estructura tridimensional (Salahuddin & Khan, 2008). Según el grupo funcional presente en el sitio activo, o fundamental para su acción, se las clasifica en cisteín-, serín-, treonin-, aspartato-, metalo-, o glutamo-proteasas. Las tres primeras son en general, aminoproteasas (Rao et al., 1998; Turk, 2006). Por otro lado, la Unión Internacional de Bioquímica reconoce sólo cuatro grupos o clases según el mecanismo de acción de estas enzimas proteolíticas: cisteín proteasas, serín proteasas, asparto proteasas, y metalo proteasas (Salahuddin & Khan, 2008).

Siguiendo con los sistemas de clasificación, el pH al cual las proteasas presentan actividad óptima permite dividir a estas enzimas en alcalinas, neutras o

## Introducción

---

acídicas (Rao et al., 1998); y la termoestabilidad de las proteasas las clasifica en termoresistentes o termosensibles.

Las enzimas proteolíticas relacionadas evolutivamente, ya sea por conservación en toda o en parte de la secuencia aminoacídica responsable de la actividad catalítica, se agrupan en *familias*. Las familias que se cree han tenido un ancestro común, ya sea por similitud en estructura terciaria o porque los residuos aminoacídicos en el sitio activo están en el mismo orden, se clasifican en clanes (Rawlings & Barrett, 1993; Rao et al., 1998; Rawlings et al., 2010).

Las proteasas tienen varias aplicaciones industriales, principalmente en la industria alimenticia, en medicina, en la fabricación de detergentes, y en biotecnología (Tabla 4). Son claves en la degradación y en el uso de proteínas por parte de las bacterias (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002; Kasana, 2010).

## Introducción

**Tabla 4.** Ejemplos de aplicaciones de las proteasas a nivel industrial.

INDUSTRIA	PROTEASA	APLICACIÓN
Panadería	Proteasa neutra	Mejoramiento de la masa
Bebidas	Papaína	Remoción de turbidez producida por proteínas
Lácteos	Proteasas fúngicas, Papaína	Procesamiento de proteínas del suero, producción de quesos
Detergente	Subtilisinas, Proteasas alcalinas en general	Remoción de manchas de proteínas
Procesamiento de alimentos	Diversas	Modificación de alimentos ricos en proteínas (gluten, soja)
Cuero	Tripsina	Remoción de pelos, ablandamiento del cuero
Carnes rojas y blancas	Papaína	Ablandamiento de carne
Medicina	Tripsina	Remoción de tejido muerto, disolución de coágulos sanguíneos
Fotografía	Diversas	Recuperación de plata de placas de rayos X usadas
Edulcorantes	Termolisinas	Producción de aspartamo

Tomado de Kirk et al., 2002 y Kumar et al., 2008

### ***Importancia tecnológica de las proteasas***

Debido a sus variadas aplicaciones tecnológicas, la búsqueda de enzimas proteolíticas con nuevas propiedades, como ser una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, ha generado gran interés. Varios investigadores han aislado bacterias productoras de proteasas de ambientes fríos, habiendo caracterizado estas enzimas y estudiado sus potenciales aplicaciones (Vazquez et al., 2004; Vazquez et al., 2005; Kasana, 2010; Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011).

Estas enzimas activas en “frío” tienen una alta actividad a bajas temperaturas y esto permite su aplicación en ciertos procesos industriales que pueden ser llevados a cabo a temperatura ambiente, implicando un ahorro energético para la empresa. Además, al ser termosensibles, se pueden inactivar rápidamente, y al trabajar a bajas temperaturas permiten preservar algunos productos sensibles a temperaturas mayores (Marx et al., 2007).

Las enzimas activas a bajas temperaturas, tales como proteasas, celulasas, amilasas y lipasas, tienen variadas aplicaciones a nivel de la industria de detergentes, alimentos (productos lácteos) y textiles entre otros (Van den Burg, 2003; Kasana, 2010; Kumar et al., 2011) (Tabla 5).

## Introducción

---

**Tabla 5.** Algunas aplicaciones de enzimas activas en frío.

ENZIMAS	APLICACIÓN	VENTAJAS
<b>Pectinasas, Celulasas</b>	Clarificación de jugo de frutas	Mantiene la fragancia
<b>Proteasas</b>	Remoción de la piel del pescado	Mantener el producto fresco
<b>Lisozima, Oxidasa</b>	Preservación	Materiales volátiles y termo-sensibles
<b><math>\beta</math>-galactosidasa</b>	Preparación de leche deslactosada	Mantener el producto fresco
<b>Proteasas, Lipasas y Celulasas</b>	Preparación de detergentes	Empleo con agua corriente (sin calentar)
<b>Lipasas</b>	Tratamiento de aguas de desechos	Materiales volátiles y termo-sensibles

Tomado de Pulicherla et al. (2011).

### **IV. El género *Pseudomonas***

Los integrantes del género *Pseudomonas* son bacterias con forma de bastón recto o ligeramente curvado, cuyos diámetros varían entre 0,5-1,0  $\mu\text{m}$ , y alcanzan entre 1,5 y 5,0  $\mu\text{m}$  de longitud. Son Gram-negativos y generalmente móviles mediante uno o más flagelos polares, aunque algunas especies presentan flagelos laterales. Son aerobios, aunque algunos representantes del género pueden emplear nitrato como aceptor final de electrones y crecer anaeróbicamente (Moore et al., 2006).

Las bacterias de este género son ubicuas y ocupan un amplio rango de hábitats, desde suelos a aguas (de distintos tipos) hasta tejidos animales y vegetales. Crecen a temperaturas entre 4-42 °C, y a pH entre 4 y 8, y pueden utilizar compuestos orgánicos simples o complejos como nutrientes. En la naturaleza viven como bacterias saprófitas (se alimentan de materia orgánica en descomposición) y parásitas. Se han aislado *Pseudomonas* de aguas minerales oligotróficas e incluso se las ha encontrado en el agua que corre por las cañerías para consumo humano, y formando biofilms en las mismas. Si bien siempre se estudia su forma planctónica, en su hábitat natural pueden formar biofilms ya sean pequeños o extensos (Moore et al., 2006).

Muchas especies del género presentan características que permiten su utilización como agentes de biocontrol de patógenos de plantas y como promotores del crecimiento vegetal. Hay un amplio rango de compuestos bioactivos que son producidos por las especies de *Pseudomonas*, entre ellas antibióticos y sideróforos (Weller, 2007; Raaijmakers, Paulitz et al., 2008).

Desde un punto de vista antropogénico, las *Pseudomonas* tienen relevancia a nivel industrial ya que causan el deterioro de alimentos (carne roja, pollo y pescado) aunque estos se encuentren refrigerados (Moore et al., 2006). A nivel de la salud humana, pueden causar foliculitis, infección de heridas quirúrgicas, queratitis, otitis externa en pacientes sanos y con neumonía, bacteriemia, endocarditis, neumonía, meningitis e infecciones urinarias complicadas en

## Introducción

---

pacientes inmunodeprimidos. Estos microorganismos se encuentran frecuentemente formando biofilms, que los protegen de los antibióticos y células inflamatorias, y donde se ve favorecida la diseminación de genes relacionados con la resistencia a antibióticos (Brüssow, 2012). Entre los patógenos humanos oportunistas, *Pseudomonas aeruginosa* es el más común en infecciones nosocomiales (Van Delden & Iglewski, 1998).

Estas bacterias cosmopolitas han sido aisladas de ambientes fríos incluyendo la Antártida (Shivaji et al., 1989; Reddy, 2004; Bozal et al., 2007; Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011).

### **V. El género *Janthinobacterium***

El género *Janthinobacterium* comprende bacterias Gram-negativas, con forma de bastón, generalmente móviles mediante flagelos, y estrictamente aerobias. Las bacterias de este género crecen a una temperatura óptima de 25 °C, siendo la máxima y la mínima 32 °C y 2 °C, respectivamente (Gillis & De Ley, 2006). Hasta el momento, se han descrito dos especies, *Janthinobacterium lividum* y *Janthinobacterium agaricidamnosum* (Lincoln et al., 1999). Si bien muchos aislamientos de *Janthinobacterium lividum* producen un pigmento violeta (violaceína), se han descrito otros que producen poca o ninguna pigmentación (Schloss et al., 2010). Son microorganismos que habitan suelos y aguas, principalmente de ambientes templados, y alimentos en descomposición (Gillis & De Ley, 2006). También se han aislado de ambientes fríos como ser zonas polares y glaciares (Schloss et al., 2010; Pesciaroli et al., 2011), incluyendo la Antártida (Shivaji et al., 1991; Tindall, 2004; Xiao et al., 2005; García-Echauri et al., 2011).

Se ha descrito para el género *Janthinobacterium* la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares como ser la quitinasa (Xiao et al., 2005),  $\beta$ -agarasa (Shi et al., 2008) y la quitosanasa (Johnsen et al., 2010). Con respecto a las proteasas, se ha descrito que una de las características de los microorganismos pertenecientes al género *Janthinobacterium* es la ausencia de proteasas extracelulares (Gillis & De Ley, 2006). Sin embargo, algunos investigadores han descrito la producción de

proteasas extracelulares por aislamientos de *Janthinobacterium* (Lucas et al., 2003; Bach et al., 2011) .

### **VI. Antecedentes del trabajo**

Nuestro laboratorio posee una colección de bacterias sicrofílicas y sicrotolerantes, productoras de proteasas extracelulares, aisladas de diferentes ambientes acuáticos antárticos. En dicha colección contamos con aislamientos pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Janthinobacterium*, y *Flavobacterium*. Los aislamientos de *Pseudomonas* y el único aislamiento de *Janthinobacterium* de nuestra colección crecen en un rango de temperatura comprendido entre los 4 °C y los 30 °C (los clasificamos como sicrotolerantes), mientras que los *Flavobacterium* crecen entre 4 °C y 20 °C (los clasificamos como sicrofílicos). Todos ellos producen enzimas proteolíticas extracelulares a 4 °C y 20 °C, pero no a 30 °C. Durante mi trabajo de grado se realizó el aislamiento de estas bacterias, su identificación y la caracterización parcial de las enzimas proteolíticas extracelulares que producían (Martínez Rosales & Castro Sowinski, 2011). Los aislamientos de *Pseudomonas* mostraron un tiempo de duplicación de 3, 2 y 15 h a 30 °C, 20 °C y 4 °C respectivamente, y alcanzaron una densidad óptica (D.O. entre 0,8 y 1,0) similar al momento de la fase estacionaria de crecimiento, a las tres temperaturas. Para el aislamiento de *Janthinobacterium* se observó el mismo tiempo de duplicación y la misma D.O. (0,75) al momento de las fase estacionaria para las tres temperaturas. Los aislamientos de *Flavobacterium* crecieron a 4 °C y 20 °C con un tiempo de duplicación de 25 y 13 h respectivamente, alcanzando también valores similares de D.O. en la fase estacionaria de crecimiento (Martínez-Rosales & Castro Sowinski, 2011). Las enzimas proteolíticas extracelulares producidas por los distintos aislamientos mantienen su actividad a 4 °C, 20 °C y 30 °C, aunque sólo se detectó su producción durante el crecimiento a 4 °C y 20 °C, en un medio de cultivo enriquecido con leche descremada. Para dos de los aislamientos de *Pseudomonas* y para el aislamiento de *Janthinobacterium* se pudo clasificar a las proteasas extracelulares producidas como serín proteasas, mediante ensayos de actividad enzimática con el agregado de inhibidores.

## Introducción

---

Se eligieron dos aislamientos psicrotolerantes de la colección para seguir trabajando, *Pseudomonas* sp. AU10 y *Janthinobacterium* sp. AU11. El aislamiento AU10 se seleccionó para estudiar los mecanismos de adaptación a las bajas temperaturas, y el aislamiento AU11 para estudiar la proteasa extracelular serínica activa a bajas temperaturas que produce, por el interés que presenta a nivel industrial este tipo de enzimas.

***HIPÓTESIS***  
***Y***  
***OBJETIVOS***

### ***HIPÓTESIS DE TRABAJO***

1. Como en otras bacterias sicrotolerantes, en *Pseudomonas* sp. AU10. también se induce la expresión de una serie de macromoléculas (proteínas, lípidos y carbohidratos) como forma de adaptación al crecimiento a bajas temperaturas.
2. Inducida por la presencia de proteínas lácteas, *Janthinobacterium* sp. AU11 produce durante su crecimiento a baja temperatura una proteasa extracelular serínica que es parte del repertorio proteico de la bacteria para la supervivencia en ambientes fríos.

# **OBJETIVOS**

### ***Objetivos generales:***

1. Identificar las proteínas, lípidos y carbohidratos (de exopolisacáridos) producidos diferencialmente por *Pseudomonas* sp. AU10 cuando crece a bajas temperaturas (4 °C comparado con 30 °C).
2. Identificar la proteasa extracelular producida por *Janthinobacterium* sp. AU11 a baja temperatura.

### ***Objetivos específicos:***

#### **Del objetivo general 1:**

1. Para la expresión diferencial de proteínas en *Pseudomonas* sp. AU10:
  - a. Obtener fracciones celulares puras de cultivos de *Pseudomonas* sp. AU10 crecidos a 4 °C y 30 °C.
  - b. Identificar las proteínas expresadas diferencialmente a 4 °C.
  - c. Identificar los genes codificantes para dichas proteínas.
  - d. Identificar al menos un promotor que se induzca a bajas temperaturas.
2. Para el análisis de lípidos en *Pseudomonas* sp. AU10:
  - a. Extraer los lípidos totales de cultivos de *Pseudomonas* sp. AU10 crecidos a 4 °C y 30 °C.
  - b. Analizar su composición relativa mediante cromatografía gaseosa.
3. Para el análisis de exopolisacáridos (EPS) en *Pseudomonas* sp. AU10:
  - a. Purificar por precipitación alcohólica y cuantificar la producción de EPS a 4 °C y 30 °C.
  - b. Identificar la composición relativa de monosacáridos de los EPS de alto peso molecular mediante cromatografía gaseosa.

## Hipótesis y Objetivos

---

### **Del objetivo general 2:**

1. Identificar por espectrometría de masas la proteasa extracelular producida por *Janthinobacterium* sp. AU11.
2. Identificar los genes codificantes para la(s) proteasa(s) serínicas de *Janthinobacterium* sp. AU11 utilizando cebadores degenerados

# ***CAPITULO I:***

## ***Expresión diferencial de proteínas, lípidos y exopolisacáridos en Pseudomonas sp. AU10***

# ***INTRODUCCIÓN***

Como se describió anteriormente, el crecimiento de bacterias a bajas temperaturas requiere de ciertas adaptaciones fisiológicas que abarcan desde modificaciones a nivel de la membrana celular hasta la producción de ciertas macromoléculas como polisacáridos que actúan como crioprotectores, y proteínas que reflejan cambios que se producen a nivel transcripcional y traduccional.

Entre los variados mecanismos que emplean las bacterias para crecer a bajas temperaturas, se eligieron tres moléculas (lípidos, proteínas y exopolisacáridos) para analizar en un aislamiento sicrotolerante antártico perteneciente a la colección del laboratorio (*Pseudomonas* sp. AU10). El objetivo era estudiar si existían diferencias en la expresión de estas macromoléculas cuando la bacteria crecía a 4 ° y 30 °C, y tratar de identificar alguna proteína de expresión diferencial no reportada aún, así como algún promotor cuya expresión se indujera a bajas temperaturas.

El análisis de la expresión diferencial de lípidos y exopolisacáridos se realizó creciendo cultivos de AU10 a 4 °C y 30 °C hasta fase exponencial, y purificando dichas macromoléculas para luego analizarlas mediante cromatografía gaseosa. En el caso de las proteínas, también se partió de cultivos de AU10 a las dos temperaturas, y se realizaron fracciones celulares que luego se enviaron a analizar mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masa MALDI-ToF. Las fracciones celulares se controlaron por electroforesis unidimensional desnaturante, se controló la pureza de las mismas con el ensayo de NADH oxidasa (se tiene que detectar actividad sólo en la fracción que contiene la membrana celular interna), y se realizó la cuantificación de las proteínas presentes en cada fracción.

Otro objetivo de este capítulo fue la identificación de al menos un promotor de expresión diferencial a bajas temperaturas, y para ello se eligió una de las proteínas que se sobreexpresaron a 4 °C y se realizó una PCR inversa empleando cebadores diseñados para un fragmento de la secuencia nucleotídica de la proteína.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### ***I. Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento***

Se trabajó con el aislamiento microtolerante de origen antártico: *Pseudomonas* sp. AU10 (Martínez-Rosales & Castro-Sowinski, 2011). Durante los diferentes ensayos, AU10 creció en medio de cultivo rico LB (Ver Anexo I), a 4 °C, 30 °C, o temperatura ambiente (18 °C – 23 °C) según el ensayo, con agitación (200 rpm) constante.

Los ensayos de transformación se realizaron en células de *Escherichia coli* DH5α [*hsdR17 endA1 thi-1 gyrA96 relA1 supE44 ΔlacU169 (φ80dlacZΔM15)*] (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). Las células de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37 °C y agitación (200 rpm).

### ***II. Expresión diferencial de proteínas de Pseudomonas sp. AU10 a 4 °C y 30 °C.***

La expresión diferencial de proteínas en el aislamiento antártico *Pseudomonas* sp. AU10 se estudió a través del análisis de las fracciones celulares de dos cultivos (uno crecido a 4 °C y otro a 30 °C), mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida y la identificación por espectrometría de masas de las proteínas de expresión exclusiva a bajas temperaturas.

#### ***1. Fraccionamiento celular***

Se realizaron dos cultivos de 200 ml de *Pseudomonas* sp. AU10 en medio rico LB (ver Anexo I), partiendo del mismo preinóculo crecido a temperatura ambiente, a una D.O. inicial a 600 nm de 0,01. Se incubaron a 30 °C y 4 °C con agitación constante (200 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron una D.O. a 620 nm de 0,8, lo que correspondería a la fase exponencial tardía de crecimiento (37 hs para el

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

---

cultivo a 30 °C, y 120 h para el cultivo a 4 °C), se centrifugaron a 4 °C durante 5 min a 7.000 rpm. El “pellet” celular se lavó dos veces con “buffer” fosfato 100 mM, pH7 (ver Anexo II). Tras cada lavado se centrifugó durante 5 min a 7.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se determinó el peso húmedo celular (biomasa).

Las diferentes fracciones celulares se obtuvieron siguiendo el protocolo modificado de Williams y col. (2010). Los “pellets” celulares se lavaron con 100 ml (50% de volumen respecto al volumen original del cultivo) de una solución fría de sacarosa 20%. Las células se resuspendieron en 18 ml de sacarosa 20% fría por cada 1,5 g de biomasa. A continuación, se agregaron (por cada 1,5 g de biomasa): 9 ml de sacarosa 2 M, 10 ml de Tris 0,1 M pH 7,8, y 1,8 ml de lisozima 0,5% (p/v). Se mezcló suavemente y se incubó durante 30 min a 30 °C. Luego se agregaron 800 µl de EDTA 150 mM y se incubó otros 30 min a 30 °C. Se centrifugó durante 20 min a 20.000 g y 4 °C. El sobrenadante, conteniendo la fracción de membrana externa y periplasma, se transfirió a un nuevo tubo y se almacenó a -20 °C.

El “pellet” (esferoplastos, conteniendo la fracción de membrana interna y citoplasma) se lavó con una solución fría de sacarosa 20% y se centrifugó durante 20 min a 20.000 g y 4 °C. Se resuspendió el “pellet” en “buffer” de urea (5 ml/g de “pellet”) (ver Anexo II para composición), al cual se agregó inhibidor de proteasas (1 pastilla/20 g de extracto celular; SIGMAFAST Protease Inhibitor Tablets, SIGMA, N° Cat. S8820). El contenido de los esferoplastos se obtuvo mediante sonicado (4 ciclos de 1 min cada uno, amplitud 20%), evitando la formación de espuma (desnaturalización de proteínas) y siempre en hielo. La fracción conteniendo las proteínas de membrana interna y citoplasma se almacenó a -20 °C.

Se realizaron 3 réplicas biológicas independientes para cada condición.

### **Controles realizados sobre las fracciones de proteínas**

Todas las fracciones se controlaron por electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y determinando la actividad NADH oxidasa para verificar la pureza de las fracciones obtenidas. Además, se determinó la concentración de proteínas de cada fracción.

#### **A. Electroforesis – SDS-PAGE**

Como primera aproximación a la visualización del patrón diferencial de bandas proteicas de las fracciones celulares de los cultivos a diferentes temperaturas, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizaron en geles de poliacrilamida al 5% para el gel concentrador y al 12% para el gel separador (Anexo IV), con un voltaje de 70 V hasta que el frente de corrida llegó al gel separador, y luego a 120 V hasta que el frente de corrida alcanzó el final del gel. Se utilizó como “buffer” de corrida Tris-glicina pH 8,3 (Anexo II). Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomassie R250 al 0.1% (Anexo IV). A continuación se hicieron varios lavados con solución decolorante (Anexo IV). Se utilizó como marcador de peso molecular el producto “Prestained Protein Molecular Weight Marker” de Fermentas (Nº Cat. SM0441). Este protocolo empleado fue tomado de Sambrook y col. (1989).

#### **B. Actividad NADH oxidasa**

Para verificar la pureza de las fracciones proteicas se determinó la actividad NADH oxidasa siguiendo la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup> por espectrofotometría, siguiendo en el tiempo el cambio en la absorción a 340 nm. Se midió la actividad NADH oxidasa para cada una de las réplicas de las diferentes fracciones celulares de *Pseudomonas* obtenidas a ambas temperaturas de crecimiento. Para cada réplica se realizaron tres repeticiones.

La actividad se midió a temperatura ambiente, utilizando la siguiente mezcla de reacción: 850 µl de “buffer” Tris 0,5 M pH 7,6 (Anexo II), 100 µl de NADH 1,25

mM (coeficiente de absortividad molar,  $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), y 80  $\mu\text{l}$  y 100  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático (fracción celular). Se utilizaron dos cantidades de extracto enzimático para determinar la linealidad del método. Se definió una unidad de enzima (U) como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto en las condiciones del ensayo. Se calculó la Actividad (U/ml) y la Actividad Específica (U/mg de proteína total).

### **C. Determinación de proteínas y preparación de muestras para electroforesis bidimensional**

Se determinó la concentración de proteínas en cada muestra empleando el kit comercial “2D-Quant kit” (GE Healthcare), y siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se purificó un volumen equivalente a 50  $\mu\text{g}$  de proteínas de cada muestra, utilizando el kit comercial “2D-Clean Up kit” (GE Healthcare), según instrucciones del fabricante. Finalmente, cada muestra fue resuspendida en 125  $\mu\text{l}$  de “buffer” de rehidratación (ver Anexo II) con DTT 17 mM, para su posterior análisis en electroforesis 2D.

## **2. Electroforesis bidimensional y espectrometría de masa**

Las muestras de cada fracción se enviaron al servicio de la “Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica” (UBYPA) del *Instituto Pasteur* de Montevideo, para su análisis mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida. A continuación se describe brevemente el procedimiento empleado.

Para el isoelectroenfoque (IEF) (primera dimensión) se cargaron 50  $\mu\text{g}$  de cada muestra en tiras con un gradiente de pH no lineal de 3-11. La segunda dimensión (SDS-PAGE) se realizó en geles de poliacrilamida al 12,5%, de 10 cm x 10 cm x 0,1 cm. Como marcador de peso molecular (MPM) se utilizó “Low Molecular Calibration Kit for SDS Electrophoresis” (Amersham). Finalmente, los geles se tiñeron con Azul de Coomasie coloidal. Se realizaron 3 réplicas independientes de cada electroforesis bidimensional.

Aquellos “spots” que por análisis visual se detectaron sólo en las fracciones de los cultivos crecidos a 4 °C se enviaron a analizar por Espectrometría de Masa MALDI-ToF (EM MALDI-ToF). Este análisis también se realizó en el servicio de UBYPa. El mapeo peptídico de las proteínas seleccionadas se realizó mediante digestión trípica y determinación del espectro de masas en el equipo 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) en modo reflector y se calibraron usando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems). Para algunos péptidos también se realizó un análisis de disociación MS/MS por colisión.

Los péptidos obtenidos se compararon con la base de datos NCBI nr empleando el programa MASCOT.

### ***III. Identificación de los genes que codifican para las proteínas identificadas***

A partir de las secuencias aminoacídicas de los péptidos identificados por EM MALDI-ToF, se diseñaron cebadores degenerados y se utilizaron para la identificación de parte de la secuencia de los genes codificantes. Los cebadores se diseñaron y analizaron mediante el programa Gene Runner 3.05 ([www.generunner.net](http://www.generunner.net)), y en el servicio de “oligo analyzer” de la página web de IDT (Integrated DNA Technologies; [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). La secuencia de los cebadores se detalla en la Tabla 6. En algunos casos, se diseñaron dos juegos de cebadores.

La mezcla para la reacción de PCR contenía en 20 µl: 2 µl de “buffer” 10X (Tris-HCl 100 mM, KCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM, pH 9,0) (SBS Genetech Co., Ltd), 2 µl de dNTPs 2 mM (concentración de cada desoxi-ribonucleótido), 2 µl de cada cebador en concentración 10 µM, 0,2 µl de U-Taq Polimerasa (SBS Genetech Co., Ltd; 5 unidades/µl), 1 µl de ADN genómico (ADNg; obtenido siguiendo las instrucciones del Kit “Vivo Science”), y 10,8 µl de agua bidestilada, estéril, apirógena, para inyectables.

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

**Tabla 6.** Cebadores degenerados utilizados para la identificación de los genes de expresión diferencial.

Nombre	Secuencia	Tm Promedio	Tamaño esperado del fragmento (pb)	Secuencia a amplificar
Spot1F	5' cay car acn mgn tay tgg aay ccn aa 3'	58,8 °C	607	Proteína S2 (sub. Rib. 30S)
Spot1R	5' c rtc ngc cat nsw ncc cat rta 3'	57,9 °C		
Spot2F1	5' tty tay cay gar tgg ggn tay ca 3'	55,7 °C	545 / 341	Proteína hipotética de <i>Azoarcus</i>
Spot2F2	5' cay gar tgg ggn tay car mg 3'	55,5 °C		
Spot2R1	5' nar nsw rtc ncc raa raa 3'	49,1 °C		
Spot2R2	5' nsw ytg rta ncc ytc cca nac 3'	55,7 °C		
Spot5F1	5' aay ytn wsn car gay gay aa 3'	50,2 °C	299 / 258	Regulador transcripcional hipotético
Spot5F2	5' acn gar ytn gar tty gar gg 3'	53,5 °C		
Spot5R1	5' nar ngt ngc cca ncc ytc 3'	56,7 °C		
Spot5R2	5' ytc nac nac rtc ncc ncc cc 3'	60,9 °C		
Spot6F1	5' tty acn car ggn ccn gcn gc 3'	53,0 °C	431 / 622	Proteína L1 (sub. Rib. 50S)
Spot6F2	5' gcn tay aay tty gtn gay gc 3'	51,9 °C		
Spot6R1	5' ncc ngg ncc cat ngt ngt 3'	59,6 °C		
Spot6R2	5' ccy tgr tcd atn acn arn cc 3'	53,6 °C		
Spot16F	5' ggn ggn tay ggn mgn gar gg 3'	61,2 °C	1004	Proteína de eflujo Tol C
Spot16R	5' ngc ngt raa nar ytc rtt ytc 3'	52,7 °C		
Spot17F	5' ggn gay car tay acn acn gc 3'	55,4 °C	635	Proteína hipotética
Spot17R	5' ngt ngc cat rtt nar rtc rta 3'	51,9 °C		
Spot18F1	5' car aay ggn acn gcn gay yt 3'	56,7 °C	418 / 351	Transportador ABC
Spot18F2	5' acn acn aay aay gcn gar mg 3'	54,3 °C		
Spot18R1	5' cat rca ngc rta ngc ytc raa 3'	55,7 °C		
Spot18R2	5' ncc ngt dat nac cca rtc rtc 3'	55,6 °C		
SpotAF	5' gay gcn car gay ggn ccn atg 3'	60,7 °C	968	Factor de elongación hipotético
SpotAR	5' nck nar ncc cat ytc ytc cat 3'	56,5 °C		
SpotBF1	5' tty gcn gar ytn tty gar ga 3'	53,2 °C	878 / 995	Proteína S1 (sub. Rib. 30S)
SpotBF2	5' ath gay tay car gcn mgn tgg 3'	55,3 °C		
SpotBR1	5' ytc ngc raa rca ncc rta rtc 3'	55,8 °C		
SpotBR2	5' ytg ncc nsw raa rtc ytc cc 3'	56,3 °C		
SpotCF	5' cay acn ggn gcn tay gar ac 3'	55,7 °C	913	NusA, proteína de unión a la ARN polimerasa
SpotCR	5' tc ncc ngt ytc ngc ytg ytg 3'	60,0 °C		
SpotDF1	5' tn aay gar tty ytn acn cc 3'	48,6 °C	701 / 626	Sub. α de la ARN polimerasa
SpotDF2	5' ggn cay acn ytn ggn aay gc 3'	57,7 °C		
SpotDR1	5' ngg ytc nsw rtc ncc ytt 3'	55,3 °C		
SpotDR2	5' ytg ytc dat nac nac ngg ytc 3'	54,8 °C		
SpotEF	5' gay ccn gcn tty car aay cc 3'	56,3 °C	475	Carbamato Quinasa
SpotER	5' gc raa ytc rca ngc ngc ytg nac 3'	62,5 °C		
SpotFF	5' gar gar atg ggn rth gar aay atg gc 3'	58,3 °C	961	Factor Rho
SpotFR	5' cc ngt ncc ytt raa ytc ytc rta 3'	55,5 °C		

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

---

Las condiciones de ciclado se determinaron según el tamaño del fragmento esperado (1 min de elongación por kb), y la  $T_m$  de los cebadores (teóricamente, 5 °C debajo de la  $T_m$  para la hibridación de cebadores). Las condiciones fueron las siguientes:

- Para los “spots” 1, 16, 17, A, B, C, y F: 5 min de desnaturalización inicial a 96 °C, 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 1 min, hibridación de cebadores a 55 °C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min; y se finalizó con un paso de extensión durante 5 min a 72 °C.
- Para los “spots” 2 y 5: una desnaturalización inicial a 96 °C durante 5 min, a continuación 30 ciclos de desnaturalización a 96 °C durante 1 min, hibridación de cebadores a 50 °C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 30 seg. Finalmente se realizó una etapa de extensión a 72 °C durante 5 min.
- Para los “spots” 6 y 18: se comenzó con una etapa de desnaturalización inicial a 96 °C durante 5min, luego 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 96 °C, 1 min de hibridación a 55 °C, y 30 seg de extensión a 72 °C. Se culminó con una etapa de extensión a 72 °C durante 5 min.
- Para el “spot” D: una primera etapa de desnaturalización durante 5 min a 96 °C, 30 ciclos de desnaturalización por 1 min a 96 °C, unión de cebadores a 50 °C por 1 min, y extensión a 72 °C por 1 min. Finalmente una última fase de extensión a 72 °C durante 5 min.

La presencia de los fragmentos de amplificación se confirmó analizando la mezcla de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 0,5X (ver Anexo II). La visualización de los fragmentos se realizó mediante la adición al gel de GoldView (SBS; 1  $\mu$ l/50 ml de agarosa) y exposición a luz UV.

Tras ser purificados utilizando el kit “QIAquick gel extraction kit” (QIAGEN Nº Cat. 28704), los productos de amplificación se clonaron en vectores con extremos T, para su transformación en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes (Anexo VI), selección de clones transformados, posterior preparación de ADN plasmídico y secuenciación de los fragmentos clonados.

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

---

Como en algunos casos los fragmentos de amplificación estuvieron almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por varias semanas, se procedió con el siguiente protocolo para adicionar adeninas a los extremos de los fragmentos, y así asegurarnos de que éstos fueran clonados en plásmidos T (contiene extremos 3' cohesivos con una sola base que es un residuo de timidina). Se incubaron  $30\text{ }\mu\text{l}$  de producto de PCR purificado con  $0,25\text{ }\mu\text{l}$  de U-Taq polimerasa (SBS; 5 unidades/ $\mu\text{l}$ ), y  $3\text{ }\mu\text{l}$  de dATP 2 mM, durante 1 h a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

A continuación, los fragmentos se clonaron empleando el kit comercial “InsTAclone™ PCR Cloning Kit” (Fermentas, N° Cat. K1214). La reacción se llevó a cabo incubando  $4,5\text{ }\mu\text{l}$  de producto de PCR con  $1,5\text{ }\mu\text{l}$  del vector pTZ57R/T,  $3\text{ }\mu\text{l}$  de “buffer” de ligación, y  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  de ligasa T4. Se incubó la reacción de ligación durante 1 h a temperatura ambiente, y luego toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . La transformación se llevó a cabo mezclando  $50\text{ }\mu\text{l}$  de células competentes (Anexo VI) con  $5\text{ }\mu\text{l}$  de mezcla de ligación. También se realizó un control transformando con vector sin inserto. Se incubó la mezcla 30 min en hielo, luego se realizó el “shock” térmico de la siguiente forma: 90 seg a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y luego 2 min en hielo. A continuación se agregó a la mezcla  $500\text{ }\mu\text{l}$  de LB y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación constante durante 1 h. Finalmente se sembraron  $50$  y  $100\text{ }\mu\text{l}$  de la mezcla de transformación en LB sólido con Ampicilina ( $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), XGAL ( $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ ) e IPTG ( $40\text{ }\mu\text{g/ml}$ ), y se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los clones positivos (aquellos que incorporaron el vector con el inserto) se seleccionaron en base a la coloración blanca de las colonias, y se comprobó la presencia del inserto mediante amplificación por PCR (utilizando lisados celulares como templado de ADN y los cebadores correspondientes al fragmento clonado). Las condiciones de ciclado fueron las mismas descritas anteriormente. Una vez seleccionado el clon que poseía el inserto, se realizaron minipreparaciones del plásmido con el kit “Plasmid Mini Prep” de BIORON (N° Cat. 806942), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido se envió a la empresa MacroGen en Corea para la secuenciación del inserto en ambos sentidos con los cebadores universales M13F (5' GTAAACGACGGCCAGT 3') y M13RpUC (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3').

Las secuencias nucleotídicas se editaron mediante análisis visual del cromatograma, y se reconstruyó el fragmento de ADN amplificado a partir de la secuenciación en ambos sentidos. Una vez obtenida las secuencias reconstruidas, se contrastaron con la base de secuencias no redundantes del “National Center for Biotechnological Investigation” (NCBI), utilizando el programa “BLASTn” y “BLASTx” ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)) para buscar secuencias de alta similitud.

#### ***IV. Expresión de la enzima Carbamato Quinasa mediante RT-PCR***

La expresión de la enzima Carbamato Quinasa (CQ; detectada sólo en los cultivos de *Pseudomonas* sp. AU10 a 4 °C) se analizó mediante RT-PCR, utilizando cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas con los cebadores degenerados. La RT-PCR se realizó a partir de ARN extraído de cultivos de *Pseudomonas* sp. AU10, crecidos a 4 °C y 30 °C en medio LB hasta fase estacionaria, utilizando el kit “ZR Fungal/Bacterial RNA MiniPrep” (Zymoresearch, N° Cat. R2010), según las indicaciones del fabricante. El ARN extraído se almacenó a -80 °C.

A partir del ARN se realizó la retrotranscripción (RT), utilizando el cebador reverso específico para el gen de la CQ. Para diseñar los cebadores se utilizó el programa Gene Runner 3.05, y los oligonucleótidos obtenidos se describen más adelante, en la Tabla 7.

Como controles se realizaron una RT sin agregado de la enzima Retrotranscriptasa, y otra con un cebador para el gen del ARNr 16S (cebador 1401R: 5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3').

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con la enzima del kit “SuperScript III™” (Invitrogen, N° Cat. 18080-044) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para un volumen final de reacción de 20 µl se realizó la siguiente mezcla: 2 pmol del cebador reverso para el gen de la CQ, 5 µl de ARN total, 1 µl de

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

dNTPs 10 mM, agua ultrapura estéril hasta completar 20 µl de volumen. Esta mezcla se calentó a 65 °C por 5 min y se incubó en hielo durante al menos 1 min. Se centrifugó brevemente para coleccionar todo el contenido y se agregó: 4 µl de “First-Strand Buffer” 5X, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de inhibidor de RNasa “RNase OUT™” (Invitrogen, N° cat. 10777-019), y 1 µl de SuperScript™ III RT (200 unidades/µl). Se mezcló bien mediante “pipeteo” suave, y se incubó a 55 °C durante 1 h. Finalmente, la reacción se detuvo incubando a 70 °C durante 15 min.

Una vez obtenido el ADNc, éste se usó como molde en una reacción de PCR con los cebadores específicos para la CQ (tamaño esperado del fragmento: 615 pb), y los cebadores para el ARNr 16S para el control positivo y normalización. Para amplificar el gen que codifica para el ARNr 16S se empleó un par de cebadores (1401R y 784F) que permiten amplificar un fragmento de 617 pb del gen ribosomal. La secuencia de los cebadores así como su T<sub>m</sub> se indican en la Tabla 7. El programa de ciclado comenzó con una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C durante 2 min, luego 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 seg, hibridación de cebadores a 57 °C durante 50 seg, y extensión a 72 °C durante 1 min. Finalmente una última etapa de extensión a 72 °C durante 1 min.

**Tabla 7.** Cebadores empleados en la RT-PCR para los genes ARNr16S y CQ.

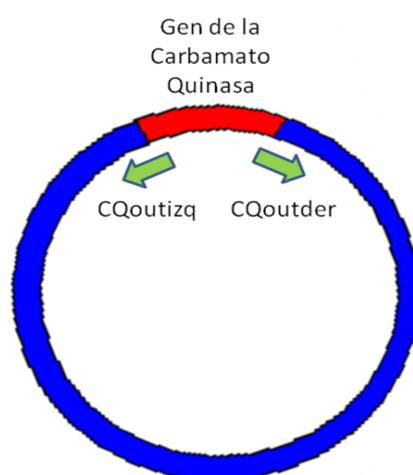
NOMBRE	SECUENCIA 5' – 3'	T <sub>m</sub> (°C)
<b>1401R</b>	CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG	82,3
<b>784F</b>	AAACAGGATTAGATACCC	49,3
<b>CQinF</b>	AACGACGGCCAGTGAATTCGAG	60,0
<b>CQinR</b>	TGACCATGATTACGCCAAGCTC	56,5

### V. *Identificación de la secuencia promotora del gen de la Carbamato Quinasa*

En base a la secuencia nucleotídica obtenida para el gen correspondiente a la enzima CQ, se diseñaron cebadores específicos (Tabla 8) dirigidos hacia afuera del gen (Fig.6), para ser utilizados en reacciones de PCR inverso (PCRi). Los mismos se diseñaron utilizando el programa Gene Runner.

**Tabla 8.** Cebadores específicos para las reacciones de PCRi.

NOMBRE	SECUENCIA 5' – 3'	Tm (°C)
<b>CQoutIZQ</b>	TTTACAACGTCGTGACTGGG	50,9
<b>CQoutDER</b>	TGTGAAATTGTTATCCGCTCAC	52,0



**Fig. 6** Esquema mostrando la ubicación y el sentido de los cebadores diseñados para el PCRi. En rojo se muestra el gen de la CQ, y en verde, los dos cebadores, el izquierdo y el derecho.

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

---

Se digirió el ADNg de *Pseudomonas* sp. AU10 con varias enzimas de restricción, seleccionadas en base a que no presentaran sitios de corte dentro del gen, en la región donde se pegan los cebadores. Las enzimas seleccionadas fueron: *BclI* (Fermentas), *NotI* (Fermentas), *Pdml* (Fermentas), y *XhoI* (Fermentas). Para las condiciones de digestión se siguieron las instrucciones del fabricante, llevándose a cabo la reacción en un volumen final de 20  $\mu$ l, de los cuales 2  $\mu$ l correspondían al “buffer” de cada enzima, 16  $\mu$ l a ADNg de *Pseudomonas* sp. AU10, y 2  $\mu$ l a la enzima de restricción. La digestión se realizó incubando durante 6 h a 37 °C, excepto para *BclI* donde se incubó a 55 °C. Las enzimas de restricción se inactivaron incubando la mezcla de restricción por 20 min a 65 °C. Las digestiones se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, (0,5  $\mu$ l de GoldView por cada 50 ml de agarosa) en buffer TAE 0,5X, a 100 V hasta que el frente de corrida llegó al final el gel. Se corrieron 3  $\mu$ l de las digestiones, y también se corrió 3  $\mu$ l del ADNg sin digerir.

A continuación se procedió a la ligación intramolecular de los fragmentos obtenidos luego de la digestión, utilizando la enzima ligasa T4 (BIORON, N° Cat. 402010). La reacción de autoligación se realizó en un volumen final de 100  $\mu$ l, de los cuales 79,5  $\mu$ l correspondían a agua ultrapura estéril, 10  $\mu$ l al buffer 10X de la ligasa T4, 0,5  $\mu$ l a la enzima ligasa T4, y 10  $\mu$ l a las digestiones. Se incubó la reacción durante 1 h a temperatura ambiente, y luego durante toda la noche a 4 °C. Se inactivó la reacción de ligación incubando a 65 °C durante 20 min, y finalmente se precipitó el ADN agregando acetato de sodio 3 M (concentración final de 0,3 M), y EtOH absoluto (volumen necesario para que la concentración final fuera 70%). Se mezcló y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C. Se centrifugó durante 15 min a 14.500 rpm, a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 500  $\mu$ l de EtOH 70%. El “pellet” se secó y se resuspendió en 25  $\mu$ l de agua ultra pura.

La mezcla de ligación intramolecular se empleó como molde en una reacción de PCR en la cual la mezcla de reacción fue la siguiente (para un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l): 6,8  $\mu$ l de agua bidestilada estéril, 2  $\mu$ l de “buffer” SBS 10X, 2  $\mu$ l dNTPs 2 mM, 2  $\mu$ l de cada cebador 10  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ l de U-Taq Polimerasa (SBS; 5

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

---

unidades/ $\mu\text{l}$ ), y 5  $\mu\text{l}$  de la mezcla de ligación. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, luego 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación de cebadores a 50 °C durante 1 min y extensión de la polimerasa a 72 °C durante 4 min. Se culminó con un ciclo de extensión a 72 °C durante 5 min.

El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, con el agregado de “GoldView”. Se sembraron 5  $\mu\text{l}$  de producto de PCR y 2,5  $\mu\text{l}$  del marcador de peso molecular 100 pb de BIORON. Para visualizar los productos de amplificación se expuso el gel a luz UV.

### **VI. *Análisis de exopolisacáridos***

Se partió de preinóculos de *Pseudomonas* sp. AU10 crecidos a temperatura ambiente hasta fase exponencial tardía, con los cuales se inocularon 2 matraces con 500ml de medio de cultivo. Uno se colocó a 4 °C y otro a 30 °C hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial tardía. Para la obtención de los EPS se comenzó centrifugando los cultivos a 10.000 rpm, durante 10 min, a 4 °C. Los “pellets” celulares se secaron a 65 °C hasta peso constante (biomasa) y se pesaron para determinar la cantidad de EPS por mg de biomasa.

El sobrenadante del cultivo se utilizó para la obtención de EPS por precipitación con tres volúmenes de EtOH 95% frío. Se dejó precipitar durante 48 hs a 4 °C. Pasado ese tiempo se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 min. El “pellet” de EPS se lavó con EtOH 70%, se dejó secar al aire y luego se resuspendió en 5 ml de agua ultra pura. Se determinó la cantidad de azúcares por el método de “anthrone” (Anexo V). A continuación, las soluciones con los EPS se dializaron utilizando membranas de diálisis de corte 10.000-12.000, durante 72 hs, reemplazando el agua de diálisis cada 12 hs. Finalmente se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C.

Se partió de 6 mg de EPS liofilizados para analizar la composición relativa de azúcares mediante Cromatografía Gaseosa (GC). El equipo utilizado fue un GC

Hewlett Packard HP 6860 series equipado con un detector de ionización de llama (FID). La columna empleada fue un capilar HP-5 (5% Fenil Metil Siloxano) de 30,0 m de longitud, diámetro interno de 250  $\mu\text{m}$  y espesor de película de 0,25  $\mu\text{m}$ . Este análisis se realizó en el Laboratorio de Carbohidratos del Departamento de Biotecnología del Instituto de Higiene. Para este ensayo se realizaron tres réplicas biológicas y técnicas.

### **VII. Análisis de lípidos**

A partir de preinóculos de *Pseudomonas* sp. AU10 crecida a temperatura ambiente se inocularon 250 ml de medio que fueron colocados a 4 °C y 30 °C hasta que AU10 alcanzó la fase exponencial tardía. En ese momento los cultivos se centrifugaron a 7.000 rpm durante 6 min, el sobrenadante se descartó, y los “pellets” se lavaron dos veces con buffer fosfato pH 7 (Anexo II).

El protocolo de obtención de lípidos empleado se basó en el utilizado por (Bligh & Dyer, 1959), con algunas modificaciones. Se partió de 400 mg de biomasa, que fueron resuspendidos en 600  $\mu\text{l}$  de agua ultra pura. Las células resuspendidas se transfirieron a un tubo de vidrio, en el cual se agregó 3,75 ml de una mezcla 1:2 (v/v) de  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Los tubos se pusieron a agitar (en agitador magnético) en hielo, durante 1 h. Luego se centrifugó durante 20 min a 4 °C. Se guardó el sobrenadante y se agregó al “pellet” 4,75 ml de la mezcla 1:2:0,8 (v/v) de  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{CH}_3\text{OH}$ :  $\text{HCl}$  0,2 N. Se mezcló por “pipeteo”, y a continuación se centrifugó por 20 min, se separó el sobrenadante y se lo mezcló con el sobrenadante anterior. A la mezcla de ambos sobrenadantes se agregó 2,5 ml de  $\text{CHCl}_3$  y se mezcló bien. Luego se agregó 2 ml de  $\text{KCl}$  0,1 M en  $\text{CH}_3\text{OH}$  50%, por las paredes del tubo. Tras unos segundos se observó la formación de dos fases, siendo en la inferior donde deberían encontrarse los lípidos. Para asegurar una extracción completa de los lípidos se incubaron los tubos durante toda la noche a 4 °C, para asegurar una buena separación de fases. Al día siguiente se descartó la fase superior con pipeta, y la fase inferior se traspasó a un nuevo tubo. La fase lipídica se secó con  $\text{N}_2$  gas.

## Capítulo 1 – Materiales y Métodos

---

Las muestras de lípidos secos, se enviaron al laboratorio de la Dra. S.M. Dardanelli de la Facultad de Ciencias Exactas Físicoquímicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, para ser metilados y luego analizados por GC.

Se realizaron tres réplicas biológicas y técnicas del ensayo.

## **RESULTADOS**

### ***I. Expresión diferencial de proteínas a baja temperatura en Pseudomonas sp. AU10***

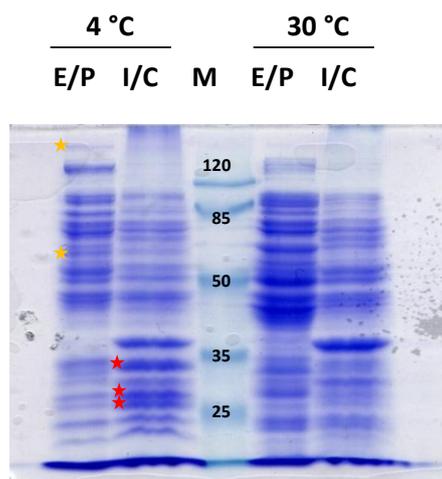
#### ***1. Fraccionamiento celular y controles de calidad***

Los extractos de proteínas de las diferentes fracciones celulares se obtuvieron tal cual se indicó en Materiales y Métodos. Los mismos se controlaron midiendo su concentración de proteínas, determinando su perfil electroforético por SDS-PAGE y la actividad de NADH oxidasa.

#### ***A. Perfil electroforético, SDS PAGE***

Para realizar un análisis preliminar del perfil de proteínas presentes en cada fracción celular, las mismas se sometieron a electroforesis unidimensional desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). A pesar de ser una electroforesis unidimensional, se pudieron observar algunas diferencias en el patrón de bandas de las fracciones a distintas temperaturas, tanto en intensidad de bandas como en presencia/ausencia. En la Fig. 7 se muestra la imagen de uno de los geles realizados.

Para cada fracción, se observaron al menos tres bandas de clara diferencia entre los cultivos a 4 °C y a 30 °C. Debido a la diferencia en concentración de proteínas en la fracciones de membrana externa y periplasma (E/P) a 4 °C y 30 °C, no se pudieron comparar diferencias en intensidades de bandas, a menos que se tratase de una banda que estuviera mayormente representada.



**Figura 7.** SDS-PAGE de las fracciones celulares de *Pseudomonas* sp. AU10 a 4 °C y 30 °C. E/P: membrana externa y periplasma; I/C: membrana interna y citoplasma. M: marcador de peso molecular (se indica sobre las bandas el peso molecular en kDa). Con asteriscos se indican las diferencias más evidentes entre fracciones a distintas temperaturas.

### ***B. Actividad NADH oxidasa***

El ensayo de actividad de NADH oxidasa, descrito en Materiales y Métodos, permitió validar el fraccionamiento de proteína. Sólo se detectó actividad en las fracciones de membrana interna y citoplasma, para las tres réplicas biológicas, tanto a 4 °C como a 30 °C. Los valores obtenidos de actividad NADH oxidasa se detallan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Actividad NADH oxidasa de la fracción de membrana interna y citoplasma, a las temperaturas de crecimiento de 4 °C y 30 °C.

	30 °C		4 °C	
	Actividad (U/ml)	AE (U/mg)	Actividad (U/ml)	AE (U/mg)
R1 <sup>(a)</sup>	0,209	0,039	0,278	0,042
R2 <sup>(a)</sup>	0,341	0,017	0,300	0,027
R3 <sup>(a)</sup>	0,020	0,089 x 10 <sup>-2</sup>	0,164	0,012

<sup>(a)</sup> La letra R indica la réplica biológica

### **C. Concentración de proteínas.**

Se obtuvieron valores similares de concentración de proteínas para dos de las tres réplicas de la fracción de membrana externa y periplasma, cerca de 1 µg/µl, mientras que para una de las réplicas se obtuvo de tres a cinco veces más proteína (según la fracción) (Tabla 10). El método de fraccionamiento permitió obtener proteínas en cantidad suficiente para su análisis posterior, y de forma reproducible.

**Tabla 10.** Concentración de proteínas de las fracciones celulares de *Pseudomonas* sp. AU10 crecida a 4 °C y 30 °C

FRACCIÓN CELULAR <sup>(a)</sup>	RÉPLICA	CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS ( µg/µl)
ME + P a 4 °C	R1	3,49
	R2	0,92
	R3	0,82
ME + P a 30 °C	R1	5,46
	R2	0,86
	R3	0,97
MI + C a 4 °C	R1	5,22
	R2	11,94
	R3	9,61
MI + C a 30 °C	R1	5,37
	R2	21,05
	R3	22,49

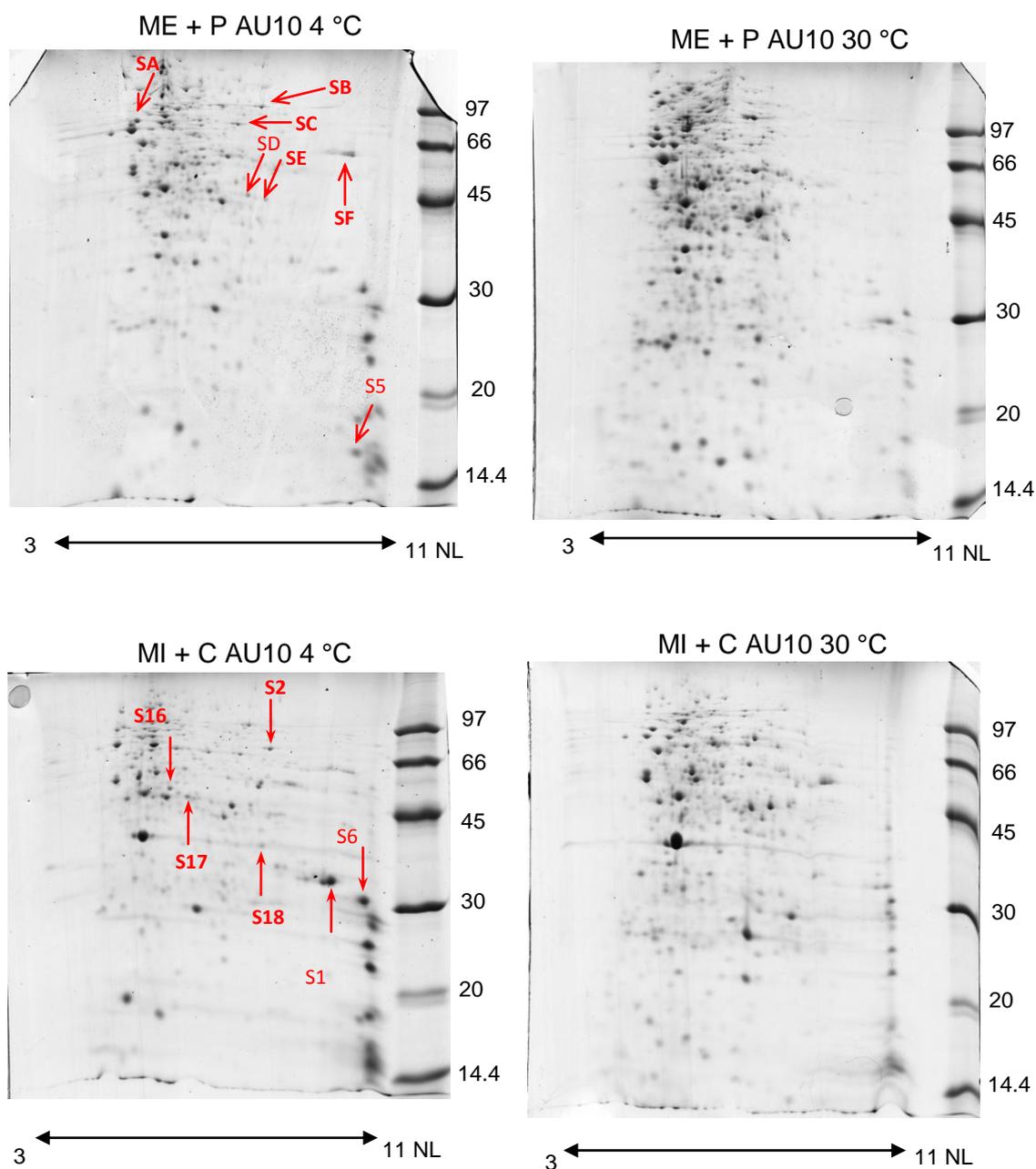
<sup>(a)</sup> ME + P significa membrana externa y periplasma; MI+ C, significa membrana interna y citoplasma.

### ***2. Electroforesis bidimensional***

Se realizaron electroforesis bidimensionales en geles de poliacrilamida donde se resolvieron las dos fracciones celulares de *Pseudomonas* sp. AU10 obtenidas a 4 °C y 30 °C (Fig. 8). La comparación visual de los geles reveló al menos dieciséis “spots” de proteínas presentes en las fracciones provenientes de cultivos crecidos a 4 °C que no estaban presentes en las fracciones de cultivos a 30 °C. De éstos, cuatro se encontraban en la fracción de membrana externa y periplasma, y doce en la fracción de membrana interna y citoplasma (Fig. 8).

Los dieciséis “spots” seleccionados se identificaron por Espectrometría de Masa MALDI ToF (EM-MALDI ToF). Los péptidos obtenidos tras el análisis de los “spots” se compararon con las bases de datos de proteínas utilizando el programa de búsqueda “Mascot”. Este trabajo fue realizado por el servicio de UByPA del *Instituto Pasteur* de Montevideo. De las dieciséis proteínas de expresión diferencial a 4 °C, doce presentaron identidad de secuencia alta con proteínas de *Pseudomonas* presentes en las bases de datos (NCBIInr), y una presentó identidad de secuencia alta con péptidos de una proteína hipotética de *Azoarcus* sp. BH72. El resto no presentó homología con proteínas presentes en la base de datos.

La comparación de las secuencias reveló que varias de las proteínas identificadas estaban relacionadas con los procesos de transcripción, traducción, metabolismo general y transporte de solutos (Tabla 11).



**Figura 8.** Electroforesis bidimensional de las fracciones celulares de *Pseudomonas* sp, AU10. Sólo se muestran los geles de una de las réplicas. A la izquierda se muestran los geles para las fracciones del cultivo a 4 °C, y a la derecha para las fracciones a 30 °C. Las dos imágenes superiores corresponden a los geles de Membrana Externa y Periplasma (ME + P), y los inferiores a los de Membrana Interna y Citoplasma (MI + C). Se indican con flechas los “spots” que se identificaron como diferenciales en las fracciones a 4 °C. A la derecha de cada gel se muestran los tamaños en kDa de cada banda del marcador de peso molecular.

## Capítulo I- Resultados

**Tabla 11.** Proteínas de expresión diferencial a 4 °C identificadas en *Pseudomonas* sp. AU10, agrupadas según criterios funcionales.

GRUPO	PROTEÍNA <sup>(a)</sup>
Transcripción	Factor de elongación hipotético/ proteína de unión a GTP TypA/BipA [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (SA)
	Factor terminador de la transcripción Rho [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (SF)
	Factor de elongación de la transcripción NusA [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (SC)
	Subunidad $\alpha$ de la ARN polimerasa [ <i>P. syringae</i> pv. tomato str. DC3000] (SD)
	Regulador transcripcional hipotético [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (S5)
Traducción	Proteína S1 de la subunidad ribosomal 30S [ <i>P. fluorescens</i> Pf-5] (SB)
	Proteína S2 de la subunidad ribosomal [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (S1)
	Proteína L1 de la subunidad ribosomal 50S [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (S6)
Metabolismo	Carbamato Quinasa [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (SE)
Transporte	Proteína de secreción tipo I de membrana externa, Tol C [ <i>P. fluorescens</i> Pf0-1] (S16)
	Proteína periplásmica de unión a un transportador ABC glutamato/aspartato [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (S18)
Otros	Proteína hipotética, no peptidasa de la familia S43 [ <i>P. fluorescens</i> SBW25] (S17)
	Proteína hipotética azo3598 [ <i>Azoarcus</i> sp. BH72] (S2)

<sup>(a)</sup> Se indica entre paréntesis, junto al nombre de la proteína, el nombre asignado al “spot” identificado en el gel.

### **3. Identificación de los genes codificantes**

En base a la secuencia aminoacídica de los péptidos identificados, se diseñaron cebadores degenerados para la identificación de los genes codificantes correspondientes. Se trabajó sólo con las doce proteínas efectivamente identificadas.

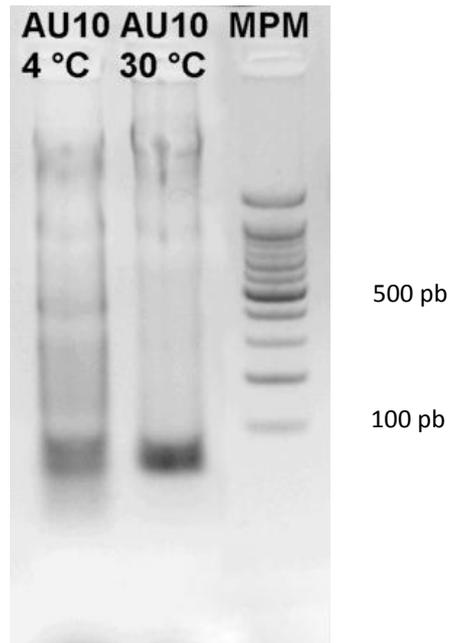
Se obtuvo amplificación para siete de las doce proteínas, y los fragmentos obtenidos se enviaron para ser secuenciados por el servicio de Macrogen en Corea. La comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante “BLASTn” y “BLASTx” permitió identificar parte de la secuencia génica correspondiente a las siete proteínas, que coincidió con lo obtenido previamente mediante espectrometría de masa. Se diseñaron luego cinco nuevos juegos de cebadores degenerados para las muestras que no produjeron fragmentos de amplificación, pero nuevamente no fue posible obtener amplificación.

### **4. Expresión de Carbamato Quinasa a bajas temperaturas**

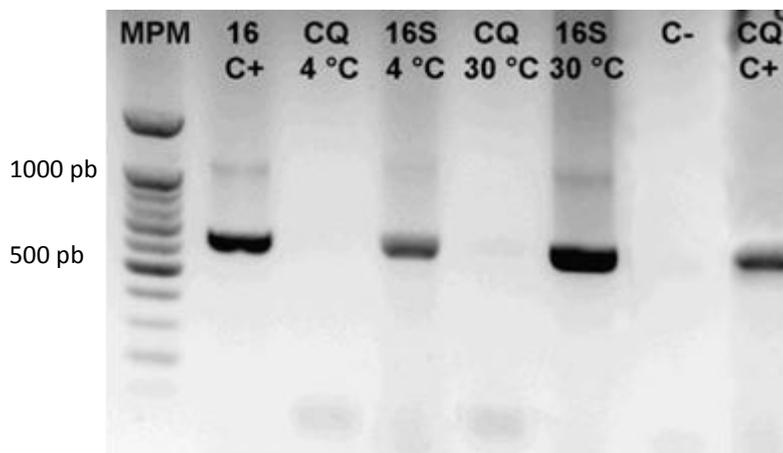
Una de las proteínas identificadas anteriormente fue elegida para analizar su expresión mediante RT-PCR, a baja y alta temperatura.

Se realizó la extracción de ARN total de dos cultivos de *Pseudomonas* sp. AU10, crecido a 4 °C y 30 °C hasta fase exponencial tardía, obteniéndose una muestra de ARN de aparente buena calidad y cantidad (Fig. 9). Ese ARN se utilizó como molde en una reacción de retrotranscripción de la cual se obtuvo el ADNc que se empleó como molde en una reacción de PCR con los cebadores específicos para la Carbamato Quinasa y el gen 16S.

En las condiciones ensayadas se detectó la presencia del mensajero para 16S (tamaño esperado de 617 pb); sin embargo, no fue posible detectar el mensajero correspondiente a la Carbamato Quinasa (tamaño esperado de 615 pb) (Fig. 10).



**Figura 9.** Electroforesis en agarosa 2% del ARN extraído de AU10 a 4 °C y 30 °C. Se corrió un marcador de peso molecular (MPM) de ADN para tener una referencia de tamaño.



**Figura 10.** Electroforesis en agarosa 1% de la RT PCR realizada para el gen de CQ y 16S, con el ADNc obtenido a partir de ARN extraído de cultivos de AU10 a 4 °C y 30 °C. Se hicieron controles positivos (C+) usando ADNc como molde tanto para el gen 16S como para el gen CQ. C- : control negativo, reacción sin agregado de ADN.

### **II. Identificación de la secuencia promotora de Carbamato Quinasa**

Para la identificación del gen completo y la secuencia promotora de la Carbamato Quinasa se utilizó la PCR inversa. En las condiciones ensayadas en este trabajo, no se pudo obtener una amplificación positiva de las secuencias de ADN flanqueantes a la secuencia del gen de la enzima Carbamato Quinasa.

### **III. Análisis de la producción de EPS por *Pseudomonas* sp. AU10 a 4°C y 30°C**

Se determinó la producción y composición relativa del EPS producido a 4 °C y 30 °C. La producción de los EPS por mg de biomasa reveló una relación de 2:1 de polisacáridos producidos a 4 °C respecto a los producidos a 30 °C (Tabla 12), sugiriendo que la producción de EPS es importante como mecanismo de adaptación de la bacteria al frío.

**Tabla 12.** Producción relativa de EPS por *Pseudomonas* AU10 a 4 °C y 30 °C.

Temperatura de cultivo	EPS producido (mg/g de biomasa) <sup>(a)</sup>
4 °C	53,5 ± 17,7
30 °C	30,0 ± 5,7

<sup>(a)</sup> Promedio de la cantidad de EPS producido para las tres repeticiones, con el desvío estándar.

Los resultados de la composición relativa de monosacáridos, analizados por GC se muestran en la Tabla 13. Aunque la tercera réplica no mostró un resultado consistente con las réplicas primera y segunda, es posible sugerir una tendencia en

## Capítulo I- Resultados

la composición del EPS. Se sugiere un aumento de ribosa (dos de tres réplicas), y una disminución de glucosa y manosa (dos de tres réplicas) a 4 °C. Sin embargo, estos resultados deberían ser verificados realizando nuevos ensayos de producción y caracterización de los EPS.

**Tabla 13** Composición relativa en monosacáridos de los EPS producidos a 4 °C y 30 °C.

	4 °C		30 °C	
	AZÚCARES TOTALES <sup>(b)</sup>	COMPOSICIÓN <sup>(c)</sup>	AZÚCARES TOTALES <sup>(b)</sup>	COMPOSICIÓN <sup>(c)</sup>
R 1 <sup>(a)</sup>	18,0%	0,68% Ribosa 14,6% Manosa 2,70% Glucosa	21,0%	0,20% Ribosa 17,00% Manosa 3,80% Glucosa
R 2 <sup>(a)</sup>	19,1%	0,63% Ribosa 15,6% Manosa 2,7% Glucosa	22,9%	0,77% Ribosa 17,20% Manosa 4,98% Glucosa
R 3 <sup>(a)</sup>	25,1%	3,73% Ribosa 17,8% Manosa 3,4% Glucosa	12,8%	0,00% Ribosa 10,40% Manosa 2,38% Glucosa

<sup>(a)</sup> La letra R representa la réplica biológica.

<sup>(b)</sup> Porcentaje promedio de tres réplicas técnicas.

<sup>(c)</sup> Porcentaje relativo promedio de tres replicas técnicas de los monosacáridos.

### IV. Análisis de lípidos

El análisis de los lípidos totales realizado mediante GC reveló un aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados respecto a los saturados a bajas temperaturas comparando con los ácidos grasos presentes a altas temperaturas (Tabla 14).

## Capítulo I- Resultados

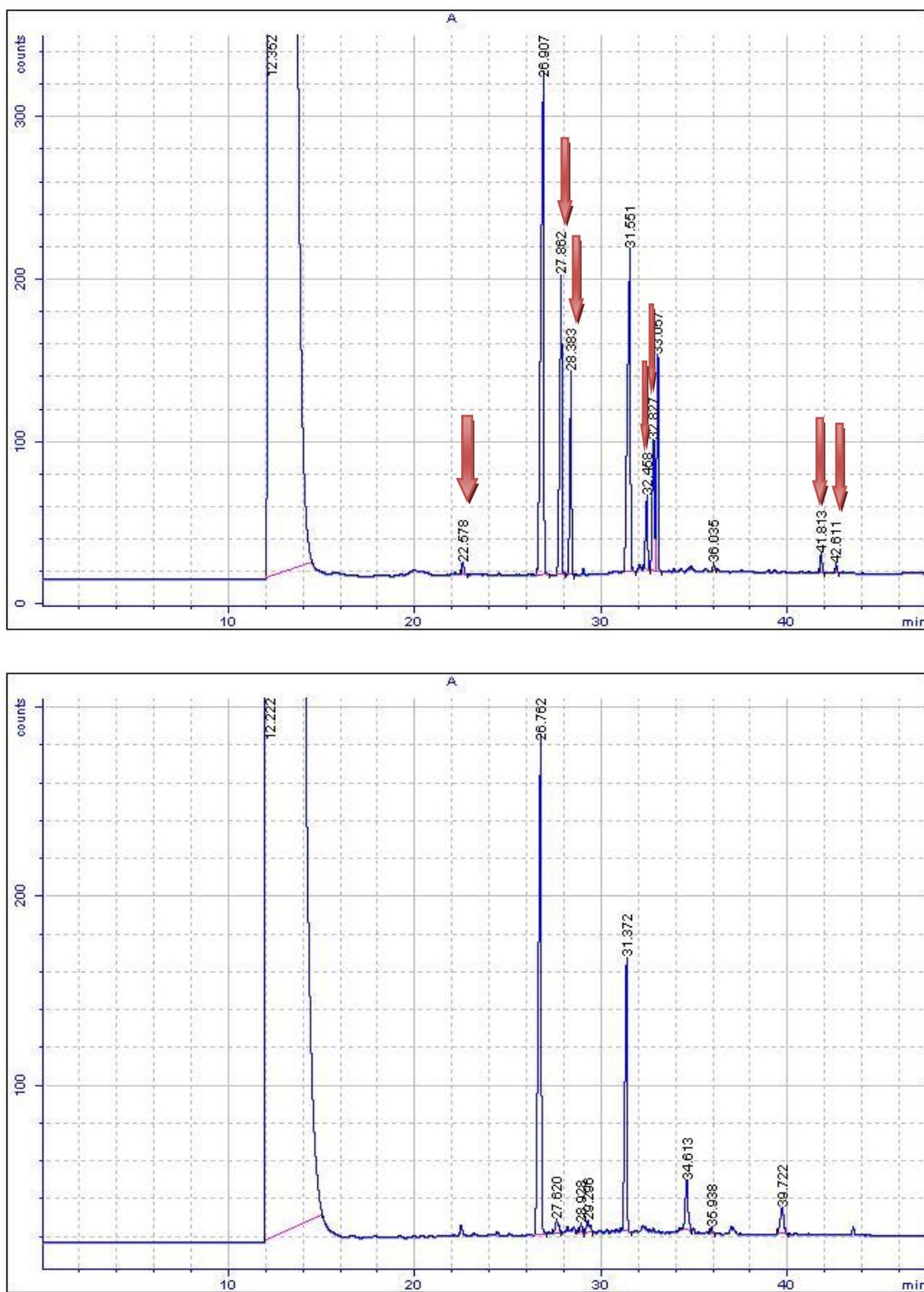
**Tabla 14.** Composición relativa promedio de lípidos.

Tiempo de retención (min)	Abreviación <sup>(a,b)</sup>	Ácido graso <sup>(a)</sup>	Porcentaje relativo a 4 °C	Porcentaje relativo a 30 °C
19,15	N.I.	N.I.	0,12	0,15
22,516	14:0	Ácido Mirístico	0,64	0,64
27,11	16:0	Ácido Palmítico	29,21	54,64
28,09	9c-16:1	Ácido Palmitoleico	19,07	2,15
28,59	9t-16:1	Ácido Palmitoleico	11,52	1,11
29,08	17:0	Ácido Margárico	0,175	2,76
31,78	18:0	Ácido Esteárico	16,85	19,30
31,91	N.I.	N.I.	0,07	-
32,69	9c-18:1	Ácido Oleico	3,81	1,35
33,3	9t-18:1	Ácido Elaidico	13,61	1,51
33,43	18:2	Ácido Linoleico	0,04	-
34,74	19:0	Ácido Nonadéclico	0,023	6,53
36,10	18:3	Ácido Linolénico	0,24	0,415
41,81	N.I.	N.I.	0,43	5,21
42,57	N.I.	N.I.	0,25	-
43,05	N.I.	N.I.	0,44	0,09

<sup>(a)</sup> N.I.: no se pudo identificar el ácido graso por falta del estándar correspondiente.

<sup>(b)</sup> c, t: configuración *cis* o *trans* de las insaturaciones.

En la Fig. 11 se muestran dos ejemplos de cromatogramas a las dos temperaturas de trabajo, para una de las réplicas.



**Figura 11.** Cromatograma para los lípidos de *Pseudomonas* sp. AU10 a 4 °C (arriba) y 30 °C (abajo). Se indican con flechas los picos visiblemente diferentes a 4 °C respecto a 30 °C.

### ***DISCUSIÓN I***

El estudio de la expresión diferencial de proteínas a bajas temperaturas de *Pseudomonas* sp. AU10 reveló que al menos trece proteínas se expresan diferencialmente cuando AU10 crece a 4 °C. En otros estudios similares (Fonseca et al., 2011; Piette et al., 2011; Wilmes et al., 2011; Jagannadham & Chowdhury, 2012) se han logrado identificar más de 100 proteínas que aumentan su expresión a 4 °C. Entre otros, en el trabajo de Jagannadham y Chowdhury (2012) se identificaron proteínas de membrana de expresión diferencial a 4 °C, de las cuales la mayoría están involucradas en procesos relativos a la síntesis de pared celular (40%), un 20% relacionadas a funciones de transporte, y una menor proporción de proteínas relacionadas a la respuesta por estrés (6%). Además, se encontraron muchas proteínas de función desconocida. Entre las proteínas que también se observó que aumentan su expresión a 4 °C hay proteínas relacionadas al plegamiento (Piette et al., 2011; Jagannadham & Chowdhury, 2012), transducción de señales, y con funciones regulatorias del metabolismo (Jagannadham & Chowdhury, 2012).

En el trabajo de transcriptómica y proteómica de *Pseudomonas putida* de Fonseca et al. (2011), se encontró más de 150 genes que aumentan su expresión a 10 °C respecto a 30 °C. La mayoría de estos genes estaban involucrados en el metabolismo energético y en el transporte de solutos, y una minoría de genes estaban relacionados a funciones regulatorias (Fonseca et al., 2011). Muchas de las proteínas de expresión diferencial se relacionan con el metabolismo de aminoácidos ramificados, glucosa y ácidos grasos.

Los análisis de geles de proteínas para el tipo de estudio planteado durante esta tesis se hacen habitualmente utilizando programas como el “Delta2D” (DECODON) o el “PDQuest” (BIORAD), que permiten analizar tanto los “spots” presentes en los geles como la intensidad de los mismos. Sin embargo, durante esta tesis sólo se analizaron los geles por inspección visual, y se identificaron aquellas proteínas presentes en las

## Capítulo I- Discusión

---

muestras a 4 °C y ausentes a 30 °C, lo cual explicaría el bajo número de proteínas identificadas, comparado con otros trabajos similares.

La identificación de estas proteínas a través de EM-MALDI ToF reveló que son varios los procesos celulares que sufren cambios durante el crecimiento de AU10 a bajas temperaturas, como ser la transcripción, traducción, metabolismo general y transporte. Entre ellos, la mayoría de las proteínas identificadas (ocho) participan en el metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas (transcripción y traducción), lo que sugiere la relevancia de estos procesos en el mecanismo de adaptación a bajas temperaturas. En otros trabajos donde se realizó proteómica de siccófilos, crecidos a bajas y altas temperaturas, también se describió la sobre-expresión de este tipo de proteínas (Wilmes et al., 2011; Jagannadham & Chowdhury, 2012). Los resultados sugieren que la adaptación de las maquinarias transcripcional y traduccional es imprescindible para permitir el crecimiento de AU10 a bajas temperaturas (temperatura óptima de crecimiento de 20 °C como se describe en Martínez-Rosales & Castro Sowinski, 2011). Se encontró que se expresan diferencialmente a 4 °C las siguientes proteínas: reguladores transcripcionales, factores de elongación y terminación de la transcripción y la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa (ver Tabla 10). Estos factores, entre otros, han sido descritos en trabajos previos sobre proteómica realizados en bacterias siccófilas (Kurihara & Esaki, 2008). El factor NusA se asocia durante la elongación de la transcripción a la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa, por lo cual no es de extrañar que se obtengan ambas proteínas conjuntamente sobre-expresadas. Por otro lado, se hubiera esperado la identificación de algún factor  $\sigma$  alternativo de la ARN polimerasa, que fuera específico para la expresión de genes a bajas temperaturas; sin embargo no se detectó, probablemente debido al método de identificación de proteínas de expresión diferencial utilizado durante esta tesis, entre otras posibilidades.

Los cambios a nivel transcripcional también fueron acompañados por un aumento en la expresión de proteínas involucradas en el proceso de síntesis proteica. Durante esta tesis se identificaron tres proteínas ribosomales que se expresan diferencialmente cuando AU10 crece a bajas temperaturas (proteínas S1 y S2 que constituyen la subunidad ribosomal 30S, y la proteína L1 de la subunidad ribosomal 50S). La proteína

## Capítulo I- Discusión

---

S1 actúa acercando el ARNm al ribosoma para iniciar la traducción (Boni et al., 2001; Wilson & Nierhaus, 2005). No existe información clara sobre la función de la proteína S2 durante el proceso de traducción, pero parecería estar involucrada en la protección y estabilización de la estructura de hélice de la secuencia Shine-Dalgarno mientras ésta está posicionada en la subunidad 30S al inicio de la traducción (Aseev et al., 2008). La mayor presencia de proteínas involucradas en este proceso podría contrarrestar el efecto causado por el enlentecimiento de la maquinaria de la síntesis de proteínas causado por las bajas temperaturas.

Se identificaron también una proteína relacionada al transporte de solutos (TolC), y una enzima relacionada a la transferencia de grupos fosfato o fosfotransferasa (Carbamato Quinasa), involucrada en el metabolismo de arginina, prolina, glutamato y purinas. Esta enzima produce ATP a partir de carbamoil fosfato y ADP, y su presencia podría estar relacionada con un cambio del metabolismo hacia la utilización de ciertos compuestos nitrogenados para la producción de compuesto fosfato de alta energía a bajas temperaturas. Como hasta el momento esta enzima no había sido descrita como de expresión diferencial a bajas temperaturas, se la eligió para analizar su expresión mediante RT-PCR y así confirmar los resultados observados durante la electroforesis bidimensional. En las condiciones ensayadas no se detectó el mensajero correspondiente, pero esto no es necesariamente un resultado contradictorio entre la 2D y el RT-PCR. Ambos experimentos se realizaron con células colectadas en la misma fase de crecimiento (exponencial tardía), y cuando la proteína está presente, no necesariamente también lo está su ARNm. En general la vida media de un ARNm bacteriano está en el orden de minutos a una hora, y si estamos trabajando con un ARNm de corta vida media es probable que al momento del ensayo, cuando detectamos la presencia de la proteína, el ARNm ya se haya degradado. Si bien se probaron varias condiciones para la reacción de PCR, no se probó la presencia del ARNm extrayendo el mismo de células colectadas a distintos tiempos de crecimiento (por ejemplo durante la fase exponencial temprana).

Tampoco se puede ignorar el hecho de que la extracción de ARN es un procedimiento que requiere mucho cuidado debido a que es una molécula lábil y que se degrada fácilmente. Como consecuencia de estas afirmaciones, también se puede

## Capítulo I- Discusión

---

sugerir que la falta de detección de un mensajero se deba a que éste se haya degradado durante el proceso de extracción y control por electroforesis.

La producción de EPS en bacterias siccófilas se ha descrito como un mecanismo de adaptación al frío. En esta tesis se analizaron los EPS producidos por cultivos de *Pseudomonas* sp. AU10 crecidos a 4 °C y 30 °C. Se encontró que AU10 produce el doble de EPS por gramo de biomasa seca a baja temperatura, comparado con lo que produce cuando crece a 30 °C. Estudios previos en aislamientos de *Pseudoalteromonas* siccotolerantes también describen un aumento en la producción de EPS como consecuencia de una disminución en la temperatura de crecimiento (Mancuso Nichols et al., 2004; Mancuso Nichols et al., 2005; Qin et al., 2007). En otro trabajo (Marx et al., 2009), se observó un aumento marcado en la producción de EPS por la bacteria siccófila *Colwellia psychrerythraea* (temperatura óptima de crecimiento de 8-9 °C) a temperaturas de crecimiento por debajo de los 0 °C. Todos estos reportes sugieren una relación entre la temperatura de crecimiento y la producción de EPS. Ésta se vería aumentada a medida que disminuye la temperatura de crecimiento. Los EPS producidos podrían tener un rol crioprotector tal como fue descrito en *Introducción*. A nivel de su composición relativa, se encontraron tres azúcares presentes en los EPS (glucosa, ribosa y manosa), pero no se observaron diferencias con significativas que avalen que la composición del EPS producido varíe con la temperatura. En el trabajo previamente mencionado de Mancuso Nichols et al. (2005a) se describe la presencia de estos tres azúcares (entre otros) en EPS de un aislamiento de *Pseudoalteromonas* sp. antártico; sin embargo, a diferencia de lo presentado en esta tesis, sí se informó sobre algunas diferencias de composición a diferentes temperaturas. Durante dicho trabajo se describieron siete monosacáridos presentes en los EPS (arabinosa, ramnosa, fucosa, ribosa, manosa, galactosa y glucosa). No encontraron diferencias significativas en los porcentajes relativos de ribosa, fucosa y arabinosa, pero sí para el resto de los monosacáridos (manosa y glucosa aumentaron, y galactosa y ramnosa disminuyeron a -2 °C, respecto a 10 y 30 °C).

Aunque inicialmente nos sorprendió haber detectado únicamente tres monosacáridos como componentes de los EPS de AU10, posteriormente pudimos constatar que no es algo inusual entre bacterias de ambientes marinos (las más

## Capítulo I- Discusión

---

estudiadas en cuanto a EPS de sicrófilos y sicrotolerantes). La mayoría de los EPS producidos por bacterias de dichos ambientes son heteropolisacáridos compuestos por pocos monosacáridos (3, 4 o 5), sin perjuicio de que estos monosacáridos sean distintos entre las distintas bacterias. Algunos de los monosacáridos más encontrados fueron: arabinosa, ribosa, xilosa, glucosa, manosa, galactosa y ramnosa (Mancuso Nichols et al., 2005). En *Pseudoalteromonas* sicrófilas se han descrito EPS compuestos principalmente por glucosa, pero también arabinosa, xilosa y en mínima cantidad manosa (Qin et al., 2007); o glucosa, manosa y fucosa (Mancuso Nichols et al., 2005). Por otro lado, también se debe mencionar que el aislamiento AU10 de *Pseudomonas* sp. que se estudió en esta tesis fue obtenido de un ambiente lacustre y no marino (Martínez-Rosales & Castro Sowinski, 2011), y eso también podría significar diferencias a nivel de composición de EPS.

El análisis de lípidos totales extraídos de células de AU10 reveló que hay un aumento en la proporción de los ácidos grasos insaturados (16:1, 18:1, 18:2) cuando la bacteria crece a baja temperatura, respecto a cuando crece a alta temperatura. Por otro lado, no se observó una relación entre la temperatura de crecimiento y el largo de la cadena de los ácidos grasos, y tampoco con la proporción de isómeros *cis/trans*. La relación entre el aumento de ácidos grasos saturados y la temperatura de crecimiento ya había sido informada en un aislamiento antártico de *Pseudomonas syringae* sicrófilo (Kiran et al., 2004), donde se encontró que a bajas temperaturas (5 °C) había una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (16:1 y 18:1), comparado con altas temperaturas (28 °C), a las cuales aumentan los ácidos grasos saturados (16:0) y también los insaturados en *trans*. Al igual que durante esta tesis, el grupo de Kiran no encontró una relación entre el largo de la cadena de ácidos grasos y la temperatura de crecimiento. Por otro lado, en un trabajo realizado con aislamientos de *Pseudomonas* spp. sicrotolerantes, se describió una alta presencia de ácidos grasos insaturados pero sin cambios significativos en cuanto a su composición a diferentes temperaturas de crecimiento (0 – 20 °C) (Bhakoo & Herbert, 1980).

***CAPÍTULO II:***  
***Identificación de proteasas***  
***producidas por***  
***Janthinobacterium sp. AU11***

# **INTRODUCCIÓN**

Entre las adaptaciones a nuevos ambientes que las bacterias deben realizar se incluye la modificación en la estructura y expresión de sus enzimas, por ejemplo, la producción de enzimas activas a las bajas temperaturas ambientales reinantes en la Antártida. Las modificaciones que deben realizar a nivel estructural estas enzimas se han descrito previamente en esta tesis. La alta actividad que presentan estas enzimas a bajas temperaturas, y su termolabilidad las hacen interesantes desde el punto de vista biotecnológico e industrial.

Una de las bacterias psicrófilas con las que cuenta la colección del laboratorio pertenece al género *Janthinobacterium* (denominado AU11). Este aislamiento tiene un rango de temperatura de crecimiento entre 4 °C y 30 °C, y produce una serín proteasa extracelular en forma diferencial a baja temperatura, cuando crece en un medio de cultivo rico diluído 1/20 adicionado con leche descremada 5% (medio ML).

Con el objetivo de identificar la proteasa extracelular de *Janthinobacterium* sp. AU11 se siguieron dos estrategias. Por un lado se diseñaron cebadores degenerados para serín proteasas y se secuenció el producto de amplificación. En paralelo, se intentó identificar la proteasa producida mediante electroforesis en poliacrilamida desnaturalizante del sobrenadante del medio de cultivo de AU11 y análisis por espectrometría de masas MALDI-ToF.

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

### ***I. Cepas bacterianas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento***

Se trabajó con un aislamiento bacteriano antártico sicrotolerante: *Janthinobacterium* sp. AU11, que forma parte de la colección de nuestro laboratorio. Para los diferentes ensayos, se cultivó esta bacteria en un medio de cultivo rico, LB (Ver Anexo I), a 4 °C, 30 °C, o temperatura ambiente (18 °C – 23 °C), según el ensayo, con agitación (200 rpm) constante. En algunos casos también se cultivó en un medio conteniendo leche (medio ML) (Anexo I).

### ***II. Búsqueda de genes que codifican para serín proteasas***

La identificación de genes que codifican para serín proteasas se realizó por PCR, utilizando cebadores degenerados dirigidos a zonas conservadas de este tipo de proteasas, y posterior secuenciación de los fragmentos de amplificación.

Se extrajo el ADN genómico (ADNg) de cultivos de *Janthinobacterium* sp. AU11, crecidos por 24 h a temperatura ambiente en medio LB, utilizando el kit comercial (ViVo Science), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la identificación de genes que codifican para serín proteasas se utilizaron los cebadores degenerados diseñados previamente por el grupo de Acevedo (Acevedo et al., 2008) en reacciones de PCR. La secuencia de los cebadores se detalla en la Tabla 15.

## Capítulo II – Resultados

**Tabla 15.** Cebadores degenerados utilizados en la búsqueda de genes de proteasas serínicas.

Nombre	Secuencia <sup>(a)</sup>	Tm promedio
<b>B2F</b>	5' GGCCACGGCACCCAYGTBGCSGG 3'	72,0 °C
<b>B2R</b>	5' CGTGAGGGGTGGCCATRSWDGT 3'	63,4 °C

<sup>(a)</sup> En el Anexo III se encuentran las equivalencias de las bases degeneradas.

La amplificación se llevó a cabo agregando, para un volumen final de 20 µl: 2 µl de buffer 10X (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.0) (SBS Genetech Co., Ltd); 2 µl de dNTPs 2 mM (concentración de cada deoxiribonucleótido); 2 µl de cada cebador en concentración 10 µM cada uno; 1 µl de U-Taq Polimerasa (SBS Genetech Co., Ltd; 5 unidades/ µl); 1 µl de ADN; y 10 µl de agua bidestilada, estéril, apirógena, para inyectables.

Las condiciones de ciclado se modificaron del protocolo empleado por Acevedo et al. (2008). Se comenzó con una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C. A continuación se realizaron 5 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación de cebadores a 55 °C, y 1 min de extensión a 72 °C. Luego, otra ronda de 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación de cebadores a 70 °C, y 1 min de extensión a 72 °C. Se concluyó con un paso de extensión durante 10 min a 72 °C.

Para confirmar la presencia de los fragmentos de amplificación, la mezcla de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 0,5X (ver Anexo II). Se sembraron 5 µl de cada producto de PCR por pocillo. Para determinar el tamaño del fragmento amplificado, se utilizó el marcador de peso molecular (MPM) 100 pb blue DNA Ladder (BIORON, N° Cat. 304105). La corrida electroforética se realizó a 100 V durante 25 min. Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante tinción con “GoldView” (1 µl cada 50 ml de agarosa) (SBS Genetech Co., Ltd) y exposición a luz UV.

## Capítulo II – Resultados

---

Los productos de PCR se purificaron empleando el kit comercial de extracción de ADN desde gel de QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit, N° Cat. 28704), siguiendo las instrucciones de la empresa fabricante.

A continuación, los fragmentos se clonaron empleando el kit comercial “InsTAclone™ PCR Cloning Kit” (Fermentas, N° Cat. K1214). La reacción se llevó a cabo incubando 4,5 µl de producto de PCR con 1,5 µl del vector pTZ57R/T, 3 µl de buffer de ligación, y 0,5 µl de ligasa T4. Se incubó la reacción de ligación durante 1 h a temperatura ambiente, y luego toda la noche a 4 °C.

La mezcla de ligación se transformó a células competentes de *E. coli* DH5α. La transformación se llevó a cabo mezclando 50 µl de células competentes (Anexo VI) con 5 µl de mezcla de ligación. También se realizó un control transformando con vector sin inserto. Se incubó la mezcla durante 30 min en hielo, y se realizó el “shock” térmico de la siguiente forma: 90 seg a 42 °C, y luego 2 min en hielo. A continuación se agregó a la mezcla 500 µl de LB y se incubó a 37 °C con agitación constante durante 1 h. Finalmente se sembraron 50 y 100 µl de transformación en LB-agar con ampicilina (100 µg/ml), XGAL (40 µg/ml) e IPTG (40 µg/ml), y se incubó a 37 °C. Los clones positivos (aquellos que incorporaron el vector con el inserto) se seleccionaron en base a la coloración blanca de las colonias, y se comprobó la presencia del inserto mediante amplificación por PCR (utilizando lisados celulares como molde de ADN y los cebadores correspondientes al fragmento clonado). Las condiciones de ciclado fueron las mismas descritas anteriormente. Una vez seleccionado el clon que poseía el inserto, se realizaron minipreparaciones del plásmido con el kit “Plasmid Mini Prep” de BIORON (N° Cat. 806942), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido se envió a la empresa Macrogen en Corea para la secuenciación del inserto en ambos sentidos con los cebadores universales M13F y M13RpUC.

Las secuencias se editaron mediante análisis visual del cromatograma y se reconstruyó la secuencia parcial del gen utilizando la información obtenida de la secuenciación en ambos sentidos. Los fragmentos de ADN reconstruidos se emplearon para la búsqueda de secuencias de alta similitud en la base de datos de

## Capítulo II – Resultados

secuencias no redundantes del “National Center for Biotechnological Investigation” (NCBI nr), utilizando el programa “BLASTx” ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)); y también en la base de datos de peptidasas “MEROPS” (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

### ***III. Amplificación de la serín proteasa de *Janthinobacterium* sp. AU11 con cebadores específicos***

A partir de la secuencia nucleotídica obtenida de la proteasa amplificada para *Janthinobacterium* sp. AU11, se diseñaron cebadores específicos empleando el programa Gene Runner 3.05. La secuencia, así como la  $T_m$  de los cebadores, se detallan en la Tabla 16. El tamaño esperado del fragmento a amplificar con estos cebadores fue de 394 pb. El ciclado empleado comenzó con un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, luego 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación de cebadores a 56 °C durante 1 min, y extensión a 72 °C durante 1 min; y finalmente se concluyó con 1 ciclo de extensión a 72 °C durante 5 min.

**Tabla 16.** Cebadores específicos diseñados para verificar la secuencia de una región parcial de la proteasa de *Janthinobacterium* sp. AU11.

Nombre	Secuencia	$T_m$
<b>INPROTJF</b>	5' GGT TTG ATC CTG CCC ATC TTT GC 3'	73,9 °C
<b>INPROTJR</b>	5' CAG TTG CTG TTG GGC ATG GGA G 3'	74,0 °C

El producto de PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 0,5X (ver Anexo II). Las condiciones de la electroforesis así como la purificación de los productos de PCR fueron las descritas anteriormente en el ítem “Búsqueda de genes que codifican para serín proteasas”.

Tras ser purificado, el producto de PCR fue enviado a la empresa Macrogen en Corea para su secuenciación, junto con los cebadores con los cuales se realizó la amplificación. La secuencia nucleotídica que se obtuvo se editó analizando el cromatograma, y luego se buscó secuencias con homología en la bases de datos del NCBI mediante los programas “BLASTn” y “BLASTx”, y también en la base de datos “MEROPS”. La secuencia obtenida para la supuesta serín proteasa de *Janthinobacterium* sp. AU11 se denominó JSP8A. La misma se depositó en la base de datos de la NCBI, asignándole el número de acceso JN416569 (aún no liberado al público).

#### ***IV. Análisis filogenético de la proteasa JSP8A***

Para el análisis filogenético de la proteasa JSP8A se amplió la búsqueda de secuencias homólogas utilizando la base de datos del NCBI mediante el programa “BLASTp”, y también en la base de datos “MEROPS”. Sólo se consideraron aquellas secuencias con un mínimo de 28 % de identidad, respecto a la secuencia de JSP8A. Mediante el programa “MUSCLE” (Edgar, 2004) se alinearon todas las secuencias y con el programa “modelgenerator” (Keane, 2006) se infirió el modelo LG+G de evolución de aminoácidos como el más probable. A continuación se infirió el árbol filogenético empleando el método de “Maximum Likelihood” con el programa “Phyml 3.0” (Guindon, 2003). Se utilizó el test por defecto “SH-like”, para evaluar el apoyo de cada rama. Los árboles filogenéticos se realizaron con la asistencia del M.Sc. Andrés Iriarte, del Laboratorio de Organización y Evolución del Genoma, dirigido por el Prof. Héctor Musto, de la Facultad de Ciencias, UdelaR.

#### ***V. Identificación de proteasas extracelulares producida por *Janthinobacterium* sp. AU11***

Con el fin de analizar la(s) proteasa(s) extracelular(es) producida(s) por *Janthinobacterium* sp. AU11 se utilizó una estrategia proteómica. Se analizaron sobrenadantes de cultivos de AU11 en medio ML en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) y a continuación se identificó por espectrometría de

## Capítulo II – Resultados

---

masas la banda proteica dominante y de expresión diferencial en medio ML, comparado con el medio sin leche.

Se trabajó con cultivos de 5 ml de *Janthinobacterium* sp. AU11 en medio LB diluido 1/20 (Anexo I) y medio ML (Anexo I), incubados a 4 °C con agitación constante hasta la fase exponencial tardía para el medio LB1/20, y hasta que se observó coagulación de la leche para el medio ML (fase estacionaria de crecimiento). Los cultivos se centrifugaron a 7.000 rpm durante 7 min y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Estos sobrenadantes y diluciones de los mismos (1/10, 1/50, y 1/100) se analizaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 12% (gel separador) y 5% (gel concentrador). Se utilizó como control una dilución 1/20 de leche descremada al 5 %. En el Anexo IV se detalla la mezcla preparada para los geles de SDS-PAGE. Se sembraron 15 µl de muestra (3 µl de buffer de carga 5X (Anexo II) con SDS 10 %, 0,75 µl de DTT 1M, y 11,25 µl de sobrenadante de medio de cultivo, o leche 5 % 1/20 como control). Se sembraron también 5 µl del marcador de peso molecular “Pre-stained protein molecular weight marker” (Fermentas). La corrida electroforética se realizó en buffer de corrida 1X (Anexo II) con SDS, y se sometió a un voltaje inicial de 70 V hasta que el frente de corrida llegó al gel separador, y luego a 120 V hasta que el frente de corrida llegó al final del gel.

La visualización de bandas proteicas se realizó sumergiendo el gel en solución de Coomassie (Anexo IV) durante 1h con agitación. Luego se realizaron varios lavados con solución decolorante (Anexo IV).

El análisis de las bandas que se detectaron diferencialmente en el sobrenadante del medio de cultivo ML se realizó en el servicio de la Unidad de Bioquímica y Proteómica del Instituto Pasteur. Allí se cortó la banda seleccionada del gel, se digirió la proteína con tripsina y se analizaron los péptidos obtenidos mediante EM-MALDI ToF.

Los péptidos obtenidos se compararon con la base de datos NCBI nr empleando el programa MASCOT.

### VI. *Identificación del gen que codifica para la proteasa extracelular*

A partir de la secuencia aminoacídica de la proteasa extracelular identificada por espectrometría de masas, se diseñaron cebadores degenerados dirigidos a los péptidos identificados, empleando el programa Gene Runner 3.05. En la Tabla 17 se indica la secuencia de los cebadores.

**Tabla 17.** Cebadores degenerados dirigidos al gen de la JPS8A.

Nombre	Secuencia	Tm
<b>JMLPF</b>	5'- GGN GGN GTN GAR GCN TAY GC -3'	60,7 °C
<b>JMLPR</b>	5'- NAC RTT NCC NAC NAR NCC -3'	52,7 °C

Para un volumen final de 20 µl se mezclaron: 2 µl de buffer 10X, 2 µl de dNTPs 2 mM, 2 µl de cada uno de los cebadores 10 µM, 0,2 µl de U-Taq (SBS, 5 U/µl), 1 µl de ADNg, y se completó el volumen con agua ultrapura estéril.

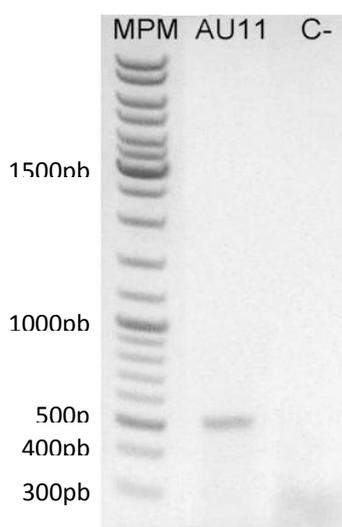
El programa de ciclado empleado comenzó con una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, luego 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, hibridación de cebadores a 51 °C durante 1 min, y extensión de la secuencia a 72 °C durante 1 min, y finalmente 5 min de extensión a 72 °C.

El análisis del producto de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, en las condiciones descritas anteriormente en la sección “*Búsqueda de genes que codifican para serín proteasas*”, al igual que los pasos de purificación de los productos amplificados, y clonado de los mismos. Los productos de pcr purificados y clonados se enviaron a secuenciar al servicio de MACROGEN en Corea, y la secuencia nucleotídica obtenida se comparó mediante BLASTn con las secuencias en la base de datos del NCBI.

## **RESULTADOS**

### ***I. Identificación de serín proteasas – Estrategia genómica***

Se emplearon cebadores degenerados diseñados para serín proteasas en reacciones de PCR y se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 400 pb (Fig. 12), el cual, tras ser purificado y clonado, se envió a secuenciar. El análisis de la secuencia aminoacídica traducida a partir de la secuencia nucleotídica mostró que ésta presentaba un 60 % de identidad con secuencias de serín proteasas tipo subtilisinas de la familia S8 de Cianobacterias. Las proteasas, y los correspondientes géneros de microorganismos, con los que se obtuvo mayor porcentaje de identidad se muestran en la Tabla 18. Se obtuvieron los mismos resultados haciendo BLAST en la base de datos del NCBI nr que con la base de datos MEROPS, por lo que solo se muestran los resultados obtenidos con una de las bases de datos.



**Figura 12.** Electroforesis en agarosa 1% del producto de amplificación obtenido con los cebadores degenerados para serín proteasas. MPM: Marcador de peso molecular; GeneRuler DNA ladder Mix; Fermentas. A la izquierda se indica el tamaño de algunas bandas. C- : control negativo

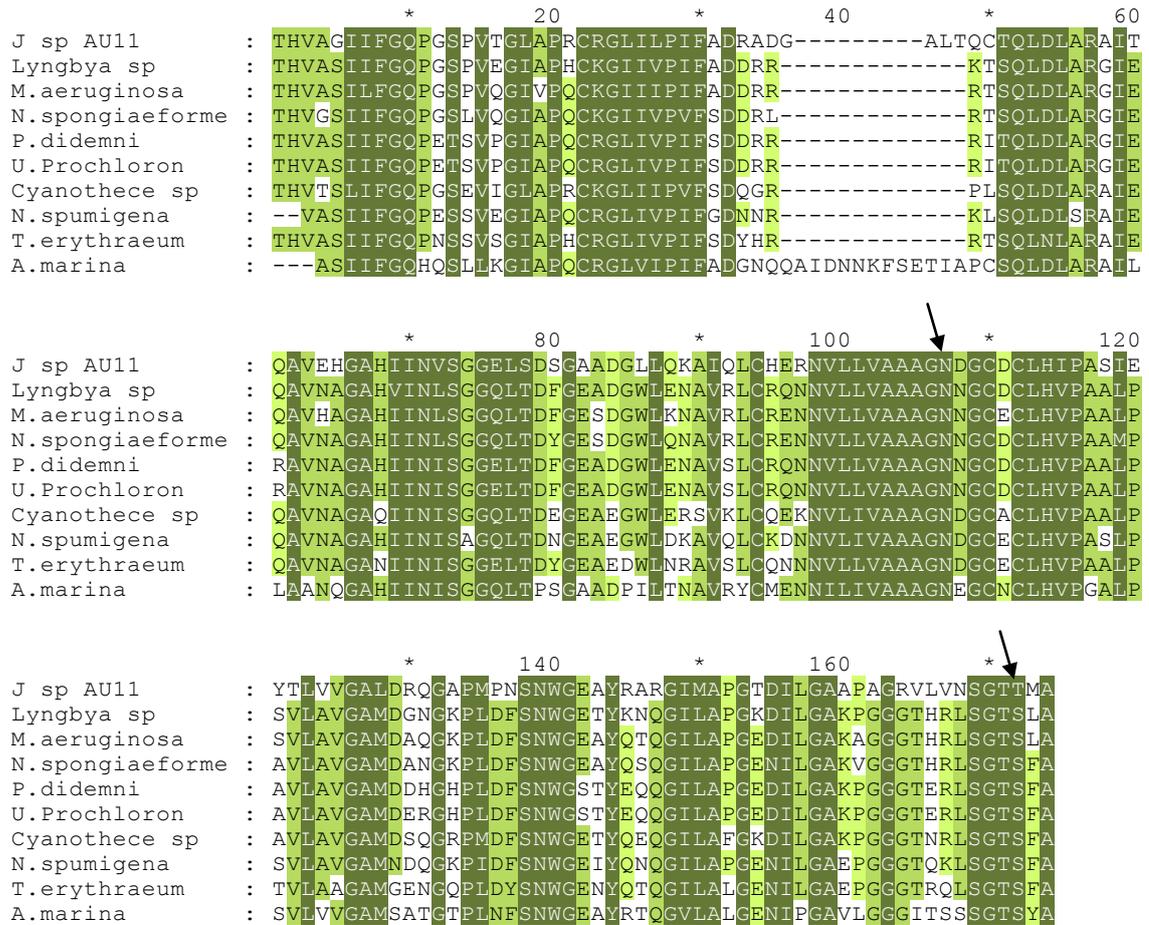
## Capítulo II – Resultados

**Tabla 18.** Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos obtenida para la supuesta proteasa JSP8A de *Janthinobacterium* sp. AU11 contra la base de datos de MEROPS.

IDENTIFICACIÓN	ORGANISMO	N° DE ACCESO	% DE IDENTIDAD
<b>Peptidasa subfamilia S8A (664 aminoácidos)</b>	<i>Lyngbya</i> sp. PCC 8106	MER090860	61,82%
<b>Peptidasa subfamilia S8A (657 aminoácidos)</b>	<i>Microcystis aeruginosa</i>	MER166043	61,21%
<b>Peptidasa subfamilia S8A (702 aminoácidos)</b>	<i>Prochloron didemni</i>	MER050309	60,00%
<b>Peptidasa subfamilia S8A (671 aminoácidos)</b>	<i>Prochloron</i> sp. 06037A (no cultivado)	MER170345	60,00%
<b>Peptidasa subfamilia S8A (663 aminoácidos)</b>	<i>Nostoc spongiaeforme</i>	MER170237	60,00%
<b>Peptidasa subfamilia S8A (661 aminoácidos)</b>	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	MER153727	59,39%
<b>Homólogos de la subfamilia S8A, no peptidasas (771 aminoácidos)</b>	<i>Nodularia spumigena</i>	MER090863	59,39%
<b>Peptidasa patG (666 aminoácidos)</b>	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	MER024704	56,97%
<b>Peptidasa subfamilia S8A (653 aminoácidos)</b>	<i>Acaryochloris marina</i>	MER101726	51,72%

En la Fig. 13 se muestra el alineamiento de la proteasa JSP8A de *Janthinobacterium* sp. AU11, con algunas de las secuencias de proteasas con las que se obtuvo mayor identidad.

## Capítulo II – Resultados



**Figura 13.** Alineamiento de JSP8A de *Janthinobacterium* sp. AU11 y serín proteasas de cianobacterias con las que se obtuvo el mayor porcentaje de identidad. La intensidad del color señala la similitud de las secuencias en cada posición aminoacídica. A mayor intensidad de color, mayor similitud a nivel del aminoácido. A la izquierda se indica el nombre abreviado del microorganismo al que pertenece la secuencia: J sp AU11 (*Janthinobacterium* sp. AU11), Lyngbya sp. (*Lyngbya* sp. PCC 8106 – MER090860), M.aeruginosa (*Microcystis aeruginosa* – MER166043), N.spongiaeforme (*Nostoc spongiaeforme* – MER170237), P.didemni (*Prochloron didemni* – MER050309), U.Prochloron 060374 (Uncultured *Prochloron* – MER170345), Cyanotece sp (*Cyanothece* sp. PCC7425 – MER153727), N.spumigena (*Nodularia spumigena* – MER090863), T.erythraeum (*Trichodesmium erythraeum* – MER024704), A.marina (*Acaryochloris marina* – MER101726). Las flechas señalan los aminoácidos catalíticos.

## Capítulo II – Resultados

En base a la secuencia obtenida para la proteasa JSP8A de *Janthinobacterium* sp. AU11 se diseñaron cebadores específicos con los cuales se realizaron nuevas rondas de amplificación por PCR y de secuenciación. El análisis del producto de amplificación confirmó los resultados previamente descritos. El análisis por BLAST reveló además que la secuencia obtenida coincide con parte del sitio catalítico descrito para la proteasa modelo de la familia 8A, la subtilisina Carlsberg (Fig. 14).



**Figura 14.** Ubicación del sitio catalítico dentro de la secuencia obtenida para la proteasa JSP8A.

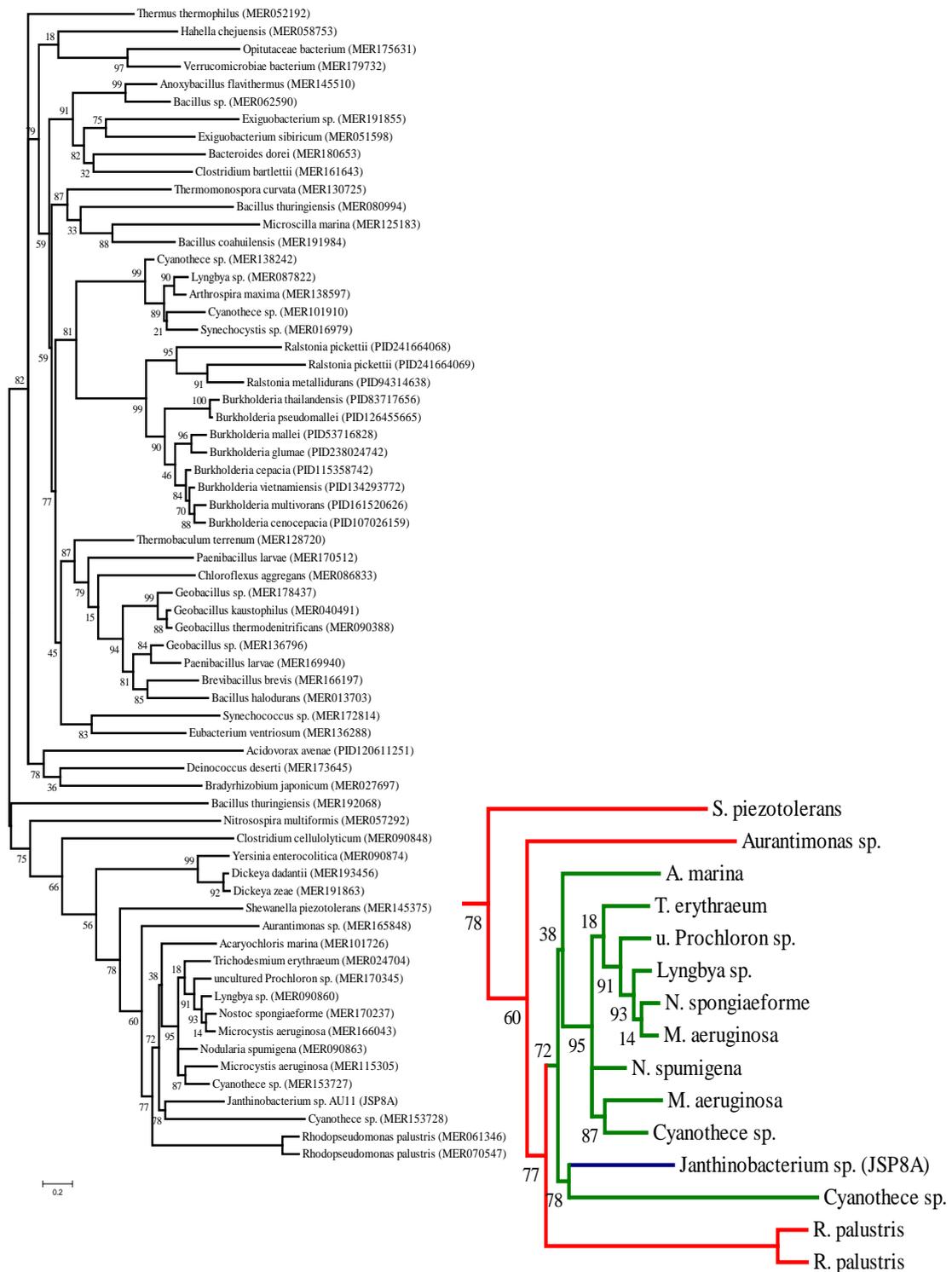
a) Se muestra la región de homología con el sitio catalítico de la familia de serín proteasas 8 y 53. b) Alineamiento de la secuencia de la proteasa JSP8A con un miembro de la familia S8, la subtilisina Carlsberg. Se indica sombreada en gris la posición de dos de los residuos aminoacídicos de la tríada catalítica. En el caso de la serina (S) en *Janthinobacterium* sp. AU11 habría una sustitución por una treonina (T).

## Capítulo II – Resultados

---

Las familias de peptidasas S8 (subtilisina y hexina) y S53 (sedolisina) comprenden tanto exoproteasas como endoproteasas. La familia S8 presenta la tetraada aminoacídica catalítica Asp/His/Asn/Ser (D, H, N, S). En la secuencia de JSP8A pudo identificarse los aminoácidos N y T (sustituyendo a S) de la téttrada catalítica. Tanto la serina (S) como la treonina (T) son aminoácidos neutros y polares, con cadena lateral hidroxilada. En esta téttrada, la serina actúa como nucleófilo y el ácido aspártico como electrófilo. La familia S53 contiene una tríada catalítica compuesta por Glu/Asp/Ser (E, D, S). Aquí, la serina actúa como nucleófilo, y el ácido aspártico como electrófilo. Los miembros de estas familias presentan gran diversidad: algunos contienen puentes disulfuro, algunos son intracelulares, mientras otros son extracelulares. Hay peptidasas de estas familias que actúan a temperaturas extremas y otras a pH altos o bajos.

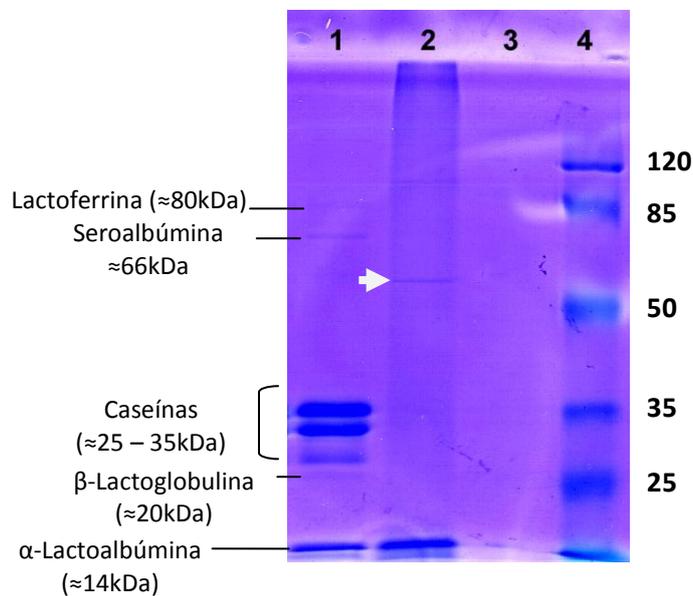
Para confirmar la filiación de la proteasa JSP8A se realizó un árbol filogenético, comparando la secuencia de la proteasa amplificada para *Janthinobacterium* sp. AU11, con las proteasas de mayor similitud de secuencia y otras serán proteasas de bacterias filogenéticamente relacionadas (Fig. 15). La proteasa JSP8A se agrupó con las secuencias de subtilisinas de la familia 8A de cianobacterias y quedó claramente separada de las secuencias de proteasas de la familia 8A de bacterias de otros phyla.



**Figura 15.** Filogenia de la proteasa JSP8A de *Janthinobacterium* sp. AU11. Los números sobre las ramas representan el valor de apoyo a los nodos calculado con el test “SH-like”. Se muestra la filogenia completa a la izquierda, y a la derecha una ampliación del linaje que contiene a la proteasa JSP8A. Se indica entre paréntesis el número de acceso para cada secuencia.

## II. Identificación de proteasas extracelulares – Estrategia proteómica

Para identificar la proteasa extracelular producida por AU11, descrita como una serín proteasa durante mi pasantía de grado, se analizó mediante SDS-PAGE los sobrenadantes de medio de cultivo de *Janthinobacterium* sp. AU11 en medio LB 1/20 y ML (Fig. 16). Se evidenció una proteína, cuyo tamaño aparente se calculó de 55 kDa, en el sobrenadante de AU11 cuando crecía en medio ML. Dicha proteína no se detectó en los sobrenadantes de cultivos de AU11 en el medio LB 1/20.



**Figura 16.** SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivos de *Janthinobacterium* sp. AU11. 1) Leche 0,1%; 2) sobrenadante de cultivos en ML (dil 1/20); 3) sobrenadante de cultivos en LB 1/20 (sin diluir); 4) MPM (a la derecha se indica el tamaño de cada banda en kDa). Se indica con una flecha la proteína de expresión diferencial producida en los cultivos adicionados con leche. A la izquierda del gel se indican las proteínas de la leche y su tamaño aproximado.

## Capítulo II – Resultados

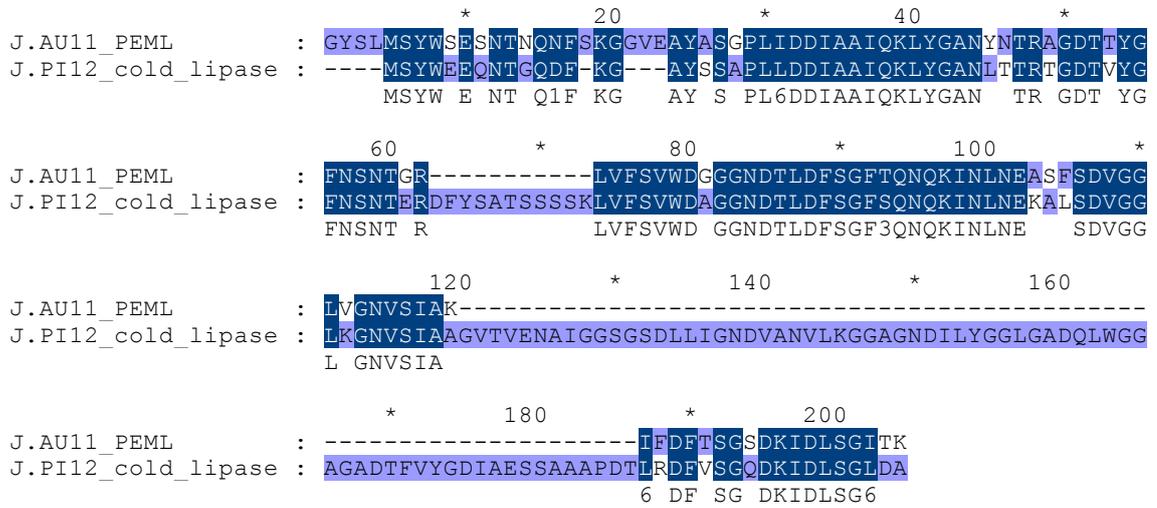
La proteína se extrajo del gel, y tras su digestión con tripsina, los péptidos obtenidos se analizaron por EM-MALDI ToF. De los péptidos obtenidos, tres presentaron similitud de secuencia con una región de una proteasa alcalina de *Pseudomonas fluorescens* (gi|30410775) de 49,358 kDa (Fig. 17).

```
1 MSKVKDKAIV SAAQASTAYS QIDSFHLYD RGGNLTVNGK PSYTVDQAAT
51 QLLRDGAAYR DFDGNGKIDL TYTFLTSASS STMNKHGISG FSQFNAQQA
101 QAALAMQSWS DVANVTFTEK ATGGDGHMTF GNYSSGQDGA AAFAYLPGTG
151 AGYDGTSWYL TNNSYTPNKT PDLNNYGRQT LTHEIGHSLG LAHPGDYNAG
201 EGAPTYNDAT YGQDTRGYSL MSYWSESNTN QNFSKGGVEA YASGPLIDDI
251 AAIQKLYGAN YNTRAGDTTY GFNSNTGRDF LSATSNADKL VFSVWDGGGN
301 DTLDFSGFTQ NQKINLNEAS FSDVGGVLGN VSIKGVTVVE NAFGGAGNDL
351 IIGNNAANVI KGGAGNDLIY GGGGADQLWG GAGKDTFVFG ASSDSKPGAA
401 DKIFDFTSGS DKIDLSGITK GAGLTFVNAF TGHAGDAVFS YAAGTNLGLT
451 AVDFSGHGVA DFLVTTVGQS AASDIVA
```

**Figura 17.** Secuencia de la proteasa alcalina de *Pseudomonas fluorescens* (gi|30410775). Se muestran en rojo los péptidos que presentaron similitud de secuencia con los péptidos obtenidos de la proteasa extracelular de *Janthinobacterium* sp. AU11.

El análisis de BLASTp de los péptidos identificados con la base de datos de la NCBI nr, mostró un alto porcentaje de homología (70 %) con una lipasa activa a bajas temperaturas de *Janthinobacterium* sp. PI12 (nº acc ABC70165). En la Fig. 18 se muestra el alineamiento de ambas secuencias. Curiosamente, el análisis de esta lipasa, tanto en la NCBI nr como en la base de datos de MEROPS, muestra que es inequívocamente una metalo proteasa alcalina (100 % de identidad con metalo proteasas alcalinas de *Pseudomonas aeruginosa*), con una región inicial con homología a Zn metalo proteasas y una región final que presenta similitud con metalo proteasas de la familia M10\_C.

## Capítulo II – Resultados



**Figura 18.** Alineamiento de los péptidos identificados con la secuencia anotada como lipasa de *Janthinobacterium* sp. PI12 en la base de datos de NCBI (J.PI12 cold lipase). J.AU11 PEML corresponde a los péptidos identificados por espectrometría de masas. La escala de colores indica el grado de similitud de aminoácidos en cada posición.

# ***DISCUSIÓN***

En el contexto de un ambiente extremo como el antártico, la adquisición de nuevas funciones que le permitan a un microorganismo aprovechar mejor los recursos del medioambiente conlleva a una importante ventaja adaptativa. En este sentido, la transferencia horizontal de genes (THG) constituye una fuerza importante en el modulado de la evolución bacteriana y depende de que se mantengan los genes transferidos a la célula hospedera mediante una selección positiva. Así, los genes que codifiquen para proteínas con nuevas funciones, que representen una ventaja adaptativa, serán seleccionados positivamente para ser retenidos. Por otro lado, aquellos genes cuya expresión no signifique la producción de una proteína “útil” serán removidos (Boto, 2010).

Se han descrito algunos eventos de THG en ambientes fríos, de bacterias a artrópodos (Song et al., 2010), a crustáceos (Kiko, 2010), y a procariotas (Ayub et al., 2007;; López-García et al., 2003; Xiao et al., 2005; Ma et al., 2006; Moreira et al., 2006; Pini et al., 2007; Allen et al., 2009; Hakvåg et al., 2009). La transferencia de genes relacionados con la producción de metabolitos antibacterianos, degradación de hidrocarburos, transducción de señales, metabolismo de vitaminas, metabolismo central y producción de enzimas hidrolíticas en el ambiente antártico, son una clara demostración de la importancia de la THG en la evolución y adaptación de las comunidades microbianas a este ambiente (Martínez-Rosales et al., 2012). Por ejemplo, en un ambiente oligotrófico como el antártico, la adquisición de un gen que codifique para una enzima hidrolítica como la quitinasa, le confiere una ventaja al microorganismo hospedero, que podrá entonces utilizar la quitina presente en el exoesqueleto de los invertebrados como fuente de C y N.

Durante esta tesis se identificaron dos proteasas en un aislamiento antártico del género *Janthinobacterium*. Siguiendo una estrategia genómica, se identificó una proteasa serínica (JSP8A). La comparación de la secuencia con las bases de datos

## Capítulo II – Discusión

---

mostró que esta enzima presenta un 60% de identidad con serin proteasas de la familia 8A de Cianobacterias. Algunos de los géneros con los que presentó mayor identidad fueron *Lyngbya*, *Microcystis*, *Prochloron* y *Nostoc*. Estas proteasas serínicas de Cianobacterias no están descritas como enzimas extracelulares, incluso no se sabe su función fisiológica, aunque para dos de ellas se conoce que participan en la biosíntesis de péptidos cíclicos (cianobactinas) producidos por algunas cianobacterias (Donia et al., 2008; Ziemert et al., 2008). Los resultados de BLAST se confirmaron por el análisis filogenético de la secuencia de la proteasa, que la agrupó con otras serin proteasas de Cianobacterias (con un buen apoyo estadístico; 72%), mientras que la separó de proteasas de otras bacterias del orden *Burkholderiales* (orden al que pertenece el género *Janthinobacterium*).

Estos resultados sugieren la existencia de un evento de transferencia horizontal de genes entre una *Cyanobacteria* y el aislamiento AU11 de *Janthinobacterium*. La transferencia de un gen que le aporte al organismo receptor una nueva función le ofrecería al mismo una ventaja a nivel adaptativo. En este caso, una proteasa sería beneficiosa en un ambiente en el cual los recursos energéticos son limitados, ya que le permitiría un mejor uso de las fuentes proteicas disponibles.

El análisis de la secuencia aminoacídica mostró que coincide con parte del sitio activo de las familias S8 y S53 de serin proteasas. Dentro de la secuencia parcial obtenida se encontraron dos de los residuos aminoacídicos que componen la secuencia catalítica (caracterizada por una tétrada). Uno de los residuos de aminoácidos de la tríada catalítica, la treonina (Thr), se encontró sustituyendo a la serina (Ser) característica de las familias de serin proteasas 8A. La Thr está codificada por cuatro codones (ACU, ACC, ACA, ACG) y tienen una única base de diferencia (en la primera posición) con respecto a cuatro de los seis codones que codifican para la Ser (UCU, UCC, UCA, UCG; AGU, AGC), habiendo una adenina en el caso de la treonina y un uracilo (timina en la secuencia de ADN del aminoácido) para la serina. En la secuencia de la proteasa JSP8A se detectó una transversión de una pirimidina [timina; TCC (UCC) de la Ser] a una purina (adenina; ACC de la Thr), lo cual determinó que se sustituyera así la serina original por una treonina. Ambos aminoácidos son polares y neutros, por lo cual es probable que no haya afectado la funcionalidad del sitio activo. Tanto la

## Capítulo II – Discusión

---

serina como la treonina se encuentran entre los aminoácidos “preferidos” por microorganismos sicrófilos, en los que se ve una mayor presencia de aminoácidos pequeños y neutros y una menor cantidad de aminoácidos básicos y aromáticos (Metpally & Reddy, 2009). Estas preferencias a nivel de la constitución de las proteínas están dirigidas a mantener la flexibilidad de la proteína a bajas temperaturas para no perder su funcionalidad.

Por otro lado, también se identificó una proteasa extracelular producida por *Janthinobacterium* sp. AU11, siguiendo una estrategia proteómica. En este caso, el análisis de los péptidos obtenidos por EM MALDI-ToF, mediante comparación con las bases de datos, reveló que homología con una proteasa alcalina de *Pseudomonas fluorescens*. Sin embargo, también presentan un alto porcentaje de identidad aminoacídica (70%) con una enzima anotada como una lipasa activa a bajas temperaturas de *Janthinobacterium*. Si bien esta enzima está anotada como una lipasa, del análisis de su secuencia, tanto en la base de datos de la NCBI nr como en MEROPS, se desprende que se trata de una metalo proteasa alcalina (100% de identidad con varias proteasas alcalinas de *Pseudomonas aeruginosa* (N° acceso: YP\_006483856.1 y YP\_002441646.1; entre otras). Existe la posibilidad que esta enzima esté mal anotada en la base de datos de la NCBI nr.

El hecho de que el análisis de los péptidos identificados para la proteasa extracelular de *Janthinobacterium* sp. AU11 indique que se trata de una metalo proteasa alcalina no se contradice necesariamente con los resultados previamente obtenidos mediante ensayos bioquímicos, que nos habían permitido clasificar a la enzima como una proteasa serínica. Hay dos factores importantes a tener en cuenta. Por un lado, sólo algunos péptidos de la proteasa extracelular de *Janthinobacterium* sp. AU11 pudieron ser identificados con proteasas presentes en las bases de datos y por lo tanto sólo se tiene un fragmento de la secuencia de la proteína. Por otro lado, también se debe considerar que las enzimas pueden tener más de un mecanismo catalítico, pudiendo tener actividad tanto como metalo proteasa y serín proteasa (actividad mixta).

***CONCLUSIONES***

***Y***

***PERSPECTIVAS***

### ***CONCLUSIONES***

Durante esta tesis se realizaron estudios tendientes a comprender los mecanismos de adaptación al frío en bacterias antárticas, analizando la expresión a baja y alta temperatura de tres tipos de macromoléculas: proteínas, lípidos y polisacáridos. Se incluyó también la identificación de una proteasa extracelular con actividad a 4 °C y que no se produce a altas temperaturas.

Los resultados obtenidos sugieren que *Pseudomonas* sp. AU10 modifica el perfil de macromoléculas como proteínas y ácidos grasos producidos como mecanismo de adaptación a bajas temperaturas. Las proteínas que se vieron expresadas diferencialmente a 4 °C están relacionadas con varios procesos celulares (transcripción, traducción, metabolismo de aminoácidos, transporte de solutos). Estos cambios se explicarían como parte de la adaptación al frío para solucionar problemas relacionados con la disminución de la velocidad de la maquinaria transcripcional y traduccional, la formación de agregados proteicos y el empleo ineficiente de los sustratos disponibles en un medio oligotrófico como el antártico.

A nivel de ácidos grasos, se observó un aumento de la producción de ácidos grasos insaturados. La presencia de los mismos disminuye el grado de empaquetamiento de los lípidos en las membranas celulares (debido a la presencia de un “codo” en la cadena por el doble enlace presente), aumentando la fluidez de las mismas. Estos ácidos grasos insaturados podrían ayudar en el establecimiento de la fluidez óptima de la membrana, y así colaborar con el mantenimiento de las funciones celulares.

Los EPS podrían también constituir un mecanismo de protección celular durante el crecimiento a bajas temperaturas. Los resultados muestran un aumento relativo de su producción al disminuir la temperatura de crecimiento de la bacteria, transformándose probablemente en una molécula crioprotectora, tal cual se ha informado en otras bacterias.

## Conclusiones y Perspectivas

---

También se trabajó con el aislamiento de *Janthinobacterium* sp. AU11. Empleando dos estrategias se identificaron dos enzimas proteolíticas. .

Por un lado, el análisis de los péptidos obtenidos para la proteasa extracelular de AU11 indica que esta enzima tiene similitud de secuencia aminoacídica con metalo proteasas de *Pseudomonas* y *Janthinobacterium*. Previamente esta enzima había sido caracterizada como una proteasa serínica por ensayos bioquímicos, por lo que se podría tratar de una proteasa que presenta ambos tipos de mecanismos catalíticos. Mientras no se tengan más datos de la secuencia de la proteasa sólo podemos afirmar que es una proteasa serínica con similitud de secuencia a nivel de algunos péptidos con metalo proteasas.

En paralelo se realizó una búsqueda de genes que codifican para serín proteasas en *Janthinobacterium* sp. AU11. Utilizando cebadores degenerados se identificó mediante secuenciación una proteasa serínica para la cual la evidencia sugiere un evento de THG desde una Cianobacteria. La transferencia de genes es un importante factor que contribuye a la adaptación de los microorganismos a ambientes donde las condiciones son muy variables o “extremas”, con recursos limitados, como es el caso de la Antártida.

En conclusión, en el aislamiento antártico sicrotolerante *Pseudomonas* sp. AU10 el crecimiento a bajas temperaturas está determinado por un aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados, una mayor producción de exopolisacáridos, y la sobre-expresión de proteínas que participan en diversos aspectos de la fisiología celular.

Con respecto a *Janthinobacterium* sp. AU11, podemos decir que presenta secuencias codificantes para al menos dos proteasas. Una de ellas es una serín proteasa extracelular, activa a bajas temperaturas y que sólo se produce a temperaturas inferiores a los 20 °C, pero que presenta también similitud de secuencia con metalo proteasas. La segunda proteasa identificada en el aislamiento AU11 es una proteasa serínica que parece haber sido adquirida en un evento de transferencia horizontal de genes desde una Cianobacteria.

### ***PERSPECTIVAS***

Los resultados obtenidos en esta tesis constituyen una aproximación al objetivo general planteado. Para completar los resultados obtenidos se podrían realizar las actividades que se detallan a continuación:

- ☞ Estudiar la expresión de la enzima Carbamato Quinasa mediante RT-PCR, extrayendo ARN de cultivos de *Pseudomonas* sp. AU10 en distintas fases de crecimiento.
- ☞ Analizar con mayor profundidad los polisacáridos presentes en los EPS de AU10 a 4 °C y 30 °C mediante HPLC.
- ☞ Analizar los lipopolisacáridos de AU10 a bajas y altas temperaturas como otra molécula que sufre modificaciones por el frío.
- ☞ Estudiar si la serín proteasa JSP8A identificada en *Janthinobacterium* sp. AU11 se está expresando, mediante RT-PCR.
- ☞ Identificar el gen que codifica para la metalo proteasa de AU11 mediante el diseño de cebadores degenerados basados en la secuencia de los péptidos identificados por espectrometría de masas.

***REFERENCIAS***

***BIBLIOGRÁFICAS***

## REFERENCIAS

- Acevedo, J. P., Reyes, F., Parra, L. P., Salazar, O., Andrews, B. a, & Asenjo, J. a. (2008). Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique. *Journal of biotechnology*, 133(3), 277-86. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.10.004
- Allen, M. a, Lauro, F. M., Williams, T. J., Burg, D., Siddiqui, K. S., De Francisci, D., Chong, K. W. Y., et al. (2009). The genome sequence of the psychrophilic archaeon, *Methanococcoides burtonii*: the role of genome evolution in cold adaptation. *The ISME journal*, 3(9), 1012-35. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ismej.2009.45
- Aseev, L. V., Levandovskaya, A. a, Tchufistova, L. S., Scaptsova, N. V., & Boni, I. V. (2008). A new regulatory circuit in ribosomal protein operons: S2-mediated control of the *rpsB-tsf* expression in vivo. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(9), 1882-94. doi:10.1261/rna.1099108
- Ayub, N. D., Pettinari, M. J., Méndez, B. S., & López, N. I. (2007). The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*, 58(3), 240-248. doi:10.1016/j.plasmid.2007.05.003
- Bach, E., Cannavan, F. S., Duarte, F. R. S., Taffarel, J. A. S., Tsai, S. M., & Brandelli, A. (2011). Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(1), 102-107.
- Berlemont, R., Delsaute, M., Pipers, D., D'Amico, S., Feller, G., Galleni, M., & Power, P. (2009). Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples. *The ISME journal*, 3(9), 1070-81. doi:10.1038/ismej.2009.48
- Berlemont, R., Pipers, D., Delsaute, M., Angiono, F., Feller, G., Galleni, M., & Power, P. (2011). Exploring the Antarctic soil metagenome as a source of novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements. *Revista Argentina de microbiología*, 43(2), 94-103. doi:10.1590/S0325-75412011000200005
- Bhakoo, M., & Herbert, R. A. (1980). Fatty acid and phospholipid composition of five psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown at different temperatures. *Archives of microbiology*, 126(1), 51-55.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911 - 917. doi:10.1139/o59-099

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Boni, I. V., Artamonova, V. S., Tzareva, N. V., & Dreyfus, M. (2001). Non-canonical mechanism for translational control in bacteria: synthesis of ribosomal protein S1. *The EMBO journal*, 20(15), 4222-32. doi:10.1093/emboj/20.15.4222
- Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 277(1683), 819-27. doi:10.1098/rspb.2009.1679
- Bozal, N., Montes, M. J., & Mercadé, E. (2007). *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(Pt 11), 2609-12. doi:10.1099/ijs.0.65141-0
- Brüssow, H. (2012). *Pseudomonas* biofilms, cystic fibrosis, and phage: a silver lining? *mBio*, 3(2). doi:10.1128/mBio.00061-12.
- Carpenter, E. J., Lin, S., & Capone, D. G. (2000). Bacterial activity in South Pole snow. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4514-7.
- Casanueva, A., Tuffin, M., Cary, C., & Cowan, D. a. (2010). Molecular adaptations to psychrophily: the impact of "omic" technologies. *Trends in microbiology*, 18(8), 374-81. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.tim.2010.05.002
- Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D., & Sowers, K. R. (2002). Low-temperature extremophiles and their applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 253-261. doi:10.1016/S0958-1669(02)00317-8
- Chattopadhyay, M. K. (2002). Bacterial cryoprotectants. *Resonance*, (November), 59-63.
- Chattopadhyay, M. K. (2006). Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *Journal of biosciences*, 31(1), 157-65.
- Chong, C. W., Dunn, M. J., Convey, P., Tan, G. Y. A., Wong, R. C. S., & Tan, I. K. P. (2009). Environmental influences on bacterial diversity of soils on Signy Island, maritime Antarctic. *Polar Biology*, 32(11), 1571-1582. doi:10.1007/s00300-009-0656-8
- Clocksins, K. M., Jung, D. O., & Madigan, M. T. (2007). Cold-active chemoorganotrophic bacteria from permanently ice-covered Lake Hoare, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and environmental microbiology*, 73(9), 3077-83. doi:10.1128/AEM.00085-07
- Deming, J. W. (2009). Extremophiles: Cold Environments. In M. Schaechter (Ed.), *The Desk Encyclopedia of Microbiology* (2nd ed., pp. 483 - 494). San Diego: Elsevier Inc.
- Dieser, M., Greenwood, M., & Foreman, C. M. (2010). Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental

## BIBLIOGRAFÍA

---

- stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 42(4), 396-405. doi:10.1657/1938-4246-42.4.396
- D'Amico, S., Collins, T., Marx, J.-C., Feller, G., & Gerday, C. (2006). Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO reports*, 7(4), 385-9. doi:10.1038/sj.embor.7400662
- Donia, M., Ravel, J., & Schmidt, E. W. (2008). A global assembly line to cyanobactins. *Nature Chemical biology*, 4(6): 341–343. doi:10.1038/nchembio.84.
- Fonseca, P., Moreno, R., & Rojo, F. (2011). Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Environmental Microbiology Reports*, 3(3), 329-339. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00229.x
- García-Echauri, S. a, Gidekel, M., Gutiérrez-Moraga, a, Santos, L., & De León-Rodríguez, a. (2011). Isolation and phylogenetic classification of culturable psychrophilic prokaryotes from the Collins glacier in the Antarctica. *Folia microbiologica*, 56(3), 209-14. doi:10.1007/s12223-011-0038-9
- Gerday, C., Aittaleb, M., Bentahir, M., Chessa, J. P., Claverie, P., Collins, T., D'Amico, S., et al. (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in biotechnology*, 18(3), 103-7.
- Gianese, G., Argos, P., & Pascarella, S. (2001). Structural adaptation of enzymes to low temperatures. *Protein engineering*, 14(3), 141-8.
- Gillis, M., & De Ley, J. (2006). The Genera *Chromobacterium* and *Janthinobacterium*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *Prokaryotes* (2nd ed., pp. 737-746). Springer New York. doi:10.1007/0-387-30745-1
- Gounot, A. M. (1986). Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experientia*, 42, 1192-1197.
- Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(1), 15-32. doi:10.1007/s00253-002-0975-y
- Hakvåg, S., Fjaervik, E., Klinkenberg, G., Borgos, S. E. F., Josefsen, K. D., Ellingsen, T. E., & Zotchev, S. B. (2009). Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of costal waters in Trøndelag, Norway. *Marine drugs*, 7(4), 576-88. doi:10.3390/md7040576
- Heath, C., Hu, X. P., Cary, S. C., & Cowan, D. (2009). Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. *Applied and environmental microbiology*, 75(13), 4657-9. doi:10.1128/AEM.02597-08

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Hu, X., Heath, C., Taylor, M., Tuffin, M., & Cowan, D. (2012). A novel, extremely alkaliphilic and cold-active esterase from Antarctic desert soil. *Extremophiles*, 16(1), 79-86. Springer Japan. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s00792-011-0407-y>
- Huston, A. L., Methe, B., Deming, J. W., & Icrobiol, A. P. P. L. E. N. M. (2004). Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-ctive Aminopeptidase Produced by Marine Psychrophile *Colwellia psychrerythraea* Strain 34H. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3321-3328. doi:10.1128/AEM.70.6.3321
- Ingraham, J. L., & Stokes, J. L. (1959). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 23(28), 97-108.
- Jagannadham, M V, Chattopadhyay, M. K., Subbalakshmi, C., Vairamani, M., Narayanan, K., Rao, C. M., & Shivaji, S. (2000). Carotenoids of an Antarctic psychrotolerant bacterium, *Sphingobacterium antarcticus*, and a mesophilic bacterium, *Sphingobacterium multivorum*. *Archives of microbiology*, 173(5-6), 418-24.
- Jagannadham, Medicharla Venkata, & Chowdhury, C. (2012). Differential expression of membrane proteins helps Antarctic *Pseudomonas syringae* to acclimatize upon temperature variations. *Journal of proteomics*, 75(8), 2488-99. Elsevier B.V. doi:10.1016/j.jprot.2012.02.033
- Johnsen, M. G., Hansen, O. C., & Stougaard, P. (2010). Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium* sp. strain 4239. *Microbial cell factories*, 9, 5. doi:10.1186/1475-2859-9-5
- Kasana, Ramesh C. (2011). Cold-environment metagenomics for discovering novel microorganisms and enzymes. *African Journal of Microbiology Research*, 5(26), 4449-4454. doi:10.5897/AJMR11.658
- Kasana, Ramesh Chand. (2010). Proteases from psychrotrophs: an overview. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 134-45. doi:10.3109/10408410903485525
- Kiko, R. (2010). Acquisition of freeze protection in a sea-ice crustacean through horizontal gene transfer. *Polar Biology*, 33(4), 543-556. Springer Berlin / Heidelberg.
- Kiran, M. D., Prakash, J. S. S., Annapoorni, S., Dube, S., Kusano, T., Okuyama, H., Murata, N., et al. (2004). Psychrophilic *Pseudomonas syringae* requires trans-monounsaturated fatty acid for growth at higher temperature. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 8(5), 401-10. doi:10.1007/s00792-004-0401-8
- Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345-351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Kumar, D., Savitri, N., Thakur, R., & Bhalla, T. C. (2008). Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Research Journal of Microbiology*, 3(12), 661 - 672.
- Kumar, G., & Jagannadham, M. (2002). Low-temperature-induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. *Journal of bacteriology*, 184(23), 6746-6749. doi:10.1128/JB.184.23.6746
- Kumar, L., Awasthi, G., & Singh, B. (2011). Extremophiles a novel source of industrially important enzymes. *Biotechnology*, 10(2), 121-135.
- Kurihara, T., & Esaki, N. (2008). Proteomic studies of psychrophilic. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology* (pp. 333-343).
- Lincoln, S. P., Fermor, T. R., & Tindall, B. J. (1999). a soft rot pathogen of *Agaricus bisporus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(4), 1577-1589.
- Lones, T. E. (1912). Celestial, atmospheric and terrestrial phenomena. *Aristotle's researches in Natural Sciences* (pp. 28 - 60). London: West, Newman & Co.
- Lucas, F. S., Broennimann, O., Febbraro, I., & Heeb, P. (2003). High diversity among feather degrading bacteria from a Dry Meadow soil. *Microbial Ecology*, 45(3), 282-290.
- López-García, P., Brochier, C., Moreira, D., & Rodríguez-Valera, F. (2003). Comparative analysis of a genome fragment of an uncultivated mesopelagic crenarchaeote reveals multiple horizontal gene transfers. *Environmental Microbiology*, 6(1), 19-34. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00533.x
- Ma, Y., Wang, L., & Shao, Z. (2006). *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environmental Microbiology*, 8(3), 455-465. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00911.x
- Madigan, M. T., & Martinko, M. J. (2006a). Environmental effects on microbial growth: temperature. *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed., pp. 150-154). Pearson Prentice Hall.
- Madigan, M. T., & Martinko, M. J. (2006b). Cell structure and function. *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Mancuso Nichols, C., Guezennec, J., & Bowman, J. P. (2005). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 7(4), 253-71. doi:10.1007/s10126-004-5118-2

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Mancuso Nichols, Carol, Bowman, J. P., & Guezennec, J. (2005). Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic Sea ice bacterium grown in batch culture. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 3519-3523. doi:10.1128/AEM.71.7.3519
- Mancuso Nichols, Carol, Lardièrre, S. G., Bowman, J. P., Nichols, P. D., Gibson, J. A. E., & Guézennec, J. (2005). Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria ANTARCTIC MARINE BACTERIA Common wealth Scientific and Industrial Research Organization , Marine. *Microbial Ecology*, 49(5), 578-589.
- Mancuso Nichols, C a, Garon, S., Bowman, J. P., Raguénès, G., & Guézennec, J. (2004). Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *Journal of applied microbiology*, 96(5), 1057-66. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02216.x
- Margesin, R, Neuner, G., & Storey, K. B. (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals--fundamental and applied aspects. *Die Naturwissenschaften*, 94(2), 77-99. doi:10.1007/s00114-006-0162-6
- Margesin, Rosa, & Miteva, V. (2011). Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in microbiology*, 162(3), 346-61. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.resmic.2010.12.004
- Martínez-Rosales, C., & Castro-Sowinski, S. (2011). Antarctic bacterial isolates that produce cold-active extracellular proteases at low temperature but are active and stable at high temperature. *Polar Research*, 30. doi:10.3402/polar.v30i0.7123
- Martínez-Rosales, C., Fullana, N., Musto, H., & Castro-Sowinski, S. (2012). Antarctic DNA moving forward: genomic plasticity and biotechnological potential. *FEMS microbiology letters*, 1-9. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02531.x
- Marx, J. G., Carpenter, S. D., & Deming, J. W. (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharides substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 63-72.
- Marx, J.-C., Collins, T., D'Amico, S., Feller, G., & Gerday, C. (2007). Cold-adapted enzymes from marine Antarctic microorganisms. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 9(3), 293-304. doi:10.1007/s10126-006-6103-8
- Metpally, R. P. R., & Reddy, B. V. B. (2009). Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins. *BMC genomics*, 10, 11. doi:10.1186/1471-2164-10-11
- Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Martins, V. A. P., & Santos, D. O. S. (2006). Nonmedical: *Pseudomonas*. *The Prokaryotes* (pp. 646-703). doi:10.1007/0-387-30746-x

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Moreira, D., Rodríguez-Valera, F., & López-García, P. (2006). Metagenomic analysis of mesopelagic Antarctic plankton reveals a novel deltaproteobacterial group. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 2), 505-17. doi:10.1099/mic.0.28254-0
- Morgan-kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-savitch, L., & Huner, N. P. A. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 222-252. doi:10.1128/MMBR.70.1.222
- Morita, R. Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 39(2), 144-167.
- Moyer, C. L., & Morita, R. (2007). Psychrophiles and psychrotrophs. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9780470015902.a0000402.pub2
- Niederberger, T. D., McDonald, I. R., Hacker, A. L., Soo, R. M., Barrett, J. E., Wall, D. H., & Cary, S. C. (2008). Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 10(7), 1713-1724. Blackwell Publishing Ltd. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01593.x
- Peeters, K., Ertz, D., & Willems, A. (2011). Culturable bacterial diversity at the Princess Elisabeth Station (Utsteinen, Sør Rondane Mountains, East Antarctica) harbours many new taxa. *Systematic and applied microbiology*, 34(5), 360-7. Elsevier GmbH. doi:10.1016/j.syapm.2011.02.002
- Pesciaroli, C., Cupini, F., Selbmann, L., Barghini, P., & Fenice, M. (2011). Temperature preferences of bacteria isolated from seawater collected in Kandalaksha Bay, White Sea, Russia. *Polar Biology*, 35(3), 435-445. doi:10.1007/s00300-011-1091-1
- Piette, F., Cipolla, A., Struvay, C., & Feller, G. (2011). Psychrophilic enzymes: cool responses to chilly problems. In K. Horikoshi (Ed.), *Extremophiles Handbook* (pp. 892 - 911). Tokyo: Springer Japan. doi:10.1007/978-4-431-53898-1
- Piette, F., D'Amico, S., Mazzucchelli, G., Danchin, A., Leprince, P., & Feller, G. (2011). Life in the cold: a proteomic study of cold-repressed proteins in the antarctic bacterium pseudoalteromonas haloplanktis TAC125. *Applied and environmental microbiology*, 77(11), 3881-3. doi:10.1128/AEM.02757-10
- Pini, F., Grossi, C., Nereo, S., Michaud, L., Giudice, A. L., Bruni, V., Baldi, F., et al. (2007). Molecular and physiological characterisation of psychrotrophic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Terra Nova Bay (Antarctica). *European Journal of Soil Biology*, 43(5-6), 368-379. doi:10.1016/j.ejsobi.2007.03.012
- Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, 8(6), 1779-802. doi:10.3390/md8061779

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Pulicherla, K. K., Ghosh, M., Kumar, P. S., & Rao, K. R. S. S. (2011). Psychrozymes- The next generation industrial enzymes. *Journal of Marine Science: Research & Development*, 01(01), 1-7. doi:10.4172/2155-9910.1000102
- Qin, G., Zhu, L., Chen, X., Wang, P. G., & Zhang, Y. (2007). Structural characterization and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the deep-sea psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913. *Microbiology (Reading, England)*, 153(Pt 5), 1566-72. doi:10.1099/mic.0.2006/003327-0
- Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C., & Moëgne-Loccoz, Y. (2008). The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*, 321(1-2), 341-361. doi:10.1007/s11104-008-9568-6
- Rao, M. B., Tanksale, a M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 62(3), 597-635.
- Rawlings, N D, & Barrett, a J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *The Biochemical journal*, 290 ( Pt 1, 205-18.
- Rawlings, Neil D, Barrett, A. J., & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research*, 38(Database issue), D227-33. doi:10.1093/nar/gkp971
- Ray, M. K. (2006). Cold-stress response of low temperature adapted bacteria. In A. S. Sreedhar & U. K. Srinivas (Eds.), *Stress Response: A molecular biology approach* (Vol. 661, pp. 1-23).
- Ray, M. K., Kumar, G. S., Janiyani, K., Kannan, K., Jagtap, P., Basu, M. K., & Shivaji, S. (1998). Adaptation to low temperature and gene expression in antarctic bacteria. *J. Biosc.*, 23(4), 423 - 435.
- Ray, M. K., Kumar, G. S., & Shivaji, S. (1994a). Phosphorylation of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotroph *Pseudomonas syringae*: a possible role in temperature adaptation. *Journal of bacteriology*, 176(14), 4243-9.
- Ray, M. K., Kumar, G. S., & Shivaji, S. (1994b). Phosphorylation of membrane proteins in response to temperature in an Antarctic *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, 140, 3217-3223.
- Raymond, J. a, Fritsen, C., & Shen, K. (2007). An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. *FEMS microbiology ecology*, 61(2), 214-21. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00345.x
- Reddy, G. S. N. (2004). Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas*

## BIBLIOGRAFÍA

---

- proteolytica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(3), 713-719. doi:10.1099/ijs.0.02827-0
- Rodrigues, D. F., & Tiedje, J. M. (2008). Coping with our cold planet. *Applied and environmental microbiology*, 74(6), 1677-86. doi:10.1128/AEM.02000-07
- Russell, N. (2008). Membrane components and cold sensing. In R Margesin, F. Schinner, J. Marx, & C. Gerday (Eds.), *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology* (pp. 177-190). Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag.
- Salahuddin, P., & Khan, A. U. (2008). Proteolytic Enzymes Database. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 01(02), 109-111. doi:10.4172/jpb.1000017
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Satyanarayana, T., Chandralata, R., & Shivaji, S. (2005). extremophilic microbes diversity and perspectives. *Current Science*, 89(1), 78 - 90.
- Saunders, N. F. W., Thomas, T., Curmi, P. M. G., Mattick, J. S., Kuczek, E., Slade, R., Davis, J., et al. (2003). Mechanisms of thermal adaptation revealed from the genomes of the Antarctic Archaea *Methanogenium frigidum* and *Methanococcoides burtonii*. *Genome research*, 13(7), 1580-8. doi:10.1101/gr.1180903
- Schloss, P. D., Allen, H. K., Klimowicz, A. K., Mlot, C., Gross, J. a, Savengsuksa, S., McEllin, J., et al. (2010). Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. *DNA and cell biology*, 29(9), 533-41. doi:10.1089/dna.2010.1020
- Shi, Y.-L., Lu, X.-Z., & Yu, W.-G. (2008). A new  $\beta$ -agarase from marine bacterium *Janthinobacterium* sp. SY12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2659-2664. doi:10.1007/s11274-008-9792-5
- Shivaji, S, Rao, N. S., Saisree, L., Sheth, V., Reddy, G. S., & Bhargava, P. M. (1989). Isolation and identification of *Pseudomonas* spp. from Schirmacher Oasis, Antarctica. *Applied and environmental microbiology*, 55(3), 767-70.
- Shivaji, S, Ray, M. K., Kumar, G. S., Reddy, G. S. N., Saisree, L., & Wynn-williams, D. D. (1991). Identification of *Janthinobacterium fividum* from the soils of the islands of Scotia Ridge and from Antarctic peninsula. *Polar Biology*, 11, 267-271.
- Shivaji, S, Kiran, M., & Chintalapati, S. (2007). Perception and transduction of low temperature in bacteria. In C. Gerday & N. Glansdorff (Eds.), *Physiology and biochemistry of extremophiles* (pp. 194-207). Washington DC: ASM Press.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Shivaji, S., & Prakash, J. S. S. (2010). How do bacteria sense and respond to low temperature? *Archives of microbiology*, 192(2), 85-95. doi:10.1007/s00203-009-0539-y
- Shivaji, Sisinthy, Kumari, K., Kishore, K. H., Pindi, P. K., Rao, P. S., Radha Srinivas, T. N., Asthana, R., et al. (2011). Vertical distribution of bacteria in a lake sediment from Antarctica by culture-independent and culture-dependent approaches. *Research in microbiology*, 162(2), 191-203. Elsevier Masson SAS. doi:10.1016/j.resmic.2010.09.020
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Singh, L., & Ramana, K. V. (1998). *Isolation and Characterization of Psychrotrophic Antarctic Bacteria from Blue-green Algal Mats and their Hydrolytic Enzymes* (pp. 199-206).
- Song, J. M., Nam, K., Sun, Y.-U., Kang, M. H., Kim, C.-G., Kwon, S.-T., Lee, J., et al. (2010). Molecular and biochemical characterizations of a novel arthropod endo- $\beta$ -1,3-glucanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*, horizontally acquired from bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155(4), 403-412. doi:10.1016/j.cbpb.2010.01.003
- Teixeira, L. C. R. S., Peixoto, R. S., Cury, J. C., Sul, W. J., Pellizari, V. H., Tiedje, J., & Rosado, A. S. (2010). Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. *The ISME journal*, 4(8), 989-1001. Nature Publishing Group. doi:10.1038/ismej.2010.35
- Tindall, B. J. (2004). Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microbial ecology*, 47(3), 271-83. doi:10.1007/s00248-003-1050-7
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(9), 785-99. doi:10.1038/nrd2092
- Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551-60.
- Van den Burg, B. (2003). Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 213-218. doi:10.1016/S1369-5274(03)00060-2
- Vazquez, S. C., Coria, S. H., & Mac Cormack, W. P. (2004). Extracellular proteases from eight psychrotolerant antarctic strains. *Microbiological Research*, 159(2), 157-166. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2004.03.001>
- Vazquez, S., Ruberto, L., & Mac Cormack, W. (2005). Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant ; & *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil. *Polar Biology*, 28(4), 319-325. Springer Berlin / Heidelberg.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Wang, Q.-F., Hou, Y.-H., Xu, Z., Miao, J.-L., & Li, G.-Y. (2008). Purification and properties of an extracellular cold-active protease from the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. NJ276. *Biochemical Engineering Journal*, 38(3), 362-368. doi:10.1016/j.bej.2007.07.025
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, 97(2), 250-6. doi:10.1094/PHYTO-97-2-0250
- Williams, B. J., Du, R.-H., Calcutt, M. W., Abdolrasulnia, R., Christman, B. W., & Blackwell, T. S. (2010). Discovery of an operon that participates in agmatine metabolism and regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 76(1), 104-19. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07083.x
- Wilmes, B., Kock, H., Glagla, S., Albrecht, D., Voigt, B., Markert, S., Gardebrecht, A., et al. (2011). Cytoplasmic and periplasmic proteomic signatures of exponentially growing cells of the psychrophilic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125. *Applied and environmental microbiology*, 77(4), 1276-83. doi:10.1128/AEM.01750-10
- Wilson, D. N., & Nierhaus, K. H. (2005). Ribosomal proteins in the spotlight. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 40(5), 243-67. doi:10.1080/10409230500256523
- Xiao, X., Li, M., You, Z., & Wang, F. (2007). Bacterial communities inside and in the vicinity of the Chinese Great Wall Station, King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*, 19(01), 11-16. doi:10.1017/S095410200700003X
- Xiao, X., Yin, X., Lin, J., Sun, L., You, Z., Wang, P., & Wang, F. (2005). Chitinase Genes in Lake Sediments of Ardley Island, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 7904-7909. doi:10.1128/AEM.71.12.7904
- Zhang, Yingjing, Zhao, J., & Zeng, R. (2011). Expression and characterization of a novel mesophilic protease from metagenomic library derived from Antarctic coastal sediment. *Extremophiles*, 15(1), 23-29. Springer Japan.
- Zhang, Yuhong. (2009). Lipase diversity in glacier soil based on analysis of metagenomic DNA fragments and cell culture. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 888-897. doi:10.4014/jmb.0812.695
- Ziemert, N., Ishida, K., Quillardet, P., Bouchier, C., Hertweck, C., Tandeau de Marsac, N., & Dittmann, E. (2008). Microcyclamide biosynthesis in two strains of *Microcystis aeruginosa*: from structure to genes and vice versa. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1701-1797. American Society for Microbiology.

# ***ANEXOS***

## I. MEDIOS DE CULTIVO

LB	
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O	csp 1 L

LB 1/20	
Triptona	0,5 g
Extracto de Levadura	0,25 g
NaCl	0,5 g
H <sub>2</sub> O	csp 1 L

LB agar	
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	18 g
H <sub>2</sub> O	csp 1 L

ML	
Triptona	1 g
Extracto de Levadura	0,5 g
NaCl	1 g
H <sub>2</sub> O	csp 500ml
Se prepara y esteriliza. A parte se prepara el mismo volumen de leche descremada al 10% y se esteriliza por separado durante 8 min. Finalmente se mezclan ambas preparaciones.	

ML agar	
Triptona	1 g
Extracto de Levadura	0,5 g
NaCl	1 g
Agar	18 g
H <sub>2</sub> O	csp 500 ml
Se prepara y esteriliza. A parte se prepara el mismo volumen de leche descremada al 10% y se esteriliza por separado durante 8 min. Finalmente se mezclan ambas preparaciones.	

## II. "BUFFERS"

BUFFER TAE 0,5X	
Tris	2,42 g
Ácido Acético Glacial	0,57 ml
EDTA 0,5M pH 8	1 ml
H <sub>2</sub> O	csp 1 L

BUFFER FOSFATO 100mM pH7	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	57,7 ml
NaHPO <sub>4</sub>	42,3 ml
H <sub>2</sub> O	csp 1L

BUFFER CORRIDA PROTEINAS CON SDS 1X pH 8,3	
Tris Base	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
H <sub>2</sub> O	csp 1 L

BUFFER TRIS 0,5M pH7,6	
Tris Base	60,57 g
Diluir en 800 ml de H <sub>2</sub> O	
Ajustar el pH con HCl concentrado	
Completar el volumen a 1 L	

BUFFER MUESTRA/CARGA 5X	
Buffer Tris 1M pH 6,8	3,75 ml
SDS 20%	3 ml
Azul de Bromofenol	9 mg
Glicerol	4,5 ml
H <sub>2</sub> O	Csp 10,5 ml
Al momento de usar el "buffer" agregarle DTT 1M en un volumen tal que quede en una concentración total de 40mM	

BUFFER UREA	
Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	4%

BUFFER REHIDRATACIÓN	
Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	2 %
Buffer IPG 3-11 NL	0,5 %
Azul de bromofenol	0,002 %

## ANEXOS

---

<b>BUFFER TRIS 1,5M pH8,8</b>	
<b>Tris Base</b>	90,9g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Csp 500ml
Se pesa el Tris y disuelve en parte del H <sub>2</sub> O. Se ajusta el pH y luego se completa el volumen con H <sub>2</sub> O.	

<b>BUFFER TRIS 1,0M pH6,8</b>	
<b>Tris Base</b>	60,4 g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	csp 500ml
Se pesa el Tris y disuelve en parte del H <sub>2</sub> O. Se ajusta el pH y luego se completa el volumen con H <sub>2</sub> O.	

**III. BASES DEGENERADAS**

<b>BASE DEGENERADA</b>	<b>EQUIVALENCIA</b>
<b>R</b>	A,G
<b>Y</b>	C,T
<b>M</b>	A,C
<b>K</b>	G,T
<b>S</b>	C,G
<b>W</b>	A,T
<b>H</b>	A,C,T
<b>B</b>	C,G,T
<b>V</b>	A,C,G
<b>D</b>	A,G,T
<b>N</b>	A,C,G,T

**IV. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS**

<b>GEL SEPARADOR 12% DESNATURALIZANTE</b>	
H <sub>2</sub> O	1,6 ml
BUFFER TRIS 1,5M pH 8,8	1,3 ml
SDS 10%	0,05 ml
ACRILAMIDA MIX 30%	2,0 ml
TEMED	0,002 ml
PSA	0,05 ml

<b>GEL CONCENTRADOR 5% DESNATURALIZANTE</b>	
H <sub>2</sub> O	3,4 ml
BUFFER TRIS 1,0M pH 6,8	0,63 ml
SDS 10%	0,05 ml
ACRILAMIDA MIX 30%	0,83 ml
TEMED	0,005 ml
PSA	0,05 ml

<b>SOLUCIÓN DE TINCIÓN</b>	
H <sub>2</sub> O	500 ml
EtOH	400 ml
Ácido Acético Glacial	100 ml
Azul Brillante Coomassie R250	1g

<b>SOLUCIÓN DECOLORANTE</b>	
H <sub>2</sub> O	500 ml
EtOH	400 ml
Ácido Acético Glacial	100 ml

## ***V. ENSAYO DE ANTHRONE***

1. Preparar una solución de Anthrone 0,2 % en Ácido Sulfúrico 95%.
2. Se mezclan 3 volúmenes de solución de Anthrone con 1 volumen de solución con la muestra.
3. Se calienta 10 min a 80 – 90 °C.
4. Se deja enfriar por 30 min aproximadamente.
5. Se mide absorbancia a 620nm.

## **VI. CÉLULAS COMPETENTES**

Las células quimio-competentes se realizaron de la siguiente forma:

1. se creció 250ml de un cultivo de *E. coli* DH5 $\alpha$  en medio LB A 37 °C, con agitación constante (200rpm) hasta llegar a una D.O. (densidad óptica) a 620 nm de 0,3.
2. Se centrifugó durante 10 min a 5000rpm y 4 °C.
3. El sobrenadante se descartó, y el “pellet” se lavó con 100ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M (estéril y frío).
4. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante, y el “pellet” celular se resuspendió en 100 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M. Se incubó en hielo durante 1h.
5. Se centrifugó nuevamente, y el “pellet” se resuspendió en 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M con 20% de Glicerol, siempre en frío.
6. Las células se alicuotaron y almacenaron a -80 °C hasta su uso.