

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS POR *Rhodobacter capsulatus* B10S EN RESPUESTA A LA PRESENCIA DE 2,4-DINITROFENOL.

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF PROTEINS BY *Rhodobacter capsulatus* B10S IN RESPONSE TO THE PRESENCE OF 2,4-DINITROPHENOL.

**Por: Rito Herrera¹, Eva Pérez-Reinado², Víctor Luque-Almagro²,
Conrado Moreno-Vivián², María Dolores Roldán²**

¹ República de Panamá, Universidad de Panamá, Departamento de Genética y Biología Molecular. Email: rhv76@yahoo.es

² España, Córdoba, Universidad de Córdoba, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Págs.: 95-117

Recibido: 01/ago/2017

Aprobado: 01/sep/2017

Artículo

5

RESUMEN

Los compuestos nitrofenólicos son utilizados como intermediarios en la producción de fármacos, colorantes, pesticidas, conservantes de la madera y explosivos. El 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) es un compuesto tóxico y persistente considerado contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Se ha seleccionado la cepa bacteriana *Rhodobacter capsulatus* B10S, perteneciente al grupo de las bacterias rojas fotosintéticas (*Rhodospirillales*), este microorganismo fotorreduce el 2,4-dinitrofenol a 2-amino-4-nitrofenol (ANP) en anaerobiosis, mediante una actividad nitrofenol reductasa que se induce en presencia de nitrofenoles y se reprime en células cultivadas con amonio. El 2,4-DNP es un desacoplante energético que inhibe fuertemente la fijación de nitrógeno en *R. capsulatus*. De hecho, esta bacteria sólo puede crecer diazotróficamente (condiciones de fijación de nitrógeno), cuando el 2,4-DNP se ha transformado casi en su totalidad en ANP. El objetivo del presente estudio es determinar la expresión diferencial de proteínas (inducción, represión, sobreexpresión) mediante electroforesis bidimensional en *R. capsulatus* B10S, en presencia de 2,4-DNP, en células cultivadas en amonio y en condiciones diazotróficas.

Palabras clave: 2,4-DNP, amonio, expresión diferencial, proteínas.

Abstract

The Nitrophenol compounds are used as intermediates in the production of pharmaceuticals, dyes, pesticides, wood preservatives and explosives. 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP) is a toxic and persistent pollutant compound considered a priority by the Agency for Environmental Protection (EPA). Is selected *Rhodobacter capsulatus* B10S bacterial strain belonging to the group of the red photosynthetic bacteria (Rhodospirillales), this organism fotorreduce 2,4-dinitrophenol, 2-amino-4-nitrophenol (ANP) under anaerobic conditions, using a nitrophenol reductase activity which is induced in the presence of nitrophenols and repressed in cells cultured with ammonium. 2,4-DNP is an uncoupling energy that strongly inhibits nitrogen fixation in *R. capsulatus*. In fact, this bacteria can only grow diazotrofically (nitrogen fixation conditions) when the 2,4-DNP has become almost entirely in ANP. The aim of this study is to determine the differential expression of proteins (induction, repression, overexpression) by two-dimensional electrophoresis *R. capsulatus* B10S, in the presence of 2,4-DNP, in cultured cells and ammonium daizotrofic conditions. For cells grown in ammonium (RCVNH₄) ammonium and more DNP (RCVNH₄DNP) gels and 17 cm pH range 5-8, thirteen patches (protein) were detected, which once identified, are expected to provide information on the effect of the consumption of ammonium 2,4-DNP, regulating their transport into the cell, expression of gene (s) of nitroreductase (s), nitroreductase activity and the electron donor (s) nitroreductase (s) .

Keywords: 2,4-DNP, ammonium, differential expression, proteins

INTRODUCCIÓN

Las bacterias usan una amplia variedad de compuestos orgánicos como fuentes de energía y/o carbono. A parte de compuestos biogénicos, muchas especies bacterianas son capaces de atacar xenobióticos, compuestos sintetizados por los humanos, que presentan una estructura más o menos diferente a los compuestos naturales o sintetizados por los seres vivos. Sin embargo, su papel en los procesos de biorremediación está a menudo limitado por las bajas tasas de conversión, las cuales pueden estar afectadas por condiciones ambientales desfavorables como temperaturas adversas, deficiencias nutricionales, falta de aceptores de electrones y los efectos tóxicos de los xenobióticos. Diferentes compuestos de este tipo, tienen efectos deletéreos en numerosos sitios dentro de las células. Dependiendo de sus propiedades físicas y químicas, diferentes xenobióticos provocan un incremento en la fluidez de la membrana (Isken y de Bont, 1998), disminución de la síntesis de ATP (Loffhagen *et al.*, 1997) y modificación o desnaturalización de biomoléculas en bacterias (Tamarit *et al.*, 1998). Diversos tipos de respuestas, como cambios en la composición de los lípidos de la membrana (Loffhagen *et al.*, 1995), modificación de la hidrofobicidad de la célula (Isken y de Bont, 1998), e incremento en los niveles de proteínas específicas, manifestándose una en la inestabilidad de las células.

El análisis de las respuestas bacterianas a diversos hidrocarburos aromáticos por proteómica, ha demostrado como observación general, la regulación completa de proteínas específicas de rutas metabólicas, junto con varias proteínas de estrés asociadas con calor, adaptación al frío, estrés oxidativo, choque osmótico y falta de nutrientes (Methe *et al.*, 2005). Se sugiere que un número de elementos están involucrados en la respuesta a estos químicos tóxicos: (i) enzimas implicadas en el metabolismo de hidrocarburos tóxicos, las cuales pueden contribuir a su transformación en compuestos no tóxicos.; (ii) rigidez de la membrana celular por alteración de la composición de los fosfolípidos; (iii) alteraciones en la superficie celular que hacen que las células pierdan permeabilidad; (iv) flujo de un compuesto tóxico en los procesos dependientes de energía y (v) formación de vesículas que remueven solventes de la superficie celular (Ramos *et al.*, 1998). Se ha reportado la identificación de diversas proteínas inducidas por hidrocarburos poliaromáticos en *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, incluyendo una catalasa-peroxidasa, una monoxigenasa, una dioxigenasa, una pequeña subunidad de dioxigenasa inducible por naftaleno

y una aldehído deshidrogenasa. Así como proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, transcripción del ADN, proteínas de choque térmico y de producción de energía (Kim *et al.*, 2004).

El análisis del proteoma de bacterias involucradas en biorremediación, nos permite comprender cómo las bacterias reaccionan ante la presencia de sustratos hidrocarbonados aromáticos tóxicos. La degradación aromática en bacterias es un complejo fenómeno que engloba no sólo enzimas catabólicas, sino también proteínas de choque térmico y proteínas de membrana. El análisis proteómico de la respuesta de los microorganismos a los hidrocarburos aromáticos, lo cuales inducen estrés, puede proveer una visión más global de los mecanismos involucrados en la respuesta adaptativa a químicos con una toxicidad establecida. La identificación de las proteínas implicadas puede ayudar a elucidar mecanismos de defensa, detoxificación y adaptación. El papel de σ^{54} en la respuesta fisiológica de *Pseudomonas alcaligenes* P25X a la inducción por gentisato (2,5- dihidroxibenzoato) fue estimado por comparación de los perfiles de expresión proteica de la cepa silvestre P25X con el mutante *rpoN* de la cepa G54 (Zhao *et al.*, 2005). La identificación de las proteínas por MALDI-TOF/TOF revela que una amplia diversidad de las mismas fue afectada por la mutación de σ^{54} , el grupo más grande de proteínas que están involucradas en el metabolismo del carbono. Esto incluye la estrictamente inducible gentisato 1,2-dioxigenasa, una de las dos enzimas isofuncionales claves en la vía del gentisato y enzimas del ciclo de Krebs, del metabolismo del piruvato y de la gluconeogénesis. Otras proteínas que son parte del regulón σ^{54} incluyen enzimas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, transporte de proteínas, proteínas de respuesta a estrés y otras involucradas en la motilidad celular. Los resultados de este estudio muestran que σ^{54} tiene un papel regulador global en la expresión de una amplia variedad de genes de diversas funciones en *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (Zhao y Poh, 2008).

Además, la electroforesis bidimensional es una poderosa herramienta para investigar los mecanismos empleados por las bacterias para degradar hidrocarburos aromáticos y las respuestas fisiológicas asociadas. Desde que se desarrolló la electroforesis bidimensional, mostrándose todas las proteínas bacterianas solubles expresadas bajo condiciones específicas de cultivo, se ha logrado un mejor entendimiento de las proteínas de transporte involucradas y de las enzimas empleadas por los microorganismos para degradar hidrocarburos aromáticos. Las herramientas proteómicas

han ido incrementando su uso en el estudio de la degradación de hidrocarburos aromáticos por especies bacterianas como *Acinetobacter* sp. KS-1 (Kim *et al.*, 2003), *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Kim *et al.*, 2007), *Pseudomonas putida* KT2420/2442 (Lupi *et al.*, 1995 y Kim *et al.*, 2006), *P. alcaligenes* NCIMB 9867 (Zhao *et al.*, 2004) y más recientemente la bacteria Gram-positiva *Rhodococcus* sp. Cepa TFB (Tomas-Gallardo *et al.*, 2006).

En el caso de los organismos unicelulares, una variedad de cambios en el ambiente celular (choque térmico, baja temperatura, presencia de metales pesados) han sido usados para inducir cambios en el proteoma existente. El primer reconocimiento de la riqueza molecular, en cuanto a respuesta bacteriana mediante proteínas de estrés, tuvo lugar con la introducción en 1975, de la electroforesis en geles de acrilamida en dos dimensiones para resolver complejas mezclas de proteínas celulares (O' Farrell, 1975). Esta tecnología introdujo una fase de cambios en el estudio de la fisiología bacteriana por ajuste de nuevas aproximaciones experimentales básicas.

Esta claro ahora, que además de la regulación de la expresión de genes específicos, hay sistemas de regulación global que controlan expresiones simultáneas de un gran número de genes en respuesta a una variedad de estreses ambientales. El primero de estos sistemas de control global, y de sustancial importancia, es la respuesta al estrés por calor. El primer estudio de la respuesta de una bacteria a estrés por calor con análisis de electroforesis en dos dimensiones, comparó el proteoma de *E. coli* creciendo a 28°C o 37°C con su crecimiento a temperaturas altas de 42°C a 50°C (Neidhardt *et al.*, 1981 y Van Bogelen *et al.*, 1987). Estudios similares han sido desarrollados en otras bacterias (ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Brucella melitensis*, *Agrobacterium tumefaciens* y cepas de *Vibrio* sp S14), determinando las proteínas involucradas en la respuesta al estrés por calor, y cuántas de ellas estaban inducidas cuando las células estuvieron sujetas a más de una condición de estrés (Richter y Hecker, 1986 y Bernhardt *et al.*, 1997). Solamente un reducido número de proteomas bacterianos en respuesta al estrés por calor han sido definidos con la electroforesis en dos dimensiones.

La respuesta al estrés por calor se caracteriza por la inducción de un conjunto grande de proteínas (llamadas proteínas de respuesta al calor o *Hsp*), bajo exposición a altas temperaturas y a condiciones en que normalmente las proteínas se desnaturalizan, por ejemplo en presencia de alcoholes y metales pesados (Schumann, 2003 y Chhabra *et al.*, 2006). Perturbaciones como la exposición de las células a hidrocarburos aromáticos tóxicos y condiciones de estrés, fácilmente

producen respuestas celulares *in vivo* que pueden ser sujeto de análisis proteómicos y que consideramos son los primeros ejemplos de proteómica funcional. El resultado del análisis del proteoma funcional es la identificación de muchas *Hsp* que son inducidas en respuesta a varios estímulos (Chen *et al.*, 2000; Monahan *et al.*, 2001 y Giard *et al.*, 2002).

Los compuestos nitroaromáticos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente y han sido detectados en efluentes líquidos, ríos y suelos tratados con pesticidas. Son liberados al ambiente principalmente a través de actividades antropogénicas. Los nitrofenoles son utilizados como intermediarios en la producción de fármacos, colorantes, pesticidas, conservantes de la madera y explosivos (Spain, 1995; Zablutowicz *et al.*, 1999; She *et al.*, 2005). Estos compuestos son altamente tóxicos para el ser humano y mamíferos dado que son sustancias que pueden llevar a la formación de metahemoglobina y son potentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa (Karim y Gupta, 2002). El 2,4- dinitrofenol (2,4-DNP) es un compuesto persistente en el ambiente considerado contaminante prioritario por la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (US EPA), que recomienda un nivel guía en aguas naturales menor de 10 ng/L (Korol *et al.*, 2008). Dentro de las bacterias fotosintéticas (clase Fotobacterias) se encuentra una subclase que contiene a las bacterias fotosintéticas oxigénicas (las cianobacterias), y otra subclase en que se encuentran las bacterias fotosintéticas anoxigénicas. Estas últimas se clasifican en tres grupos: bacterias verdes (azufradas y no azufradas), bacterias rojas (azufradas y no azufradas) y heliobacterias. Las bacterias rojas (*Rhodospirillales*) poseen unas membranas intracitoplasmáticas características, producidas por invaginaciones de la membrana plasmática. En estas membranas se encuentra el aparato fotosintético con los pigmentos, la bacterioclorofila *a* y *b* y los carotenoides.

Las Rodosporiláceas asimilan el nitrógeno orgánico fundamentalmente a través de la glutamato deshidrogenasa, mientras que el amonio se incorpora a los esqueletos carbonados mediante la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT). También poseen nitrogenasa, y algunas especies, nitrato y nitrito reductasas. *Rhodobacter capsulatus* E1F1 utiliza como fuente de carbono para el crecimiento diversos compuestos aromáticos como benzoato, catecol, 1,2,3-trihidroxibenceno y 3,4-dihidroxibenzoato, tanto en luz y anaerobiosis como en luz y microaerobiosis, coincidiendo con lo descrito para otras Rodosporiláceas. Por otro lado, *R. capsulatus* E1F1 utiliza escasamente diversos nitrofenoles como fuente de carbono, aunque sí

como fuente de nitrógeno, en presencia de una fuente de carbono adecuada, tanto en condiciones de luz/anaerobiosis como en luz/microaerobiosis, ya que es capaz de fotoasimilar nitrato y nitrito.

R. capsulatus E1F1 fotorreduce el 2,4-dinitrofenol a 2-amino-4-nitrofenol (ANP) en anaerobiosis, mediante una actividad nitrofenol reductasa que se induce en presencia de nitrofenoles y se reprime en células cultivadas con amonio. Mientras que en anaerobiosis el 2,4-dinitrofenol se reduce casi estequiométricamente a 2-amino-4-nitrofenol, en condiciones microaeróbicas éste último desaparece del medio de cultivo, dando lugar a nitrito y a otros metabolitos prácticamente indetectables por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El 2,4-DNP es un desacoplante energético que inhibe fuertemente la fijación de nitrógeno en *R. capsulatus*. De hecho, esta bacteria sólo puede crecer diazotróficamente cuando el 2,4-DNP se ha transformado casi en su totalidad en ANP, de ahí que la fotorreducción de 2,4-DNP sea un proceso cometabólico. Por otro lado, cuando se estudia la inducción de la nitrogenasa se observa que se induce a medida que el 2,4-DNP va desapareciendo del medio de cultivo. En presencia de amonio, el metabolismo del 2,4-DNP se inhibe fuertemente.

Por otra parte, la estirpe B10 es fácil de estudiar genéticamente y además se conoce la secuencia completa del genoma de la estirpe SB1003, muy similar a B10, que se ha publicado recientemente (Haselkorn *et al.*, 2001). Por todo ello, se caracterizó la utilización de 2,4-DNP por *R. capsulatus* B10. Esta bacteria fotorreduce el 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) a 2-amino-4-nitrofenol, que es liberado al medio de cultivo casi estequiométricamente en condiciones anaeróbicas, igual que en la estirpe E1F1 (Pérez Reinado, 2005).

El presente estudio, tiene el propósito de determinar la expresión diferencial de proteínas en *R. capsulatus* B10S frente a la presencia de 2,4-DNP, en células cultivadas en amonio y bajo condiciones diazotróficas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Para llevar a cabo el presente estudio se empleó la cepa de *Rhodobacter capsulatus* B10S, mutante espontáneo de *R. capsulatus* B10, resistente a estreptomicina (Pérez-Reinado, 2005).

Compuestos químicos

Se empleó 2,4- dinitrofenol (DNP) de grado analítico provisto por Fluka (Riedel de Haën). Todos los reactivos químicos fueron de grado analítico provistos por Sigma Chemical Company (St. Louis, USA), Merck (Darmstadt, Alemania) y Panreac (Barcelona, España). La solución de 2,4-DNP 200 mM, se preparó asepticamente disolviendo la cantidad necesaria en 50 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados se esterilizaron en autoclave durante 20 min a 126 °C, se suplementaron con el antibiótico sulfato de estreptomicina con una concentración en el medio de 200 mg/mL. Como medio mínimo para el cultivo rutinario de la estirpe de *R. capsulatus* B10S se empleó RCV (cuadro 1) (Pérez-Reinado, 2005).

Cuadro 1. Composición medio RCV

Medio RCV	
MgSO₄ · 7H₂O 20%	200 mg
CaCl₂ · 2 H₂O 7.5%	75 mg
FeSO₄ · 7H₂O 0.4%	12 mg
Clorhidrato de pirofosfato de tiamina 0.1%	1 mg
Tampón fosfato potásico pH 6,8	640 mM
Solución de trazas	1 mL
L-malato 20%, 30 mM	40 mL
H₂O	hasta 1L

La solución de trazas (cuadro 2) se preparó disolviendo en 250 mL de agua los siguientes componentes:

Cuadro 2. Solución de trazas

Trazas	
MnSO₄·H₂O	400 mg
H₃BO₃	700 mg
CuSO₄·5H₂O	10 mg
ZnSO₄·7H₂O	60 mg
Na₂MoO₄·2H₂O	190 mg

Como fuente de carbono se utilizó D,L-malato (30 mM) añadiéndose 20 mL/L a partir de una solución preparada al 20% ajustada a pH 6,8. Como fuente de nitrógeno se empleó glutamato sódico (1 g/L) y cloruro amónico (10 mM) o el dinitrógeno molecular disuelto en el medio (16 mg/L).

En cuanto a las condiciones de cultivo, *R. capsulatus* se cultivó a 30 °C en condiciones de luz y anaerobiosis (condición fototrófica), utilizando frascos de cristal Pyrex® del volumen adecuado (entre 8 mL y 1.5 L), cerrados herméticamente. Los frascos se llenaron completamente con medio de cultivo para crear las condiciones anaeróbicas. Los cultivos se iluminaron de forma continua con lámparas de wolframio para obtener condiciones saturantes de luz (240 W·m⁻²).

Análisis Proteómico

- Fraccionamiento subcelular** Para la realización de geles 2D se partió aproximadamente de 1150 mL de cultivos de *R. capsulatus* que se recogieron en fase de crecimiento exponencial, el crecimiento de las estirpes se siguió mediante turbidimetría a 680 nm (densidad óptica 0.5-0.6), utilizando para ello un espectrofotómetro UV-Vis ThermoSpectronic, Helios Epsilon. Las células de *R. capsulatus* se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 10 min a 4 °C, en una centrífuga Beckman J2-21. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0 para volverlas a centrifugar, eliminar nuevamente el sobrenadante y guardar a -80°C. Una vez descongeladas las células, las mismas fueron resuspendidas en tampón de solubilización (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), se les añadió DNAsa 65 µg/mL

y RNAsa 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente se rompieron mediante 3 ciclos de 5 s a 90 W, con un sonicador Vibra Cell de Sonics & Materials, manteniendo las células en todo momento a 4 °C. A los extractos obtenidos se les añadió además, una mezcla de inhibidores de proteínas (PMSF 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y Pepstatina 2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubándose posteriormente 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugaron a 11000 g (centrífuga Sigma 6k 15) por 1 h, guardándose el sobrenadante para el análisis proteómico.

- **Determinación de la concentración de proteínas:** Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford (1976). A 0,8 mL de muestra se le añadieron 0,2 mL de reactivo “Bio-Rad Dye reagent concentrate”, referencia (500-0006 Bio-Rad). Transcurridos 5 min se determinó la absorbancia a 595 nm y el valor obtenido se interpoló en una recta patrón obtenida con seroalbúmina bovina (BSA).
- **Isoelectroenfoque:** La primera dimensión se llevó a cabo usando el sistema IEF Cell de Bio-Rad. Las tiras de isoelectroenfoque fueron de 7 y 17 cm (Bio-Rad), con intervalos de pH de 3-10 y 5-8. Las muestras previamente centrifugadas a 12000 g durante 1 h, se aplicaron a los sarcófagos y encima de cada una se colocó, hacia abajo, un gel de isoelectroenfoque, luego los geles se cubrieron con aceite mineral. Para una completa absorción de las proteínas y rehidratación de los geles se realizó una rehidratación pasiva (sin voltaje) durante 12 h para los geles de 7 cm; para los de 17 cm, se realizó una rehidratación pasiva durante 1 h y seguido una rehidratación activa (30 V) durante 12 h. En ambos casos tanto la rehidratación como el isoelectroenfoque se llevaron a cabo a 20°C y una corriente de 50 μA por gel.
- **Preparación de la muestra:** de la fracción soluble se tomaron volúmenes con cantidades comprendidas entre 100 a 125 μg de proteínas, se completaron hasta 125 μL (para los geles de 7 cm) y 300 μL (para los geles de 17 cm) con tampón de solubilización, que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), DTT 50 mM, tampón IPG (anfolitos 0.8% (p/v) y trazas de azul de bromofenol.
- **Equilibrado de tiras de isoelectroenfoque:** antes del inicio de la segunda dimensión, los geles de isoelectroenfoque se equilibraron durante 15 min en tampón de equilibrado (urea 6 M, glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol, todo esto preparado en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,8), conteniendo DTT (10 mg/mL) y seguidamente otros 15 min en tampón de equilibrado conteniendo yodoacetamida 25 mg/mL.

- **Segunda dimensión:** la electroforesis bidimensional (segunda dimensión), se llevó a cabo usando el sistema Protean® Plus Mini Dodeca® Cell de Bio-Rad para los geles de 7 cm y Proten® Plus Dodeca® Cell para los de 17 cm ambos de Bio-Rad. Todo el material se lavó cuidadosamente con agua destilada y etanol. Los geles de isoelectroenfoque equilibrados se colocaron posteriormente sobre geles de poliacrilamida al 12% para la segunda dimensión. Los marcadores de peso molecular se aplicaron en trozo de papel Whatmann, el cual se colocó al lado del gel de isoelectroenfoque y sobre el gel de poliacrilamida. Por último, tanto el gel de isoelectroenfoque como el papel con los marcadores se sellaron con agarosa al 0.5%. Las condiciones de electroforesis fueron de 200 V para los geles de 7 cm por 2 h y 60 V por 22 h para los de 17 cm, a 10°C.
- **Tinción de geles:** el revelado de los geles bidimensionales se realizó únicamente mediante la tinción de Sypro® Ruby (Bio-Rad). Los geles se lavaron con agua destilada, y se colocaron 30 min en solución de fijación (10% metanol y 7% ácido acético glacial), seguidamente se incubaron toda la noche con Sypro® Ruby, agitando suavemente. El tiempo de incubación fue de aproximadamente 20 h. A continuación se retiró la tinción fluorescente, se colocaron en solución de fijación por 30 min y finalmente en agua destilada por otros 30 min. Los geles de electroforesis se escanearon con el ImageScanner de Amersham-Pharmacia y posteriormente se analizaron utilizando el programa ImageMaster 2D v3.1 de Amersham-Pharmacia. En dicho análisis se identificaron aquellas manchas (proteínas resueltas en la electroforesis bidimensional) cuyos cambios, tanto cualitativos como cuantitativos, se consideraron más significativos.
- **Aislamiento de proteínas y análisis mediante espectrometría de masas:** las proteínas (manchas) de interés se enviaron al SCAI-Universidad de Córdoba para ser recortados, digeridos con tripsina e identificados mediante huella peptídica (MALDI-TOF/TOF).
- **Identificación de proteínas a partir de los resultados de espectrometría de masas:** las huellas de mapas de péptidos generadas por MALDI-TOF/TOF se utilizaron para identificar las proteínas mediante diversas herramientas bioinformáticas o *motores* búsqueda disponibles en Internet como Mascot y Sequest.

RESULTADOS

Metabolismo de 2,4-Dinitrofenol en *Rhodobacter capsulatus* B10S:

La bacteria *Rhodobacter capsulatus* B10S se cultivó en anaerobiosis en medios RCV con malato 30 mM como fuente de carbono, utilizando glutamato sódico (1 g/L), cloruro amónico (10 mM) o el dinitrógeno molecular disuelto en el medio (16 mg/L) como fuente de nitrógeno y en presencia de 2,4-dinitrofenol (DNP) 200 μ M. Como puede verse en la figura 1, la bacteria transformó rápidamente todo el 2,4-DNP en Aminonitrofenol (ANP). Mientras que en condiciones diazotróficas (condiciones de fijación de nitrógeno) como se observa en la figura 2, la degradación del 2,4-DNP fue más lenta.

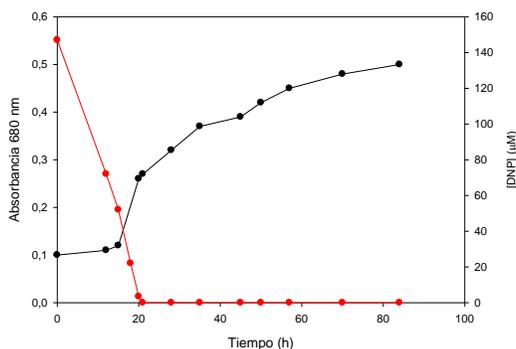


Figura 1. Degradación anaerobia de 2,4-DNP (puntos rojos) por *Rhodobacter capsulatus* B10S en medios con glutamato. Cinética de crecimiento (puntos negros).

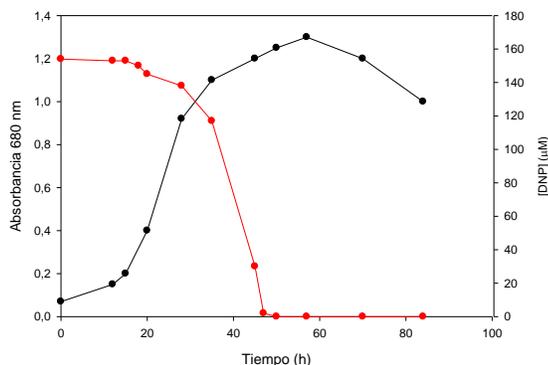


Figura 2. Degradación anaerobia de 2,4-DNP (puntos rojos) por *Rhodobacter capsulatus* B10S en condiciones diazotróficas. Cinética de crecimiento (puntos negros).

Obtención de los extractos proteicos:

Para la obtención de la fracción soluble de proteínas se partió de cultivos en tubos de 8 mL, pasando por 125 mL y finalmente en frascos de aproximadamente 1150 mL (figura 3). La densidad óptica inicial de crecimiento (a 680 nm) fue de 0.129 para estos últimos y cuando alcanzaron 0.500, se le añadió el 2,4-DNP, tanto a los medios con cloruro de amonio (fuente de nitrógeno) como a los de condiciones diazotróficas. Las células que estaban creciendo en medio RCVNH₄DNP se recogieron antes de que se formara el ANP, mientras que las de los medios RCVDNP (condición diazotrófica) cuando se hubiera transformado al menos un 25% de 2,4-DNP a ANP. Estas condiciones se determinaron mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) utilizando un cromatógrafo Beckman System Gold Diode Array Detector Module 168 (figura 4).

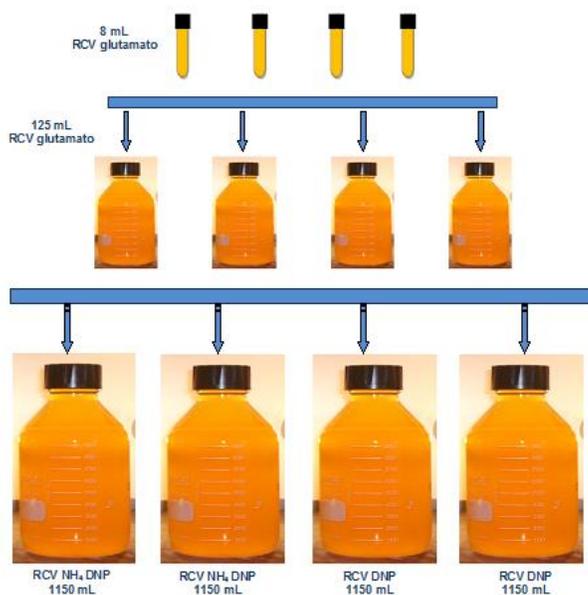


Figura 3. Condiciones de cultivo con glutamato, NH₄ y diazotrófica más 2,4-DNP.

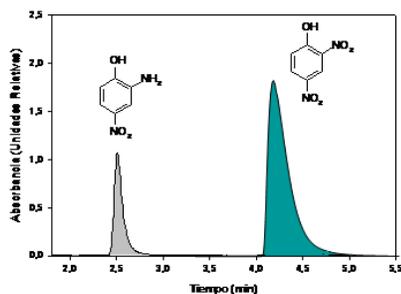


Figura 4. Cromatograma de ANP y DNP obtenido mediante HPLC.

Optimización de la fracción proteica para la electroforesis bidimensional:

Al llevarse a cabo los geles de 7 cm la resolución de las proteínas no fue la esperada, sugiriéndose la presencia de impurezas (sales o pigmentos propios de la bacteria) en los extractos proteicos obtenidos figura 5. Para mejorar estos resultados se le añadió a los extractos proteicos 4 volúmenes de metanol, luego 1 volumen de cloroformo, seguidamente se le añadió 3 volúmenes de agua miliQ (luego de cada paso se agitó la muestra), en este punto la muestra debe tener aspecto lechoso. Se centrifugó a 12000 g durante 5 min y se eliminó la fase superior (las proteínas se quedan en la interfase formando un anillo blanco), luego se añadieron 3 volúmenes de metanol y se agitó, se centrifugó a 12000 g durante 5 min y se eliminó el sobrenadante, finalmente se dejó secar por 10-15 min y se resuspendió en el tampón de solubilización. Se llevó a cabo nuevamente la electroforesis bidimensional en los geles de 7 cm obteniéndose una mejor resolución y enfoque de las manchas (proteínas) como se aprecia en la figura 6.

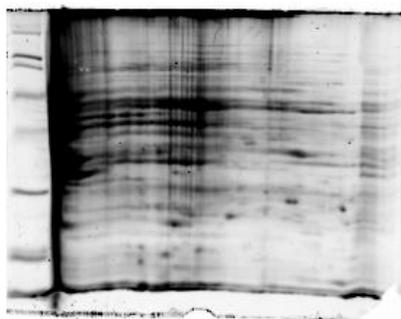


Figura 5. RCV

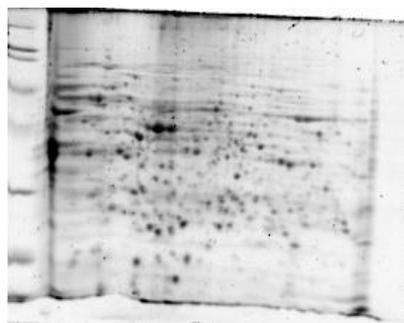


Figura 6. RCV

Una vez se optimizaron los geles de 7 cm en cuanto al enfoque de las proteínas y resolución de los mismos, se procedió con geles de 17 cm. En este punto se realizaron geles por duplicado para las condiciones RCVNH₄ (geles control), RCVNH₄DNP 3h (exposición de la bacteria a 2,4-DNP por 3 h) y RCVNH₄DNP 6h (exposición de la bacteria a 2,4-DNP por 6 h), como se muestra en las figuras 7,8 y 9. No fue posible realizar geles de 17 cm para las condiciones diazotróficas, pues no se contaba con la cantidad de proteína requerida.

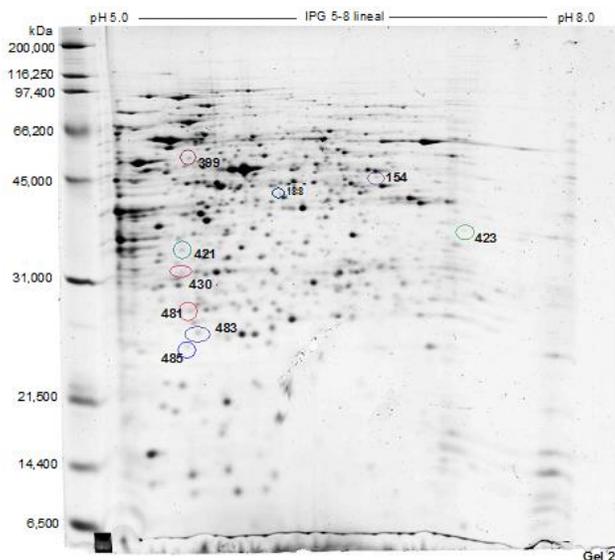


Figura 7. RCV NH₄.

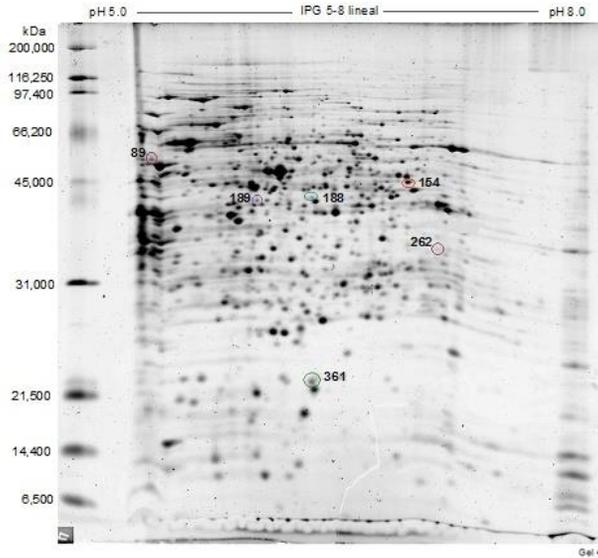


Figura 8. RCV NH₄ DNP 3 h.

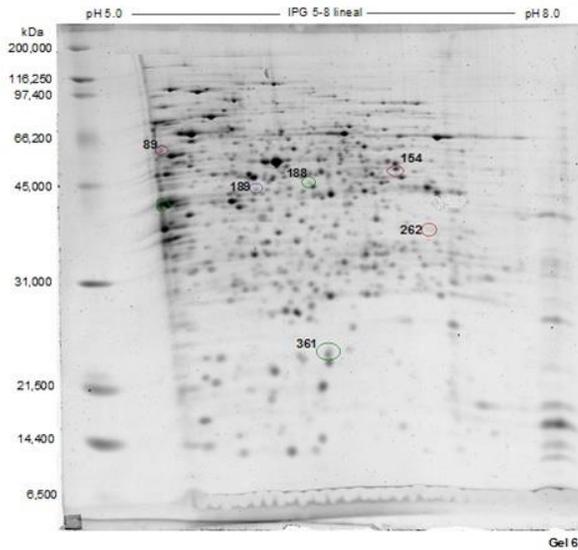
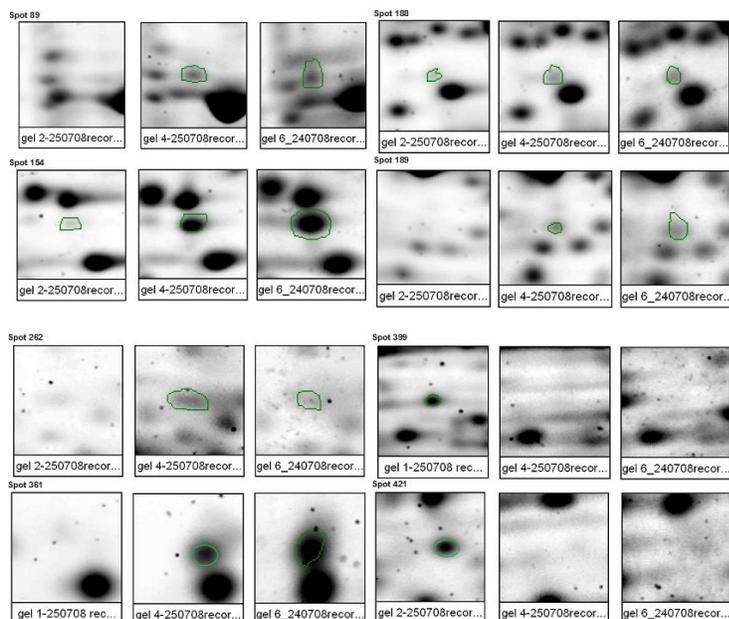


Figura 9. RCV NH₄ DNP 6 h.

En la Tabla 1 se presentan las manchas (proteínas), que se inducen, reprimen o sobreexpresan en las distintas condiciones experimentales, así como su punto isoeléctrico y peso molecular en kDa.

Tabla 1. Inducción y represión de manchas (proteínas). Los puntos negros indican la presencia de las manchas en los distintos geles.

Nº de Mancha	Gel 1-2 RCVNH ₄	Gel 3-4 RCVNH ₄ DNP 3h	Gel 5-6 RCVNH ₄ DNP 6h	Peso Molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico (pI)
89		•	•	54,42	5,15
154	•	•	•	44,83	7,11
188	•	•	•	42,71	6,37
189		•	•	42,27	5,95
262		•	•	35,64	7,34
361	•			22,44	6,19
399	•			54,39	5,53
421	•			35,70	5,44
423	•			34,84	7,48
430	•			32,07	5,48
481	•			28,68	5,54
483	•			29,95	5,59
485	•			25,90	5,51



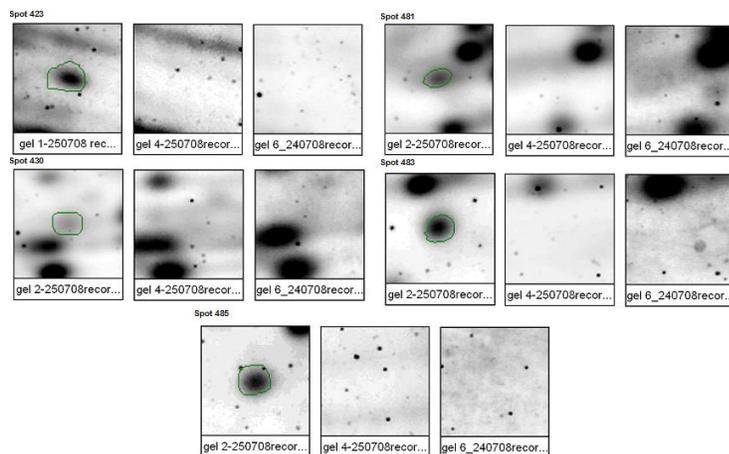


Figura 10. Comparación de las manchas (proteínas) sugeridas como posibles diferencias entre las distintas condiciones experimentales. Los geles 1-2 corresponden a RCV NH₄, los geles 3-4 a RCV NH₄ DNP 3 h y los 5-6 a RCVNH₄ DNP 6 h.

DISCUSIÓN

Cuando las células de *R. capsulatus* se cultivan en condiciones fototróficas y de anaerobiosis, utilizando L-glutamato como fuente de nitrógeno carecen de actividad nitroreductasa (enzima capaz de transformar el 2,4-DNP en ANP). Sin embargo, cuando se le transfiere a medios con 2,4-DNP, se comienza a inducir la actividad de la enzima. Esta respuesta metabólica no ocurre en presencia de amonio, pues éste bloquea instantánea y reversiblemente el consumo de 2,4-DNP en *R. capsulatus* B10S. Experimentos previos demuestran que la fotorreducción de 2,4-DNP depende de la presencia de fuentes alternativas de carbono o nitrógeno. En cuanto a su cultivo en condiciones diazotróficas, en presencia de 2,4-DNP, la fijación de nitrógeno está fuertemente inhibida y no se produce la liberación de amonio al medio. La fijación de nitrógeno es un proceso que requiere gran cantidad de energía, y dado que el 2,4-DNP es un desacoplante energético, la bacteria sólo puede crecer diazotróficamente cuando el 2,4-DNP se ha transformado prácticamente en su totalidad en ANP (Pérez-Reinado, 2005).

Estos datos experimentales explican porque las células de *R. capsulatus* B10S, que se cultivaron en glutamato más DNP crecían más rápidamente que cultivadas con amonio más DNP y en condiciones diazotróficas más DNP, y también porque la degradación del DNP es mucho más

rápida en medios con glutamato que en cultivos que se encuentran en condiciones diazotróficas (ver figuras 1 y 2).

En cuanto a la obtención de los extractos proteicos para la electroforesis bidimensional, las células cultivadas en amonio más DNP, se recogen antes de que se inicie la reducción de DNP a ANP, para detectar mediante el análisis proteómico posterior, aquellas proteínas que se reprimen, inducen o sobreexpresan ante la presencia de DNP, para ello se toman muestras del cultivo y se verifica mediante HPLC, si se ha comenzado a formar el ANP. Por esta razón, a partir de que se añade el DNP se toman muestras hasta que se inicia la actividad nitroreductasa y el proceso reductivo del DNP, lo que indica que se ha iniciado el consumo del mismo. En *R. capsulatus* E1F1, la inhibición causada por el amonio no afecta *in vitro* la actividad nitroreductasa, e *in vivo* sólo a largo plazo, lo que indica que muy probablemente debe actuar a nivel de expresión génica (Pérez-Reinado, 2005). En relación a la obtención del extracto proteico de *R. capsulatus* B10S cultivada en condiciones diazotróficas a las que se le añadió DNP, las mismas se recogen cuando al menos un 25% del DNP se ha reducido a ANP (verificación mediante HPLC), pues el DNP ejerce un fuerte inhibición sobre la fijación de nitrógeno como ya se mencionó, lo que pudiera explicar su lento crecimiento. En este caso se intenta detectar inducción, represión o sobreexpresión de proteínas cuando la bacteria se encuentra nuevamente fijando nitrógeno, condición que se presenta cuando el DNP se ha transformado en ANP. Es por ello que se requiere partir de una densidad óptica apropiada de células en condiciones diazotróficas, para obtener suficiente cantidad de proteínas una vez añadido el DNP, lo que permite hacer los geles de mayor tamaño (17 cm). Para la optimización de la fracción proteica a emplearse en la electroforesis bidimensional, una vez obtenido el extracto proteico de las diferentes condiciones de cultivo, las muestras se someten a una eliminación de posibles contaminantes basada en un protocolo de metanol-cloroformo, que interfieren en la obtención de una fracción proteica soluble, que permita obtener una buena resolución de los geles y enfoque de las proteínas.

Finalmente para las células cultivadas en amonio (control) y en amonio más DNP, se identificaron en total trece manchas (proteínas) de expresión diferencial (inducción, represión y sobreexpresión) basándose en el programa informático ImageMaster 2D v3.1 de Amersham-Pharmacia, a partir de los geles de 17 cm, con sus correspondientes pesos moleculares y puntos isoeléctricos, en donde se espera observar en el proteoma el efecto del amonio sobre el consumo

de 2,4-DNP y sobre la regulación de procesos de transporte de 2,4-DNP al interior celular; expresión del (los) gen (es) de la (s) nitroreductasa (s), actividad nitroreductasa y los donadores de electrones a la (s) nitroreductasa (s).

BIBLIOGRAFÍA

-Bernhardt, J., Volker, U., Volker, A., Antelmann, H. et al. 1997. Specific and general stress proteins in *Bacillus subtilis* – a two-dimensional protein electrophoresis study. *Microbiology*, **143**: 999–1017.

-Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-256.

-Chen, H., Higgins, J., Kondorosi, E., Kondorosi, A. et al. 2000. Identification of nol regulated proteins in *Sinorhizobium meliloti* using proteome analysis. *Electrophoresis*, **21**: 3823–3832.

-Chhabra, S. R., He, Q., Huang, K. H., Gaucher, S. P. et al. 2006. Global analysis of heat shock response in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *J. Bacteriol.* **188**: 1817–1828.

-Giard, J. C., Verneuil, N., Auffray, Y., Hartke, A. 2002. Characterization of genes homologous to the general stress-inducible gene *gls24* in *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **206**: 235–239.

-Isken, S., de Bont, J. A. M. 1998. Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, **2**: 229–238.

-Karim, K., Gupta, S.K. 2002 Effect of alternative carbon source on biological transformation of nitrophenols. *Biodegradation*. **13**: 353-360.

-Kim, S. I., Song, S. Y., Kim, K. W., Ho, E. M., Oh, K. H. 2003. Proteomic analysis of the benzoate degradation pathway in *Acinetobacter* sp. KS-1. *Res. Microbiol.* **154**: 697–703.

-Kim, S. J., Jones, R.C., Cha, C. J., Kweon, O. et al. 2004. Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis and *de novo* sequencing methods. *Proteomics*, **4**: 3899–3908.

- Kim, S. J., Kweon, O., Jones, R. C., Freeman, J. P. *et al.* 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on system biology. *J. Bacteriol.* **189**: 464–472.
- Kim, Y. H., Cho, K., Yun, S. H., Kim, J. Y. *et al.* 2006. Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *Proteomics*, **6**: 1301–1318.
- Korol, S., Gemini, V., Correa, E., Gallego, A. 2008. Degradación microbiana de 2,4-dinitrofenol en efluentes líquidos: efecto de factores bióticos y abióticos. *Higiene y Sanidad Ambiental*, **8**: 320-324.
- Loffhagen, N., Hartig, C., Babel, W. 1995. Fatty acid pattern of *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V indicate sensitivity against xenobiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 526–531.
- Loffhagen, N., Hartig, C., Babel, W. 1997. The toxicity of substituted phenolic compounds to a detoxifying and an acetic acid bacterium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **36**: 269–274.
- Lupi, C. G., Colangelo, T., Mason, C. A. 1995. Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the response of *Pseudomonas putida* KT 2442 to 2-chlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2863–2872.
- Methe, B. A., Nelson, K. E., Deming, J. W., Momen, B. *et al.* 2005. The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 10913–10918.
- Monahan, I. M., Betts, J., Banerjee, D. K., Butcher, P. D. 2001. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology*, **147**: 459–471.
- Neidhardt, F. C., Phillips, T. A., van Bogelen, R. A., Smith, M. W. *et al.* 1981. Identity of the B56.5 protein, the A-protein, and the *groE* gene product of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **145**: 513–520.
- O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**: 4007–4021.

- Pérez-Reinado, E.** 2005. Bases Moleculares de la Degradación de Polinitrofenoles en *Rhodobacter capsulatus*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Ramos, J. L., Duque, E., Godoy, P., Segura, A.** 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOTT1E. *J. Bacteriol.* **180**: 3323–3329.
- Richter, A., Hecker, M.** 1986. Heat-shock proteins in *Bacillus subtilis*. A two-dimensional gel electrophoresis study. *FEMS Microbiol. Lett.* **36**: 69–71.
- Schumann, W.** 2003. The *Bacillus subtilis* heat shock stimulon. *Cell stress chaperones*, **8**: 207–217.
- She, Z., Gao, M., Jin, C., Chen, Y., Yu, J.** 2005. Toxicity and biodegradation of 2,4-dinitrophenol and 3-nitrophenol in anaerobic systems. *Process Biochem.* **40**: 3017-3024.
- Spain, J.C.** 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. *Annual Review of Microbiology*, **49**: 523-555.
- Tamarit, J., Cabiscol, E., Ros, J.** 1998. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**: 3027–3032.
- Tomas-Gallardo, L., Canosa, I., Santero, E., Camafeita, E. et al.** 2006. Proteomic and transcriptional characterization of aromatic degradation pathways in *Rhodococcus sp.* strain TFB. *Proteomics*, **6**:119–132.
- Van Bogelen, R.A., Acton, M.A., Neidhardt, F. C.** 1987. Induction of the heat-shock regulon does not produce thermotolerance in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **1**: 525–531.
- Zablotowicz, R.M., Leung, K.T., Alber, T., Cassidy, M.B., Trevors, J.T., Lee, H., Veldhuis, L., Hall, J.C.** 1999. Degradation of 2,4-dinitrophenol and selected nitroaromatic compounds by *Sphingomonas sp.* UG30. *Can. J. Microbiol.* **45**: 840-848.
- Zhao, B., Poh, C. L.** 2008. Insights into environmental bioremediation by microorganisms through functional genomics and proteomics. *Proteomics*, **8**: 874-881.
- Zhao, B., Yeo, C. C., Lee, C. C., Geng, A. L. et al.** 2004. Proteome analysis of gentisate-induced response in *Pseudomonas alcaligenes* NCIB 9867. *Proteomics*, **4**: 2028–2036

-**Zhao, B., Yeo, C. C., Poh, C. L.** 2005. Proteome investigation of the global regulatory role of sigma 54 in response to gentisate induction in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867. *Proteomics*, **5**: 1868–1876.