

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Identificación de genes y proteínas relacionados con la producción de nanopartículas de selenio en *Pseudomonas putida* KT2440

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología para optar al grado de Maestría en Biología con Énfasis en Genética y Biología Molecular

Roberto Avendaño Vega

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica

2019

Dedicatoria y agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Randall Loaiza, director del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot) por permitirme realizar la tesis en el centro. A mi consejo de tesis: Dr. Max Chavarría, Dr. Carlos Rodríguez & Dr. José Ignacio Jiménez por sus invaluable comentarios, paciencia y toda la ayuda brindada a lo largo de este proceso. A Paola Fuentes, Rufus Frew, Manuel Salvador y Juhyun Kim por su participación en el proyecto. A todo el personal del CENIBiot, en especial a Rafael Montenegro y a Sofía Vieto por su colaboración y disponibilidad en todo momento.

Le dedico este trabajo a mis padres, quien ha hecho que esto sea posible y a mis perritos Blacky y Sasha que siempre han sido una fuente de felicidad y alegría después de largos días de trabajo en el laboratorio.

Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Maestría en Biología con Énfasis en Genética y Biología Molecular

Dr. Max Chavarría

Dr. Carlos Rodríguez

Dr. José I. Jiménez

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 6 |
| Lista de cuadros..... | 7 |
| Lista de ilustraciones y figuras. | 8 |
| Lista de abreviaturas. | 9 |
| Introducción | 10 |
| Justificación | 15 |
| Hipótesis..... | 16 |
| Objetivo general..... | 16 |
| Objetivos específicos..... | 16 |
| Materiales y métodos | 17 |
| Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento..... | 17 |
| Mutagénesis aleatoria..... | 18 |
| Curvas de crecimiento de la colección de mutantes deficientes en la reducción de selenito. | 22 |
| Determinación de selenito residual por FAAS (espectroscopía de absorción atómica de llama) | 22 |
| Complementación genética de las cepas mutantes..... | 23 |
| Identificación de proteínas | 23 |
| Resultados y Discusión | 24 |
| Mutantes obtenidos a través del plásmido pBAM1..... | 24 |
| Análisis de las posibles funciones de los genes obtenidos por mutagénesis..... | 25 |
| Curvas de crecimiento y reducción de selenio a selenio elemental en las cepas mutantes | 33 |
| Complementación de las cepas mutantes deficientes en la reducción de selenito | 38 |
| Identificación de proteínas implicadas en el proceso de reducción de selenito | 39 |
| Análisis de las rutas metabólicas implicadas en la producción de nanopartículas de selenio en <i>P. putida</i> KT2440. | 39 |
| Conclusiones. | 44 |
| Recomendaciones y futuro trabajo..... | 45 |
| Bibliografía | 45 |
| Apéndice y anexos..... | 52 |

Resumen

Existen múltiples bacterias que pueden metabolizar selenito a selenio, no obstante, en muchos casos no se conocen bien los mecanismos mediante los cuales estos microorganismos llevan a cabo este proceso, siendo *Pseudomonas putida* KT2440 uno de ellos. A través de técnicas de mutagénesis, cinéticas de crecimiento y análisis de proteínas de una dimensión, en este estudio, reportamos un grupo de genes que están involucrados en el metabolismo del selenio en *P. putida*. Nuestros resultados apuntan a 4 módulos funcionales interconectados: 1) abastecimiento de poder reductor y bloques de construcción para precursores (SucA *pp4189*, D2HGDH *pp5154*, PutA *pp49472* 2) sistemas de catálisis (Gqr *pp3998*, CysI & siroheme *pp2371*, *pp3999*, ccmF *pp4322*); 3) manejo de subproductos tóxicos (SodB *pp0915*); 4) síntesis y reparación de membrana (LdcA *pp4799*, MsbA *pp4935*, Wzy *pp4936*). Además, en este proyecto, se realizó la identificación de 3 cepas mutantes capaces de realizar la transformación del selenito a velocidades superiores que la cepa silvestre (FT FIS σ -54 *pp0051*; Pdo2 *pp0052*; Sqr/Rho *pp0053*). Estos últimos genes están anotados como elementos relacionados con el metabolismo del azufre. La gran capacidad de generar poder reductor y la versatilidad metabólica *P. putida* KT2440 hacen a este microorganismo una bacteria idónea para catalizar procesos de reducción como la biosíntesis de selenio a partir de selenito.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Cepas utilizadas en este estudio.

Cuadro 2. Plásmidos para mutagénesis aleatoria utilizados en este estudio.

Cuadro 3. Composición caldo Luria Bertani, miller (LB).

Cuadro 4. Composición agar para aislamiento de mutantes para el metabolismo de selenito en *P. putida* KT2440.

Cuadro 5. Secuencias de primers utilizados para el mapeo de los transposones insertados.

Cuadro 6. Reacción de PCR ronda 1 para identificar el punto de inserción del transposón con cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

Cuadro 7. Reacción de PCR ronda 2 para identificar el punto de inserción del transposón con cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

Cuadro 8. Limpieza de productos de PCR ronda 2 para identificar el punto de inserción del transposón cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

Cuadro 9. Secuenciación de 1 hebra de ADN para identificar el punto de inserción de transposón con cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

Cuadro 10. Purificación de productos de secuenciación para identificar el punto de inserción de cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

Cuadro 11. Secuencias de primers utilizados para la complementación de las cepas mutantes de este estudio.

Cuadro 12. Genes mutados en *P. putida* KT2440 por inserción de cassette con resistencia a kanamicina y seleccionados por su incapacidad de metabolizar selenito.

Cuadro 13. Péptidos identificados por espectrometría de masas de bandas recortadas en gel PAGE-SDS.

Lista de ilustraciones y figuras.

- Figura 1. Reacciones químicas de selenio en el ambiente.
- Figura 2. Vías propuestas para la reducción de selenito y el ensamblaje de nanoesferas de selenio en *T. selenatis*.
- Figura 3. El glutatión funciona como donador de electrones en la reducción de selenito en *E. coli*
- Figura 4. Mutagénesis aleatoria a través del plásmido pBAM1 en *P. putida* KT2440
- Figura 5. Mapeo del sitio de inserción de transposón en el cromosoma utilizando el borde ME-I.
- Figura 6. Microplaca 96 pocillos con cultivo de *P. putida* KT2440 y cepas mutantes en medio LB con selenio 1 mM.
- Figura 7. Mecanismo de reacción de sulfito reductasa (CysI) propuesto para *pp2371* en *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 8. Mecanismo de reacción de la Uroporfirina-III C-metiltransferasa (CysG) propuesto para *pp3999* en *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 9. Actividad 1: mecanismo de reacción para sulfuro-quinona oxidorreductasa procariota de (*Sqr/Rho*) *pp0053* en *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 10. Actividad 2: mecanismo rodanasa (tiosulfato: cianuro sulfurotransferasa) de (*Sqr/Rho*) *pp0053* en *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 11. Mecanismo de reacción para persulfuro dioxigenasa (*Pdo2*) propuesto para *pp0052* de *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 12. Operón hipotético *pdo2 – Sqr/Rho - tauE/safE* en *Pseudomonas putida* KT2440
- Figura 13. Mecanismo de reacción glutatiónil-hidroquinona reductasa (*gqr*) (*pp3998*) en *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 14. Mecanismo de reacción de citocromo c sintetasa (*CcmF*) (*pp4322*) en *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 15. Mecanismo de reacción 2-oxoglurato deshidrogenasa (*SucA*) (*pp4189*) de *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 16. Mecanismo de reacción de D-2-hidroxioglutarato deshidrogenasa (D2HGDH) propuesto para *pp5154* en *Pseudomonas putida* KT2440.
- Figura 17. Ruta para el reciclaje de tripéptidos de mureína y sus aminoácidos en *E. coli*.
- Figura 18. Función de MsbA en la exportación de fosfolípidos en *E. coli*.
- Figura 19. El ensamblaje del antígeno-O en *Francisella tularensis*.
- Figura 20. Curva de crecimiento de 24 h cepas mutantes deficientes de *P. putida* KT2440 en medio LB
- Figura 21. Curva de crecimiento de 24 h cepas mutantes deficientes de *P. putida* KT2440 en medio LB con selenito 1 mM
- Figura 22. Reducción de selenito a selenio elemental a las 24 h en mutantes deficientes de *P. putida* KT2440 en medio LB con selenito 1 mM.
- Figura 23. Curvas de crecimiento de 24 h de mutantes rápidos de *P. putida* KT2440 en medio LB.
- Figura 24. Curvas de crecimiento de 24 h mutantes super productores de *P. putida* KT2440 en medio LB con selenito 1 mM.
- Figura 25. Disminución en la concentración de selenito por la conversión a selenio elemental en mutantes rápidos de *P. putida* KT2440 durante 20 h en medio LB con selenito 1 mM.
- Figura 26. Complementación de cepas deficientes para el metabolismo del selenio en *P. putida* KT2440.
- Figura 27. Diagrama propuesto en el que participan genes de mutantes para abastecer a la síntesis de precursores que catalizan la reducción de selenito a selenio elemental en *P. putida* KT2440.
- Figura 28. Diagrama propuesto de reducción de selenito por medio glutatión / tiorredoxina en *P. putida* KT2440.
- Figura 29. Ruta propuesta del metabolismo del azufre en la que participan genes relacionados con el metabolismo del selenio en *P. putida* KT2440.
- Figura 30. Ruta propuesta de reducción de selenito por medio de sulfito reductasa por actividad inespecífica en *P. putida* KT2440.
- Figura 31. Diagrama general propuesto de reducción de selenito de selenio elemental en *P. putida* KT2440 como biofabrica para la transformación de selenito a selenio elemental.

Lista de abreviaturas.

Ap: ampicina

CcmF Citocromo c sintetasa

CysG: uroporfirina-III C-metiltransferasa

CysI: Sulfito reductasa hemoproteína, subunidad beta

D2HGDH: D-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa

DO₆₀₀: densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nanometros

FT FIS σ -54: Regulador transcripcional, familia FIS, dependiente de sigma-54 putativo

Gqr: Glutationil-hidroquinona reductasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

GSSH: glutatión oxidado

Km: kanamicina

L: litros

LdcA: Muranoiltetrapéptido carboxipeptidasa

Mg: miligramo

mM: milimolar

MsbA: transportador lipídico ABC ATPasa

Nm: nanometros

Pdo2 persulfuro dioxigenasa

Se: selenio

Sqr: Sulfuro-quinona oxidorreductasa

SucA: 2-oxoglutarato deshidrogenasa

TR: tiorredoxina reductasa

Wzy: Polimerasa antígeno-O

Introducción

El Selenio en el ambiente y sus biotransformaciones

El selenio (Se) es un oligoelemento esencial para los animales y los seres humanos que se obtiene de fuentes dietéticas tales como cereales, granos y verduras¹. En la naturaleza, el selenio se encuentra en cuatro estados de oxidación inorgánicos. Los oxianiones selenato (estado de valencia (VI)), y el selenito, (IV), son altamente solubles en agua y se sabe que son tóxicos para los sistemas biológicos a concentraciones relativamente bajas. Por el contrario, el selenio elemental, Se^0 , es esencialmente no tóxico y altamente insoluble en agua. Finalmente, el seleniuro, (-II), es altamente tóxico y reactivo pero se oxida fácilmente a Se^0 ². Las reacciones químicas de estos procesos están dadas por las siguientes ecuaciones:

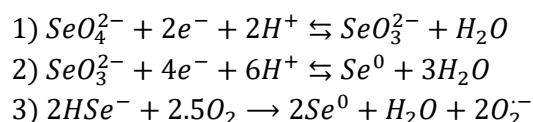


Figura 1. Reacciones químicas de selenio en el ambiente. 1) Reducción de selenato a selenito. 2) Reducción de selenito a selenio elemental. 3) Oxidación de seleniuro a selenio elemental.

Ahora bien, los microorganismos que están expuestos a los contaminantes en el medio ambiente, como los metales o metaloides, tienen una notable capacidad para luchar contra la toxicidad de los iones metálicos por diversos mecanismos³. Estas interacciones metal-microbio tienen un papel importante en el medio ambiente y en potenciales aplicaciones biotecnológicas⁴.

La transformación en el ambiente de las diferentes formas de selenio ha sido bien documentada, así como el importante papel que desempeñan los microorganismos tanto en los procesos de reducción y oxidación que componen el ciclo geológico del Se^5 . En este contexto, la reducción microbiana de selenato/selenito a Se^0 es crítica para disminuir la biodisponibilidad de este elemento⁶. La capacidad de reducir selenato y/o selenito en el medio ambiente parece estar bastante extendida en el mundo microbiano donde se han aislado especies que pueden realizar el proceso tanto de forma aerobia como anaeróbicamente. Estas especies incluyen, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas fluorescens*⁷, *Duganella sp.*, *Agrobacterium sp.*⁸, *Enterobacter cloacae*⁹, *Bacillus selenitireducens*¹⁰, *Azospirillum brasilense*¹¹, *Thauera selenatis*¹², y *Pantoea agglomerans*¹³ entre otros.

El metabolismo del selenio ha sido mayormente estudiado en bacterias que pueden respirar anaeróbicamente selenato como es el caso de *T. selenatis*¹⁴. Esta bacteria utiliza el selenato como aceptor terminal de electrones. La reducción del selenato a selenito es catalizada por una selenato reductasa en el periplasma llamada SerABC¹⁴. Luego, la bacteria produce selenio intracelular (Se^0), que es secretado en última instancia como nanoesferas de Se^0 de aproximadamente 150 nm de

diámetro. Además, se observó que *T. selenatis* secreta una proteína llamada SefA (94,5 kDa) que estabiliza las nanopartículas de selenio en el medio. El gen *sefA* se clonó y se expresó en *E. coli*, y la proteína SefA recombinante fue purificada. Los experimentos *in vivo* demostraron que SefA forma nanoesferas más grandes de Se^0 en *E. coli* (aproximadamente 300 nm) cuando se trataron con selenito, y éstas son retenidas dentro de la célula¹². No obstante, no se ha elucidado el mecanismo completo. Los autores proponen el siguiente esquema para *T. selenatis*:

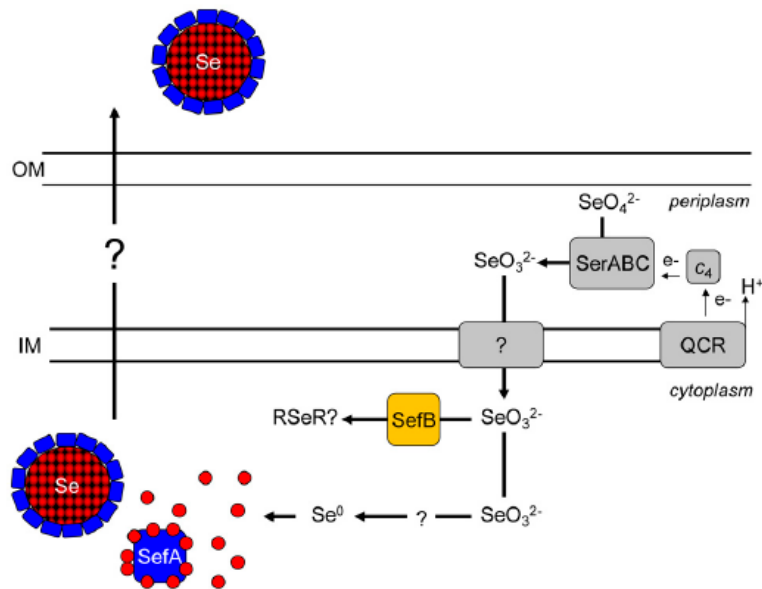


Figura 2. Diagrama que muestra la vía propuesta de reducción de selenio y ensamblaje de nanoesferas de selenio en *T. selenatis*. La reducción de selenato atrae electrones desde el citocromo c oxidoreductasa (QCR) unido a la membrana, generando una ganancia neta de $2q^+/2e^-$ del gradiente electroquímico de protones, lo que podría proporcionar a la fuerza motriz para la translocación de selenito a través de la membrana citoplasmática. Una vez en el citoplasma, la reducción de selenito se produce, y el Se^0 resultante se une a SefA, formando una nanoesfera de selenio para luego ser exportada de la célula. El proceso por el cual SefA-Se es exportado sigue siendo desconocido. La identificación de un gen (*SefB*) que codifica una metiltransferasa podría proporcionar un mecanismo para la desintoxicación a través de la volatilización de selenito a selenuros metilados (R-Se-R). OM, membrana externa; IM, citoplasmática membrana interna. Tomado de ¹²

No obstante, otros trabajos han propuesto varios mecanismos para explicar la reducción biológica de selenito a selenio elemental. El glutatión, el más abundante tiol en las células eucariotas, las cianobacterias, y varios grupos de proteobacterias, ha sido durante mucho tiempo candidato de estar involucrado en el metabolismo de selenio¹⁵. Experimentos con la proteobacteria *Rhodospirillum rubrum* mostraron que la tasa de reducción de selenito se redujo cuando las bacterias sintetizaron menores niveles de glutatión y que en *E. coli* la superóxido dismutasa también se indujo en cultivos en presencia de selenito, lo que indica la producción de superóxido ¹⁶. Los autores proponen el siguiente mecanismo:

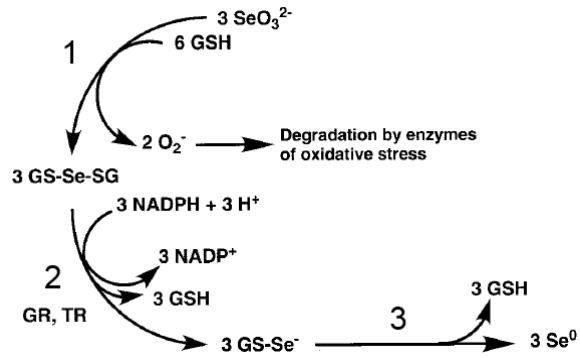
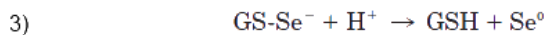
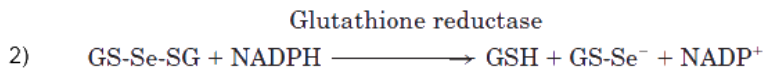
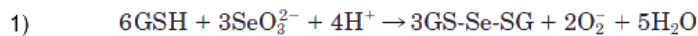


Figura 3. El glutatión funciona como donador de electrones en la reducción de selenito en *E. coli*. El primer producto intermediario es selenio-diglutación (GS-Se-SG), la cual es un sustrato para la glutatión reductasa (GR) o para tiorredoxina bacteriana. La tiorredoxina oxidada se regenera por la tiorredoxina reductasa (TR). La reducción de selenio-diglutación por GR o TR conduce a la formación de la seleniopersulfato de glutatión (GS-Se⁻), que se transforma en glutatión reducido (GSH) y selenio elemental (Se⁰). Adaptado de ¹⁶.

En este mecanismo la degradación del superóxido es catalizada por enzimas que son inducidas bajo estrés oxidativo. Los números en la figura 3 indican las siguientes reacciones:



Por otra parte, se han identificado pocos reguladores relacionados con el control de la expresión génica necesaria para la reducción de oxianiones. En *Enterobacter cloacae* se encontró que el regulador *fnr* (regulador de reducción de nitrato y fumarato) activa la capacidad de reducir el selenato y precipitar partículas insolubles de Se elemental ⁹.

Respecto a sistemas de transporte, se ha estudiado una bacteria fotosintética que reduce de manera eficiente selenito bajo condiciones aeróbicas y anaerobias: *Rhodobacter sphaeroides* ¹⁷. El análisis del proteoma como respuesta a la exposición de selenito, realizado por electroforesis en gel de dos dimensiones, muestra un incremento en la síntesis de algunas chaperonas, un factor de elongación, y enzimas asociadas al estrés oxidativo. Por otra parte, un mutante del gen *smok* fue incapaz de reducir selenito. Este gen codifica una proteína constituyente de un transportador ABC putativo implicado en la absorción de polioles. Ese mutante es menos sensible al selenito y no expresa las proteínas de estrés por lo que los autores hipotetizan que la entrada de selenito en el citoplasma está mediada por un transportador de poliol en *R. sphaeroides* ¹⁷.

Aplicaciones de las nanopartículas de Selenio

El selenio tiene múltiples aplicaciones, sin embargo, es importante mencionar que su potencial químico y/o biológico depende del tamaño de partícula⁴. Una de las aplicaciones que se ha investigado es la actividad antitumoral *in vivo* de nanopartículas de selenio unidas a ácido hialurónico (HA-Se). Para ello, ratones inoculados con tumor hepático fueron alimentados con nanopartículas de HA-Se vía oral a diferentes concentraciones durante 10 días. Los resultados del estudio indican que las nanopartículas de HA-Se son un candidato antitumoral potencial para el tratamiento del cáncer¹⁸. Otras de las aplicaciones que se han estudiado es la actividad antibacteriana de las nanopartículas de selenio¹⁹. La bacteria *Staphylococcus aureus* es una bacteria que se encuentra comúnmente en numerosas infecciones. Infecciones por *S. aureus* son difíciles de tratar debido a su formación de biopelículas y resistencia a antibióticos²⁰. Se ha demostrado que el porcentaje de bacterias viables disminuyó en presencia de nanopartículas de selenio²¹. El estudio sugiere que las nanopartículas de selenio pueden ser utilizadas para prevenir eficazmente y tratar las infecciones de *S. aureus* y los autores proponen que deberían ser estudiadas en más detalles en otros organismos patógenos. Otros estudios han caracterizado las propiedades biológicas de las nanopartículas de Se⁰, por ejemplo, una de las propiedades estudiadas ha sido el efecto protector contra el daño inducido por rayos UV en el ADN²². Adicionalmente, se ha estudiado su actividad antioxidante, la cual se observó que es dependiente del tamaño de la nanopartícula: partículas más pequeñas tienen una mayor actividad. Esto llevó a los autores a concluir que las nanopartículas de selenio elemental con un tamaño inferior a 100 nm tienen una aplicación potencial como un aditivo alimentario con propiedades antioxidantes relevantes para la salud humana¹³.

Herramientas de mutagénesis en *P. putida*

Para conocer los genes involucrados en procesos metabólicos específicos, una de las herramientas disponibles es la mutagénesis aleatoria, la cual, acompañada por un apropiado método de *screening*, permite identificar genes implicados en un proceso determinado. Otra metodología utilizada es observar las diferencias en el patrón de expresión proteica en presencia y ausencia del compuesto de interés (p.e. selenito) e identificar por espectrometría de masas las proteínas expresadas diferencialmente para posteriormente relacionarlas con los respectivos genes. Para el caso de la mutagénesis, la organización y las propiedades del plásmido pBAM1 lo hacen adecuado para este fin, ya que permite crear bibliotecas de mutantes de transposón²³ (Fig. 4D). Este plásmido también puede usarse para introducir de manera estable genes o cassettes funcionales en el genoma de un huésped bacteriano. El plásmido pBAM1 está compuesto de cuatro bloques funcionales: el primer segmento corresponde al marcador de resistencia, ampicilina (Ap^R). A continuación, un origen de replicación (*oriR6K*) que hace que su mantenimiento dependa del suministro *en trans* de la proteína p (gen *pir*). Por tanto, pBAM1 debe replicarse en cepas especializadas de *E. coli*, que expresan la proteína p del bacteriófago lambda, tal como *E. coli* CC118λ*pir*. El plásmido también posee un origen de región de transferencia (*oriT*) activable en presencia de productos de elementos de transferencia (*mob*⁺ *tra*⁺). Por último, una transposasa Tn5

transportada por el mismo plásmido (*tnpA*) reconoce las secuencias bordes (ME-I y ME-O; derecho e izquierdo) del módulo de transposón mini-Tn5 que a su interior posee un marcador de resistencia a kanamicina (Km^R) y cataliza el movimiento aleatorio del cassette mini-Tn5 al genoma²³. El plásmido pBAM1 necesita del auxiliar pRK600 que contiene elementos de transferencia (mob^+ tra^+), los productos de estos genes catalizan la conjugación de plásmidos que posean un origen de región de transferencia (*oriT*) como el pBAM1. Todo este proceso requiere 3 cepas: *E. coli* HB101 (pRK600), *E. coli* CC118 λ pir (pBAM1) y la cepa receptora. Al hacer un cultivo tri parental de ella, *E. coli* HB101 (pRK600) activa la conjugación del plásmido pBAM1 de *E. coli* CC118 λ pir hacia la cepa receptora. Luego, adentro de la receptora, el gen *tnpA* del plásmido pBAM1 se traduce a la transposasa Tn5 que reconoce y recorta la secuencia de nucleótidos mini-Tn5 en pBAM1. Posteriormente, la secuencia mini-Tn5 se inserta en el genoma de manera aleatoria y estable, lo cual otorga resistencia a kanamicina a la bacteria eliminando la función del gen en el cual es insertado (Fig. 4).

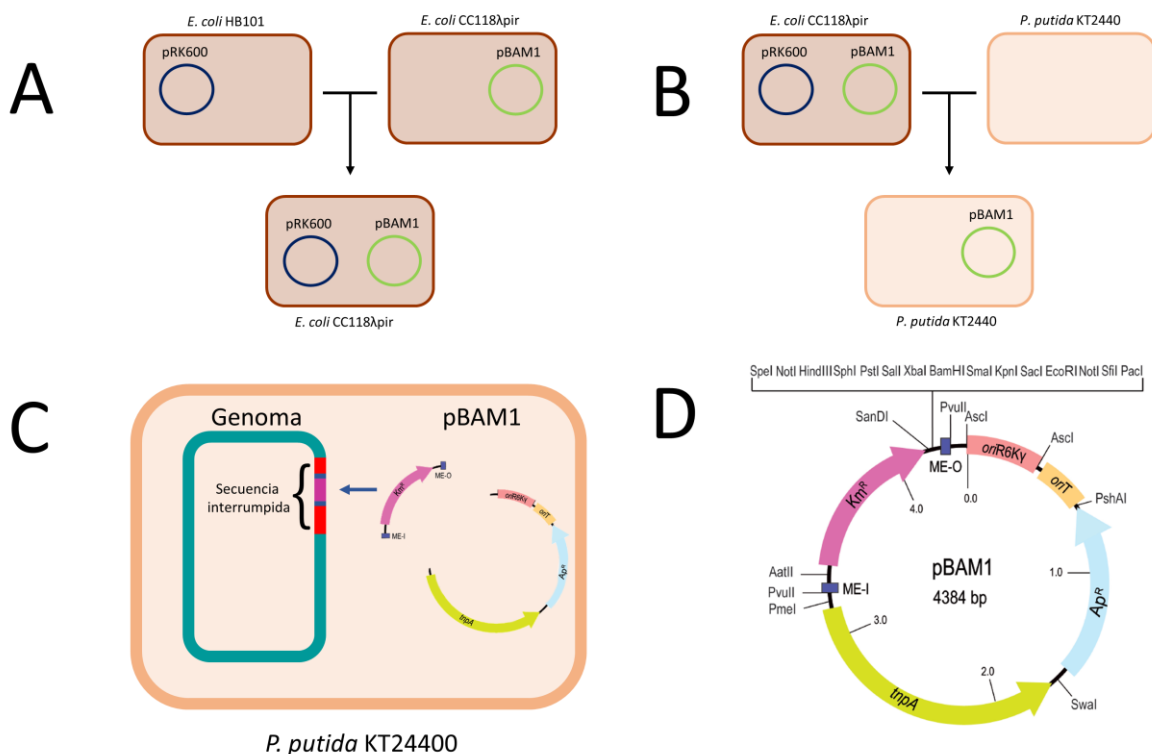


Figura 4. Mutagénesis aleatoria a través del plásmido pBAM1 en *P. putida* KT2440. A) Paso 1: Conjugación iniciada por el plásmido auxiliar pRK600 hacia la cepa donadora (*E. coli* CC118 λ pir) que contiene el plásmido pBAM1. B) Paso 2: El plásmido pBAM1 es movilizado *en trans* por el auxiliar (pRK600) hacia la cepa receptora (*P. putida* KT2440). C) Paso 3: el gen *tnpA* traduce la transposasa Tn5 que reconoce y recorta extremos del transposón (ME-I y ME-O) en pBAM1, posteriormente, la secuencia mini-Tn5 se inserta en el genoma de *P. putida* KT2440 de manera aleatoria y otorga resistencia a kanamicina a la bacteria disrumpiendo la función del gen en el cual es insertado. Al recortar el módulo del transposón, el plásmido se parte y degrada. D) Mapa del plásmido suicida pBAM1.

Justificación

Esta tesis de maestría forma parte del proyecto “Producción de nanopartículas de selenio en *P. putida* KT2440” inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (VI-809-B5-A689) entre los años 2015-2017. Los primeros resultados del proyecto fueron publicados en el año 2016 en la revista *Scientific Reports*²⁴. En esta primera publicación se reportaron las condiciones óptimas para el proceso de bioconversión de selenito a selenio elemental en *P. putida* KT2440, además de las características físico-químicas de las nanopartículas de selenio. El análisis indica que, en medio LB suplementado con selenito (1 mM), la reducción ocurre a una velocidad de 0.444 mmol L⁻¹ h⁻¹ comenzando en la fase exponencial tardía y con un rendimiento de conversión final del 89%. Las mediciones con microscopio electrónico de transmisión (TEM) muestran que las partículas de nano-Se sintetizadas por *P. putida* tienen un rango de tamaño de 100 a 500 nm y que están localizadas en el medio circundante o unidas a la membrana celular²⁴.

Nuestro trabajo previo fue el primero en reportar la capacidad de *P. putida* de reducir selenito a selenio elemental, sin embargo, existen muchas preguntas sin contestar tales como, ¿Cuáles son los genes implicados en este proceso? o ¿Cuál es el mecanismo de reducción del selenito en este microorganismo? Se han hecho reportes de que otros miembros del género tienen la capacidad de llevar a cabo estos procesos de oxidoreducción para oxianiones de selenio, tales como *P. stutzeri*, *P. alcaliphila*, *P. fluorescens*, *P. migulae* & *P. seleniipraecipitans*^{7,25-27}. No obstante, hay pocos genes anotados y relacionados con el metabolismo del selenio en *P. putida* KT2440. Estos están relacionados con la síntesis de selenocisteína y selenometionina^{28,29}. Este proyecto de tesis tiene como propósito identificar genes y proteínas candidatos involucrados en el metabolismo de selenio en *Pseudomonas putida* KT2440.

Pseudomonas putida y sus ventajas como biofabrica

P. putida ha sido un modelo de laboratorio para examinar el estilo de vida y las actividades de las bacterias ambientales³⁰. La cepa KT2440 fue una de las primeras bacterias en ser certificada como cepa de bioseguridad para experimentos y aplicaciones de ADN recombinante, y está clasificada actualmente como HV1 (inocua para la salud humana, nivel de bioseguridad 1) por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU)³¹. Una característica atractiva de la cepa KT2440 que la hace adecuada como biofabrica es el hecho de que esta bacteria alberga una gran cantidad de propiedades metabólicas y de resistencia al estrés óptimas para las necesidades biotecnológicas³². La inspección de su genoma de ~6.2 Mb no solo ha revelado la base de muchas de sus características conocidas, sino que también ha expuesto algunas propiedades inesperadas²⁸. Un rasgo notable es la presencia de >80 genes que codifican oxidorreductasas, que permiten el crecimiento en una amplia gama de sustratos aromáticos, y aplicaciones en biorremediación^{33,34}. Además, la glicólisis en *P. putida* tiene una serie de características únicas. Varios de los pasos oxidativos se combinan con la reducción de NADP⁺ a NADPH, que se utiliza para generar precursores anabólicos que son necesarios para el crecimiento bacteriano y explotados como una fuente de

poder antioxidante en condiciones estresantes exógenas y endógenas³⁵. Adicionalmente, *P. putida* KT2440 posee las rutas metabólicas de Entner – Doudoroff, Embden – Meyerhof – Parnas y las vías de fosfato de pentosa, que le permiten a la bacteria reciclar parte de la fuente de carbono (de triosas fosfato a hexosas fosfato) y ajustar la formación de NADPH^{36,37}. El equilibrio de NADPH en *P. putida* KT2440 cuando crece en glucosa se caracteriza por una ligera sobreproducción catabólica de poder reductor; sin embargo, el flujo del metabolismo central se adapta según las condiciones ambientales del momento. Específicamente, la cantidad de NADPH formada depende de la distribución de glucosa entre la fosforilación y la oxidación (transformación de glucosa hacia piruvato) ³⁸. Dicha flexibilidad permite la implementación de estrategias de ingeniería metabólica por medio de herramientas descritas que puedan alterar el equilibrio redox ^{23,39,40}. Esta arquitectura metabólica central robusta y flexible, la gran cantidad de oxidoreductasas, la capacidad de generar un alto poder reductor, la adaptabilidad a las condiciones del medio y las herramientas de biología molecular disponibles, hacen de *P. putida* KT2440 un excelente chasis como biofábrica.

Hipótesis

Los genes relacionados con el metabolismo del glutatión participan en el proceso de reducción de selenito a selenio en *P. putida* KT2440

Objetivo general

- Identificar genes y proteínas relacionados con el proceso de reducción de selenito a selenio en *Pseudomonas putida* KT2440.

Objetivos específicos

- Identificar genes relacionados el metabolismo del selenio en *P. putida* KT2440 por medio de cepas knock-out utilizando el sistema pBAM1.
- Determinar los cambios en el crecimiento de los mutantes ante el estímulo del selenito, para determinar si existen variaciones entre los mutantes y la cepa silvestre a través de curvas de crecimiento en presencia y ausencia de selenito de la colección de mutantes deficientes en la reducción de selenito.
- Determinar la participación de cada gen en el proceso de reducción del selenito a selenio cuantificando la cantidad de selenito residual al final y/o durante curva de crecimiento.

- Confirmar la participación de cada gen restaurando el fenotipo silvestre mediante complementación genética de los mutantes deficientes en la reducción de selenito por medio de la clonación de los genes identificados en plásmidos pSEVA
- Identificar proteínas relacionadas con el metabolismo del selenio en *P. putida* KT2440 por SDS-PAGE y espectrometría de masas.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Las cepas y plásmidos utilizadas en este estudio se encuentran en los cuadros 1 y 2 respectivamente. *P. putida* KT2440 se creció aeróbicamente en caldo LB a 30 °C y en agitación orbital a 150 rpm (Cuadro 3). Mientras que *E. coli* CC118λpir (pBAM1)²³ se creció en caldo LB con 100 µg/mL ampicilina y 50 µg/mL kanamicina a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm. *E. coli* HB101 (pRK600) se creció en caldo LB con 30 µg/mL cloranfenicol a 37 °C en agitación orbital a 200 rpm. Por otro lado, para la mutagénesis de *P. putida* KT2440, está se creció en placas agar de aislamiento *Pseudomonas spp.* para inhibir el crecimiento de las cepas de *E. coli* (Cuadro 4). La clonación de los constructos para la complementación se realizó en cepas *E. coli* DH5alfa en placas LB con estreptomycinina 100 µg/mL.

Cuadro 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio⁴¹.

| Cepa (plásmido) | Características relevantes |
|----------------------------------|--|
| <i>E. coli</i> CC118λpir (pBAM1) | Δ(<i>ara leu</i>)7697 Δ <i>lacX74 phoA20 galE galK thi rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> lysogen λpir. Cepa que contiene el plásmido pBAM1 |
| <i>E. coli</i> DH5α | <i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK- mK+), λ-</i> |
| <i>E. coli</i> HB101 (pRK600) | Sm ^r , <i>hsd R⁻ M⁺, pro, leu, thi, recA</i> . Cepa que contiene el plásmido pRK600, cepa auxiliar de conjugación |
| <i>P. putida</i> KT2440 | Prototrófica, cepa de tipo salvaje |

Cuadro 2. Plásmidos para mutagénesis aleatoria utilizados en este estudio²³.

| Plásmido | Características relevantes |
|----------|--|
| pRK600 | Plásmido auxiliar utilizado para la conjugación; <i>ori</i> (ColE1), RK2(<i>mob⁺ tra⁺</i>); Cm ^R |
| pBAM1 | Plásmido de entrega de Mini-Tn5; <i>ori</i> (R6K), <i>ori</i> (T), sitio de clonación múltiple estándar; Ap ^R Km ^R |
| pSEVA438 | Plásmido de expresión inducible por 3-metilbenzoato; <i>ori</i> (pBBR1), <i>ori</i> (T), sitio de clonación múltiple con sistema de expresión inducible XylS-Pm, Sm ^R |

Cuadro 3. Composición caldo Luria Bertani, miller (LB)

| Ingrediente | Gramos por litro |
|-----------------------------------|------------------|
| Hidrolizado enzimático de caseína | 10 |
| Extracto de levadura | 5 |
| Cloruro de sodio | 10 |
| pH final (25°C) | 7.5±0.2 |

Cuadro 4. Composición agar para aislamiento de mutantes para el metabolismo de selenito en *P. putida* KT2440.

| Ingrediente | Gramos por litro |
|------------------------------------|------------------|
| Digestión péptica de tejido animal | 20 |
| Cloruro de magnesio | 1.4 |
| Sulfato de potasio | 10 |
| Triclosán | 0.025 |
| Agar | 13.6 |
| pH final (25°C) | 7.0±0.2 |

Mutagénesis aleatoria

Las cepas *P. putida* KT2440, *E. coli* CC118λpir (pBAM1) y *E. coli* HB101 (pRK600) se crecieron como se describió anteriormente durante 24 h. Se hizo la conjugación de las 3 cepas con una DO₆₀₀ inicial de 0,03 para cada una. Luego el cultivo mezclado de las 3 cepas se concentró sobre un papel filtro de 0,20 µm. Este se cultivó sobre una placa LB durante 5 horas. Después, el filtro de conjugación se resuspendió en 10 mL de 10 mM MgSO₄. Luego se agregaron 100-200 µL en placas de agar para aislamiento para *Pseudomonas* con 50 µg/mL kanamicina y 1 mM selenito. Se seleccionaron las colonias transformadas con un fenotipo de color blanco (es decir que no sintetizan selenio elemental) y grandes rojas (que sintetizan el selenio más rápidamente), después de 24 h. Estas colonias fueron inoculadas en dos medios: placas petri agar M9 con 50 µg/mL kanamicina y 100 µg/mL ampicilina y en placas petri agar M9 con 50 µg/mL kanamicina. Se revisaron 24 h después y se seleccionaron las colonias sensibles a ampicilina y resistentes a kanamicina. Se realizó 1 pasaje en placa agar M9 50 µg/mL kanamicina cada 24 h por 3 días. Se hizo un PCR de colonia para amplificar uno de los bordes del transposón insertado en el genoma. Luego el producto de PCR se secuenció y se comparó su secuencia mediante BLAST contra registros del GenBank. Para la identificación de los genes se realizó una comparación por homología con genes anotados en el GenBank y así conocer su relación con mecanismos anteriormente descritos en la literatura y de esta manera inferir cual es la participación en este proceso.

Cuadro 5. Secuencias de primers utilizados para mapeo de transposones insertados²³

| Primer | Secuencia 5'-3' |
|-----------|---------------------------------------|
| ME-I-extR | CTCGTTTCACGCTGAATATGGCTC |
| ME-I-intR | CAGTTTTATTGTTTCATGATGATATA |
| ME-O-extF | CGGTTTACAAGCATAACTAGTGCGGC |
| ME-O-intF | AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCG |
| ARB6 | GGCACGCGTCTCGACTAGTACNNNNNNNNNNNACGCC |
| ARB2 | GGCACGCGTCTCGACTAGTAC |

Mapeo del sitio de inserción de transposón

Se utilizaron colonias mutantes (blancas y muy rojas) como fuente de ADN para la ronda 1 de PCR (Cuadro 6). La técnica consistió en una PCR de 2 rondas. En la primera ronda se utilizó un primer (ARB6) que posee una sección de bases nitrogenadas aleatorias hacia el extremo 3' para maximizar la posibilidad de localizar el gen mutado, además de una secuencia conocida "overhanging" en el extremo 5' y su pareja es un primer que se adhiere al interior del transposón. Debido a la inespecificidad de las bases nitrogenadas aleatorias del primer ARB6, se realiza una segunda ronda de PCR para obtener un producto de PCR más puro y con una mayor concentración. El primer ARB2 corresponde a la secuencia "overhanging" conocida del extremo 5' de ARB6 y se utiliza un primer interno en el transposón. Así se obtiene un producto de PCR más pequeño respecto a la ronda 1. Esto permite amplificar un fragmento de PCR que posee el extremo del transposón y el gen en el cual se insertó (Fig. 5). Se selecciono uno de los extremos del transposón (ME-I o ME-O) para caracterizar su punto de inserción mediante PCR utilizando cualquiera de las siguientes combinaciones de primers: A) Para el borde ME-I: ARB6 / ME-I-extR. B) Para el borde ME-O: ARB6 / ME-O-extF. Se transfiere una colonia de la placa directamente en el tubo de reacción PCR. Las condiciones para la ronda 1 de PCR son: 5 min a 95°C, 6 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 30°C y 1 min y 30 s a 72°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 45°C y 1 min y 30 s a 72°C. Después, se visualizaron los productos en gel de agarosa al 1%.

Cuadro 6. Reacción de PCR ronda 1 para identificar el punto de inserción del transposón con cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis

| Reactivo | 1 reacción (µL) |
|------------------|-----------------|
| MasterMix 2X | 10 |
| BSA (20 mg/ml) | 0.5 |
| DMSO >99.99% | 1.5 |
| H ₂ O | 6 |
| Primer 1 (10 uM) | 1 |
| Primer 2 (10 uM) | 1 |
| Volumen final | 20 |

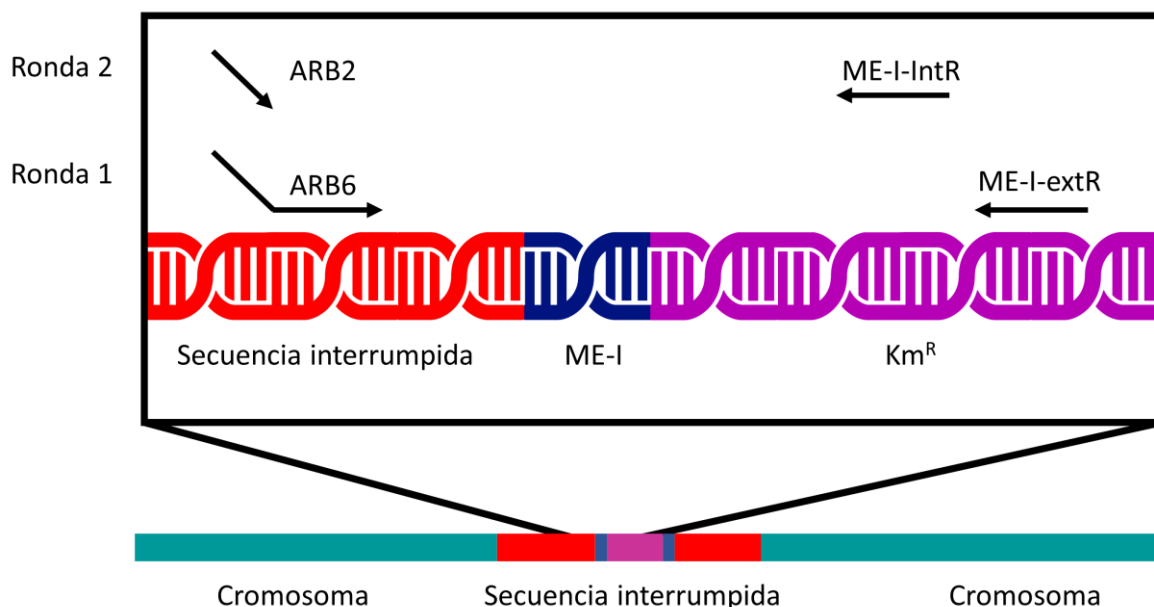


Figura 5. Mapeo del sitio de inserción de transposón en el cromosoma utilizando el borde ME-I. Para la primera ronda de PCR se realiza con el par de primers: ARB6 y ME-I-extR. Luego para la segunda ronda de PCR se la combinación: ARB2 y ME-I-IntR. Finalmente, para la secuenciación se utiliza el primer ME-I-IntR.

Luego se hizo una dilución de 1:100 de los productos de PCR. Utilizar 1 μ L de la PCR ronda 1 diluida como muestra para la ronda 2 (Cuadro 7). Se realizó la ronda 2 de PCR utilizando los siguientes primers: A) Para el borde ME-I: ARB2 / ME-I-intR. B) Para el borde ME-O: ARB2 / ME-O-intF. Las condiciones para la ronda 2 de PCR son: 1 min a 95°C, 30 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 52°C y 1 min y 30 s a 72°C, seguido de una prolongación extra de 4 min a 72°C. Se visualizaron los productos en gel de agarosa al 1%.

Cuadro 7. Reacción de PCR ronda 2 para identificar el punto de inserción del transposón con cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

| Reactivo | 1 reacción (μ L) |
|-----------------------|-----------------------|
| MasterMix 2X | 10 |
| BSA (20 mg/ml) | 0.5 |
| DMSO >99.99% | 1.5 |
| H ₂ O | 5 |
| Primer 1 (10 μ M) | 1 |
| Primer 2 (10 μ M) | 1 |
| Producto PCR ronda 1 | 1 |
| Volumen final | 20 |

Posteriormente los productos de PCR de la ronda 2 se limpiaron con el método de "Exol & fosfatasa alcalina" (ThermoFisher, EE.UU) con las siguientes condiciones: 37°C por 15 mins y 85°C por 15 mins (Cuadro 8).

Cuadro 8. Limpieza de productos de PCR ronda 2 para identificar el punto de inserción del transposón cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

| Reactivo | 1 reacción (µL) |
|------------------------------------|-----------------|
| Enzima Exol | 0.5 |
| Enzima FastAP (fosfatasa alcalina) | 1 |
| Producto de PCR ronda 2 | 5 |
| Volumen final | 6.5 |

La secuenciación de ADN se realizó utilizando el kit de secuenciación cíclica "BigDye® Terminator" v3.1 (ThermoFisher, EE.UU.) con las siguientes condiciones: 1 min a 95°C, 15 ciclos de 10 s a 95°C, 5 s a 50°C, 1:15 mins a 60°C, 5 ciclos 10 s a 95°C, 5 s a 50°C, 1:30 mins a 60°C y 5 ciclos 10 s a 95°C, 5 s a 50°C, 2 mins a 60°C (Cuadro 9). Para esto se usó el primer interno del transposón usado en la segunda ronda de PCR (ME-I-intR o ME-O-intF).

Cuadro 9. Secuenciación de 1 hebra de ADN para identificar el punto de inserción de transposón con cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

| Reactivo | 1 reacción (µL) |
|-----------------------------|-----------------|
| Ready Reaction Mix v3.1 | 1 |
| Buffer Ready Reaction Mix | 1.5 |
| Primer interno Tn5 (3.5 µM) | 1 |
| H ₂ O | 5 |
| Producto PCR ronda 2 limpio | 1.5 |
| Volumen total | 10 |

Finalmente, los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados con el kit "BigDye X Terminator" (ThermoFisher, EE.UU.). Se dejaron incubando por 30 mins en vortex y luego se centrifugan por 10 mins a 2500 rpm (Cuadro 10).

Cuadro 10. Purificación de productos de secuenciación para identificar el punto de inserción de cassette con resistencia a kanamicina en el genoma de *P. putida* KT2440 en la mutagénesis.

| Reactivo | 1 reacción (µL) |
|------------------------------------|-----------------|
| Solución SAM | 22.5 |
| Xterminator | 5 |
| Producto reacción de secuenciación | 5 |
| Volumen total | 32.5 |

Se inyectaron 10 μ L de los productos de secuenciación purificados en un Analizador Genético 3130xl (ThermoFisher, EE.UU.). La asignación de bases nitrogenadas se llevará a cabo con el programa Sequencing Analysis 5.3.1. La secuencia para su comparación se obtuvo del GenBank y corresponde al genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 accession: NC_002947. Después de analizar el resultado de la secuenciación se identificó el final del mini-transposón. Esto define el punto de inserción en el genoma, la secuencia inmediatamente después, corresponde al gen mutado. Los mecanismos de reacción las enzimas obtenidos y rutas metabólicas fueron obtenidas de las bases de datos KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas, y UniProt.

Curvas de crecimiento de la colección de mutantes deficientes en la reducción de selenito.

Para evaluar el efecto de la mutación en el fenotipo de *P. putida* KT2440 se realizaron curvas de crecimiento en presencia y ausencia de selenito. Para ello, cultivos de cada cepa se diluyeron a una densidad óptica inicial de 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 0,05 en medio fresco con 0 y 1 mM de selenito de sodio en un volumen de 200 μ L por pocillo. El crecimiento bacteriano se estimó mediante el registro de la DO_{600} en un lector de microplacas Sinergy H1 Hybrid Multi-Mode Reader (Biotek, EE.UU.). Las microplacas (placas de 96 pocillos; Surface Nunclon™ Roskilde, Dinamarca) se incubaron a 30 °C durante 24 h con agitación orbital continua y medición de la densidad óptica cada 10 minutos. Cada curva de crecimiento consistió de 3 repeticiones biológicas (curvas de crecimiento realizadas en días diferentes) y cada cepa tuvo 4 repeticiones técnicas por repeticiones biológicas (número de pocillos inoculados con la misma cepa bajo las mismas condiciones el mismo día). Posteriormente los datos recolectados fueron graficados (DO_{600} vs tiempo) para comparar el crecimiento en presencia y ausencia de selenito, y determinar si la mutación tiene efecto en el crecimiento normal, al compararlo con la cepa silvestre como control. Se registro por medio de fotografías la coloración del medio como cambio fenotípico al final del experimento.

Determinación de cantidad de selenito residual por FAAS (espectroscopía de absorción atómica de llama)

La reducción de selenito se registró mediante el análisis de selenito residual en el medio de cultivo. Para ello, frascos erlenmeyer de 3 L con 500 mL de LB suplementados con 1 mM de selenito fueron inoculados con *P. putida* KT2440 (DO inicial de 0,05). Las cepas mutantes se cultivaron a 30 °C y 150 rpm por 24 h. Para los mutantes deficientes se tomaron alícuotas de 15 mL de la suspensión celular a las 0 h y 24 h durante el crecimiento bacteriano, mientras que para los mutantes con la capacidad de producir selenio más rápidamente se tomaron muestras entre las 0 h y 20 h con intervalos de 2,5 h. Luego se midió su DO_{600} y las células fueron recolectadas por centrifugación (10 min, 4000 x g, 4 °C). Después, el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un nuevo tubo de 15 mL y se almacenó a -25 °C hasta su posterior análisis. Para las determinaciones analíticas, los sobrenadantes se filtraron en membranas de éster de celulosa mixto (ADVANTEC®, 0,20 μ m), y se analizaron mediante un espectrómetro de absorción atómica (AA240FS+240Z, Varian). La longitud de onda (nm) utilizada

para el selenio fue 196.026. Las soluciones del selenito se prepararon a partir de una solución estándar de 1000 mg/L (Tritrisol-Merck). Se hicieron diluciones apropiadas para la preparación de los estándares, que se almacenaron en matraces de polietileno bajo refrigeración.

Complementación genética de las cepas mutantes

Se seleccionaron nueve cepas mutantes para su complementación genética y validar la función del gen mutado. Los genes fueron amplificados por PCR a partir de ADN genómico de *P. putida* KT2440. La clonación de los insertos, de manera individual, se hizo con las siguientes combinaciones de enzimas de restricción: EcoRI – HindIII o BamHI – HindIII según la naturaleza del gen (Cuadro 11). Los insertos fueron ligados en el plásmido pSEVA438 de expresión inducible con 3-metilbenzoato³⁹. La clonación se realizó en cepas *E. coli* DH5alfa en placas LB con estreptomycin 100 µg/mL. Posteriormente se hizo un miniprep de los insertos clonados para realizar la transformación cada una de las cepas mutantes de *P. putida* KT2400 correspondientes. Finalmente, la verificación de la complementación se hizo visualmente en placas de LB con estreptomycin 100 µg/mL, 3-metilbenzoato 0,5 mM con selenito 1 mM.

Cuadro 11. Secuencias de primers utilizados para la complementación de las cepas mutantes de este estudio.

| Gen | Secuencia 5'-3' |
|----------------------------------|---------------------------------|
| <i>pp4189</i> (<i>SucA</i>) | TCTAGAATGCAAGAAAGCGTGATG |
| | AAGCTTTTAGACAGTGAAGGCGTCTT |
| <i>pp4935</i> (<i>MsbA</i>) | TCTAGAATGGCCGAAACACCG |
| | AAGCTTTCAGGTGATATCGGCCTTG |
| <i>pp2371</i> (<i>CysI</i>) | TCTAGAATGTACGTATACGACGAGTACGATC |
| | AAGCTTTTAATGATTCGCTGCATAGACG |
| <i>pp3999</i> (<i>CysG</i>) | TCTAGAATGGATTACCTGCCGCTGT |
| | AAGCTTTCAGCTGTTCTGCGAACCTT |
| <i>pp3998</i> (<i>Gqr</i>) | TCTAGATTGTTTCAGGAGCTCACAA |
| | AAGCTTTCAGCCTGCCAAATC |
| <i>pp4936</i> (<i>Wzy</i>) | TCTAGAATGTTGTATCAAAAAAAGTGGGCA |
| | AAGCTTTCAGGTTGAACCGGCAATT |
| <i>pp4799</i> (<i>IdcA</i>) | TCTAGAATGTACTGCGCCAAAACCTTC |
| | AAGCTTTCAGCCCTGAACAGATC |

Identificación de proteínas

La cepa *P. putida* KT2440 se cultivó en dos medios: caldo LB y caldo LB suministrado con selenito 1 mM a 30 °C y 150 rpm. Después de 24h se centrifugarán (10 min, 4000 x g, 4 °C). Luego se eliminó el sobrenadante y se lisaron las células por choque térmico 95 °C por 5 minutos. Se extrajeron las proteínas del cultivo por medio del método de precipitación por acetona. Se hizo una cuantificación

de proteínas totales por el método de Bradford. Después se carga 0,5 a 0,1 μg de proteína total de ambos cultivos por pozo para la electroforesis de gel de gradiente desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) de 4 a 20%. Se realizó la tinción del gel con azul de comassie G-250 y se compararon las bandas de proteínas provenientes de ambos cultivos de manera cualitativa. Las bandas con expresión diferenciada en el patrón de proteínas fueron cortadas y analizadas por espectrometría de masas en un equipo Applied Biosystems 4800-Plus MALDI-TOF-TOF Proteomics Analyzer (Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica).

Resultados y Discusión

Mutantes obtenidos a través del plásmido pBAM1

Se obtuvieron un total de 15 cepas mutantes relacionadas con el metabolismo del selenio (Cuadro 12). Doce cepas tenían un fenotipo deficiente en la producción de nanopartículas de selenio elemental, es decir, las colonias poseían un color blanco a rosado cuando se cultivaron en medio LB con selenito 1 mM (Fig. 6). Esta falta de coloración rojiza denota que estas cepas no pueden generar selenio elemental a la misma velocidad o rendimiento que la cepa silvestre. La mayoría de estas cepas mutantes después de 48 horas de crecimiento logran alcanzar una coloración rojiza casi de la misma intensidad que la cepa silvestre. El resto de mutantes (3 cepas) resultaron ser capaces de producir selenio a una velocidad mayor que la cepa silvestre, ya que al observarlas en placa con selenio 1 mM se tornaban de color rojizo notoriamente más rápido que la cepa silvestre (Fig. 6).

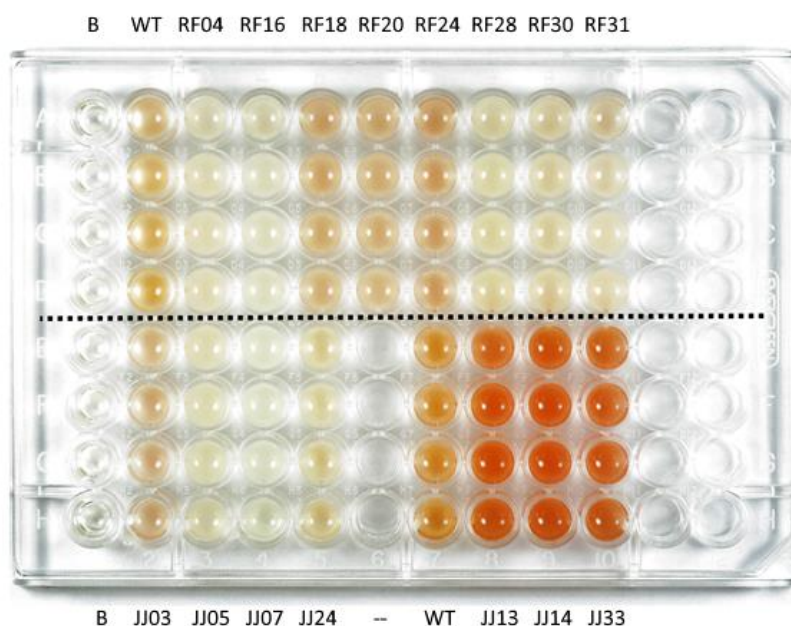


Figura 6. Microplaca 96 pocillos con cultivo de *P. putida* KT2440 y cepas mutantes en medio LB con selenio 1 mM. Fotografía tomada a las 24 horas. Cuatro replicas por cepa. B: Blanco (medio LB); WT: *P. putida* KT2440. RF04 *gqr::km*, RF16 *sucA::km*, RF18 *D2HGDH::km*, RF20 *D2HGDH::km*, RF24 *ldcA::km*, RF29 *msbA::km*, RF30 *cysG::km*, RF31 *cysG::km*, JJ03 *cysG::km*, JJ05 *wzy::km*, JJ07 *cysI::km*, JJ24 *ccmF::km*, JJ13 *PP_0051::km*, JJ14 *Sqr/Rho::km*, JJ33 *Pdo2::km*.

Cuadro 12. Genes mutados en *P. putida* KT2440 por inserción de cassette con resistencia a kanamicina. Anotación genética basado en: ^A cromosoma²⁸, ^B *Pseudomonas* database⁴² o ^C homología contra Ppuf_0068 de *P. putida* F1⁴³

| Cepa | ID KT2440 | Fenotipo | Identificación | Abreviación del gen | Metabolismo | Ubicación celular |
|------|-----------|----------------|--|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| Rf4 | pp3998 | Amarillo crema | Glutationil-hidroquinona reductasa ^A | <i>gqr</i> | Glutación | Citoplasma |
| Rf16 | pp4189 | Amarillo crema | 2-oxoglutarato deshidrogenasa ^A | <i>sucA</i> | Central | Citoplasma |
| Rf18 | pp5154 | Amarillo crema | D-2-hidroiglutarato deshidrogenasa ^B | <i>D2HGDH</i> | Central / serina | Citoplasma |
| Rf20 | pp5154 | Amarillo crema | D-2-hidroiglutarato deshidrogenasa | <i>D2HGDH</i> | Central / serina | Citoplasma |
| Rf24 | pp4799 | Amarillo crema | Muranoiltetrapéptido carboxipeptidasa ^A | <i>ldcA</i> | Estructura membrana | Citoplasma |
| Rf29 | pp4935 | Amarillo crema | transportador lipídico ABC ATPasa ^A | <i>msbA</i> | Transporte transmembrana | Membrana citoplasmática |
| Rf30 | pp3999 | Amarillo crema | uroporfirina-III C-metiltransferasa ^A | <i>cysG</i> | Porfirinas | Citoplasma |
| Rf31 | pp3999 | Amarillo crema | uroporfirina-III C-metiltransferasa ^A | <i>cysG</i> | Porfirinas | Citoplasma |
| JJ3 | pp3999 | Amarillo crema | uroporfirina-III C-metiltransferasa ^A | <i>cysG</i> | Porfirinas | Citoplasma |
| JJ5 | pp4936 | Rosado claro | Polimerasa antígeno-O ^A | <i>wzy</i> | Estructura membrana | Membrana citoplasmática |
| JJ7 | pp2371 | Amarillo crema | Sulfito reductasa hemoproteína, subunidad beta ^A | <i>cysI</i> | Azufre | Citoplasma |
| JJ13 | pp0051 | Rojo | Regulador transcripcional sigma-54 dependiente putativo ^B | -- | -- | Citoplasma |
| JJ14 | pp0053 | Rojo | Sulfuro-quinona oxidoreductasa ^A | <i>sqr / rho</i> | Azufre | Periplasma |
| JJ24 | pp4322 | Amarillo crema | Citocromo c sintetasa ^A | <i>ccmF</i> | Energía | Membrana citoplasmática |
| JJ33 | pp0052 | Rojo | persulfuro dioxigenasa ^C | <i>pdo2</i> | Azufre | Citoplasma |

Análisis de las posibles funciones de los genes obtenidos por mutagénesis en la reducción de selenito a selenio elemental.

Subunidad beta de sulfito reductasa (*CysI*) (pp2371)

La proteína CysI es un componente del complejo de la sulfito reductasa que cataliza la reducción de sulfito a sulfuro de hidrógeno (Fig. 7)⁴⁴. Esta es una de las varias actividades requeridas para la biosíntesis de L-cisteína a partir de sulfato. Esta reacción es reversible. Esta proteína tiene 2 sitios de unión: 1 siroheme y 1 cluster 4Fe-4S⁴⁵. Debido a la similitud estructural entre el sulfito y el selenito existe la posibilidad de que esta enzima catalice la reducción del selenito a seleniuro de hidrógeno de manera inespecífica, es por esta razón, que los mutantes de este gen son deficientes para este proceso. Adicionalmente otra posibilidad es que, estos mutantes tienen menos poder reductor al no poder generar 3 NADPH (poder reductor), necesarios en otros procesos como regenerar el glutatión reducido.

Sulfuro de hidrogeno + 3 NADP oxidado + 3 Agua ⇌ sulfito + 3 NADPH reducido + 3 próton

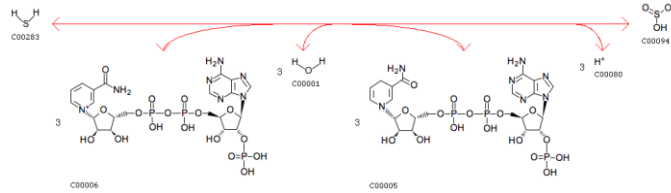


Figura 7. Mecanismo de reacción de sulfito reductasa (*CysI*) propuesto para *pp2371* en *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 1.8.1.2. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genoma

Uroporfirina-III C-metiltransferasa (*CysG*) (*pp3999*)

Esta proteína es parte de la enzima multifuncional siroheme sintetasa, que cataliza las metilaciones del uroporfirina-III en la posición C-2 y C-7 para formar la precorrina-2 a través de la precorrina-1 (Fig. 8)⁴⁶. Este paso es un cuello de botella metabólico en la generación de Precorrin 2. Luego la siroheme sintetasa cataliza la deshidrogenación en anillo dependiente de NAD⁺ de la precorrina-2 para producir sirohidroclorina⁴⁷. Finalmente, cataliza la ferroquelación de sirohidroclorina para producir siroheme⁴⁸⁻⁵⁰. Estudios previos han documentado en *E. coli* que siroheme es un cofactor de la sulfito reductasa⁴⁵. Debido a que *CysG* está involucrado en la síntesis de este cofactor del cual depende la actividad sulfito reductasa, nosotros hipotetizamos que los mutantes de este gen no pueden completar los pasos finales para generar siroheme, y esto disminuye la actividad sulfito reductasa lo que resulta en un fenotipo deficiente para la reducción de selenito. Dado la posición del azufre y el selenio en la tabla periódica (grupo VI) es esperable que la bioquímica de ambos elementos sea muy similar. Aniones como el sulfito (SO₃²⁻) y el selenito (SeO₃²⁻) son altamente probables que sean reconocidos por las mismas enzimas, por lo que no es sorprendente que en nuestros experimentos de mutagénesis muchos de los genes afectados están relacionados con el metabolismo del azufre como lo es el caso de *CysG*.

2 S-Adenosil-L-metionina + Uroporfirinogeno III ⇌ 2 S-Adenosil-L-homocisteina + Precorrina 2

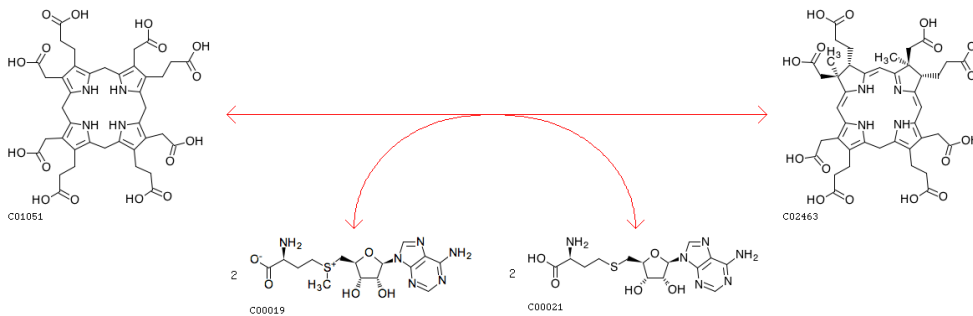


Figura 8. Mecanismo de reacción de la Uroporfirina-III C-metiltransferasa (*CysG*) propuesto para *pp3999* en *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 1.2.4.2. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas

Sulfuro-quinona reductasa / Rodanasa (*sqr/rho*) (*pp0053*).

Se han reportado dos versiones de esta enzima: una eucariota y otra para procariontas⁵¹. En la versión eucariota ubicada en la membrana mitocondrial interna, la enzima no logra ciclar los residuos de sulfuro, sino que cataliza el primer paso en el metabolismo del sulfuro de hidrógeno con la ayuda de glutatión seguido por una persulfuro dioxigenasa tipo 1 (*Pdo1*)⁵²⁻⁵⁴. La versión procarionta cataliza

la oxidación del sulfuro de hidrógeno, con la ayuda de quinonas. Los ciclos de reacción consecutivos conducen a la acumulación de polisulfuro (Fig. 9). Se ha estudiado PP0053 anteriormente y se clasifico como una sulfuro-quinona reductasa (Sqr) y se observó que la enzima cataliza una transferencia de sulfuro a cianuro, disminuyendo el valor K_m de Sqr para la oxidación del sulfuro de hidrógeno y elevó la reducción de quinonas. Adicionalmente en este estudio, la eliminación de *pp0053* de *P. putida* KT2440 condujo a la disminución de la actividad catalasa intracelular y la ubiquinona- H_2 oxidasa. Además, se observó como el tiocianato se formó como un producto de transferencia de carga de la reducción efectiva de quinonas (Fig. 10). En este estudio, los autores concluyen que la oxidación del sulfuro de hidrógeno y la formación de tiocianato son propiedades singulares de esta enzima⁵⁵. En otro estudio en el año 2016, se clonó y expresó en *E. coli*, la enzima Sqr, (cuya actividad rodanasa, es igual a la actividad reportada para PP0053) y una persulfuro dioxigenasa tipo 2 (*pdo2*) de *Cupriavidus pinatubonensis*, con lo cual se concluyó que los polisulfuros pueden reaccionar con glutatión para generar sulfito por medio de Pdo2 y que a su vez este sulfito generado puede reaccionar con glutatión por medio de la actividad rodanasa de Sqr generando tiosulfato⁵⁶. Este mecanismo explica porque *pp0053::km* tiene un fenotipo donde se produce más rápidamente el selenio elemental (Fig. 6), ya que este mutante tiene una vía metabólica eliminada que consume y compite por glutatión.

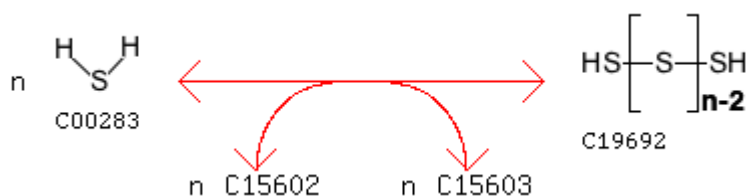


Figura 9. Actividad 1: mecanismo de reacción para sulfuro-quinona oxidorreductasa procarionta de (*Sqr/Rho*) *pp0053* en *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 1.8.5.4. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas

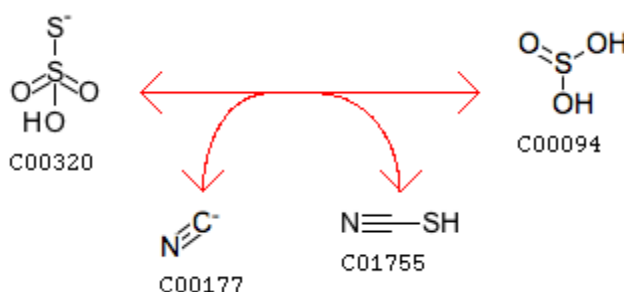
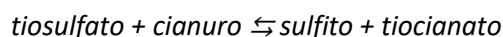


Figura 10. Actividad 2: mecanismo rodanasa (tiosulfato: cianuro sulfurotransferasa) de (*Sqr/Rho*) *pp0053* en *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 2.8.1.1. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas

Persulfuro dioxigenasa (*Pdo2*) (*pp0052*)

En *P. putida* KT2440, no existe anotación en este gen en las bases de datos ni en su genoma sin embargo se ha estudiado esta enzima en *P. putida* F1⁴³. Al comparar las secuencias de aminoácidos entre F1 (*ppuf0068*) y KT2440 (*pp0052*) su similitud es del 99.32% con 100% de cobertura. Esta evidencia nos da la certeza para concluir que son el mismo marco de lectura abierto. En la cepa F1 *ppuf0068* esta identificada como una persulfuro dioxigenasa tipo 2. Esta clase de enzimas

desempeña un papel importante en el catabolismo del sulfuro de hidrógeno⁵⁷. El sulfuro de hidrógeno (H₂S) primero se oxida por Sqr, dando lugar a polisulfuros. Luego, Pdo2 consume oxígeno diatómico para catalizar la oxidación de los polisulfuros, una vez que se ha transferido a un aceptor tiofílico, como el glutatión y generar sulfito (Fig. 11). Este mecanismo propuesto sería similar al reportado en mitocondrias con el cambio de que la reacción se llevaría con residuos polimerizados de azufre en vez de sulfuro de hidrógeno unido a glutatión⁵⁶. Este es el segundo paso para convertir sulfuro de hidrógeno en sulfito. El primer paso es la reacción ya descrita anteriormente de Sqr (ver arriba). La mutación en este gene genera un fenotipo en el cual se produce a mayor velocidad el selenio elemental, debido a que posee una vía metabólica eliminada que consume glutatión.

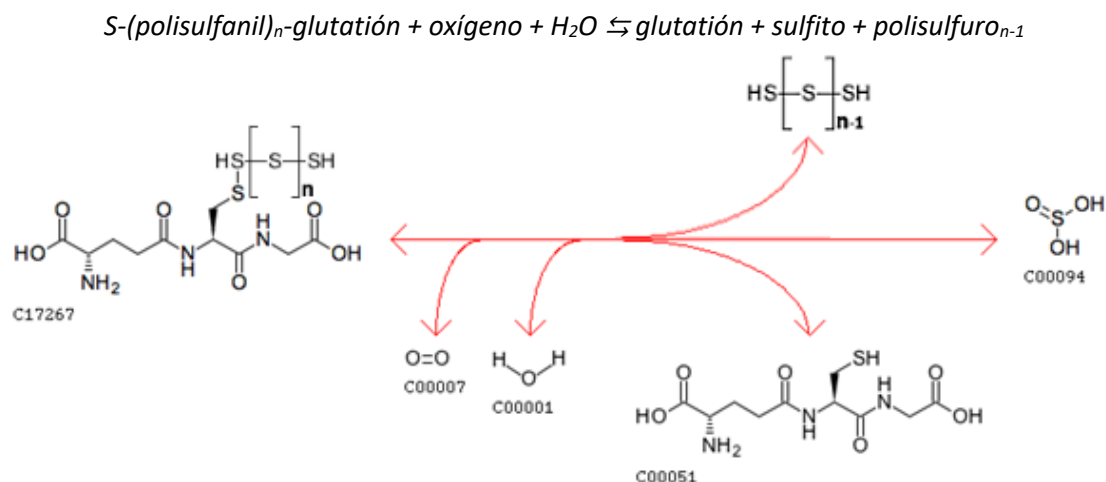


Figura 11. Mecanismo de reacción para persulfuro dioxigenasa (*Pdo2*) propuesto para *pp0052* de *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): similar a 1.13.11.18. Adaptado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas.

Regulador transcripcional, familia FIS, dependiente de sigma-54 putativo (*pp0051*).

En *P. putida* KT2440, este gen aún no tiene una función asignada, y lo he abreviado FT FIS σ-54. La familia de factores para la estimulación de la inversión (FIS) son un grupo de reguladores de las funciones bacterianas (estructura cromosomal, iniciación de replicación de ADN, movimiento flagelar, regulación de factores de virulencia) y se une específicamente a secuencias de ADN débilmente⁵⁸⁻⁶⁰. Debido a su localización en su vecindario cromosómico y al efecto que hemos visto en los mutantes de los genes cercanos es posible que los genes *pp0052*, *pp0053*, *pp0054* formen un operón regulado bajo su control (Fig. 12). Este operón concuerda con lo descrito en la literatura: los genes *pdo* a menudo están presentes como una sola copia por genoma bacteriano, y a menudo están vinculados a otros genes relacionados con el metabolismo de azufre, como los genes que codifican a *sqr/rho* (*pp0053*), y el exportador de sulfito (*pp0054*)⁵⁷. Shibata *et al.* 2006 definen que el operón de *pp0053* tiene una estructura bicistronica únicamente compuesto por *pp0052* (*pdo2*) y *pp0053* (*sqr/rho*) generando un ARN mensajero 2300 pares de bases⁵⁵. Sin embargo, esta afirmación está basada en datos experimentales no mostrados en el artículo. Debido a la ausencia de esta información que determinar sin duda alguna que el operón es bicistronico y que Xin *et al.* (2016), revelan que la estructura consenso del operón es de 3 genes: *pdo2*, *sqr/rho* y *tauE/safE*⁵⁶. Queda abierta la pregunta de cuál es el número de genes de este operón en *P. putida* KT2440. Por esta razón decidimos realizar un análisis *in silico* de la secuencia de *pp0052*, *pp0053*, *pp0054* (coordenadas cromosómicas: 60609 - 64361) con el programa FindTerm y se encuentre una única secuencia que puede formar una horquilla de terminación al final de *pp0054*: CCCTGTTGTTGGCCGG-

-CAAGGCTCTACTCGGCTAGCAACTCGCTTTGTTTCGGC. Este descubrimiento apoya la idea que el operón está conformado por *pp0052*, *pp0053*, *pp0054* y sugiere que el operón no es bicistrónico. Por otro lado, se sabe que la inducción de *pp0053* es posible con 0,5 mM de cistina o cisteína⁵⁵. Es muy probable que estos compuestos actúen sobre *PP0051* o *upstream* en el metabolismo si se confirma que son parte del mismo operón. Respecto al selenito, está claro que, si este factor transcripcional regula *pdo2* y *sqr/rho*, su ausencia evitaría que el glutatión sea consumido y desviado para generar sulfito y finalmente tiosulfato, lo cual mantendría niveles más altos de glutatión en las bacterias *pp0051::km* y permitiría catalizar la reducción de manera más eficiente de selenito a selenio elemental al no tener esta fuga metabólica del glutatión indicando que *PP0051* que es un factor de transcripción activador.

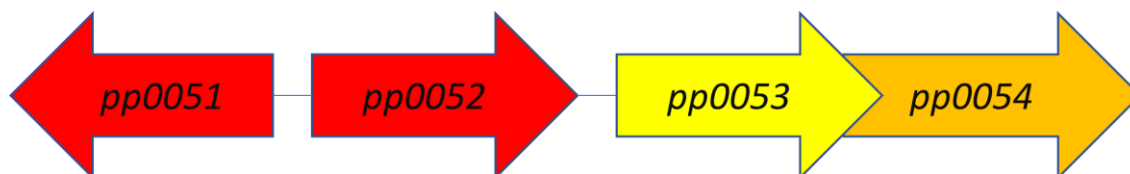


Figura 12. Operón hipotético *pdo2 – Sqr/Rho - tauE/safE* (4524 pb). *pp0051*: Factor de transcripción (FT FIS σ -54, *pp0052*: persulfuro dioxigenasa putativa (*Pdo2*), *pp0053*: Sulfuro-quinona oxidorreductasa putativa (*sqr/Rho*), *pp0054*: Exportador de sulfito *tauE/safE* putativo. Localización subcelular basada anotaciones en la base de datos de genomas de *Pseudomonas*: rojo (citoplasma), amarillo (periplasma), anaranjado (membrana citoplasmática).

Glutationil-hidroquinona reductasa (*gqr*) (*pp3998*)

Este tipo de enzimas, que se encuentran en bacterias, halobacterias, hongos y plantas, catalizan la reducción de glutatiónil-hidroquinonas dependiente de glutatión⁶¹. Los sustratos para estas enzimas a menudo se forman espontáneamente por la interacción de las benzoquinonas con el glutatión (Fig. 13)^{62,63}. Uno de los mecanismos descritos en la literatura para la reducción del selenito es por medio del glutatión, sin glutatiónil-hidroquinona reductasa se ve reducida la capacidad de regenerar el glutatión reducido y por ende el fenotipo del mutante es deficiente para la reducción de selenito.

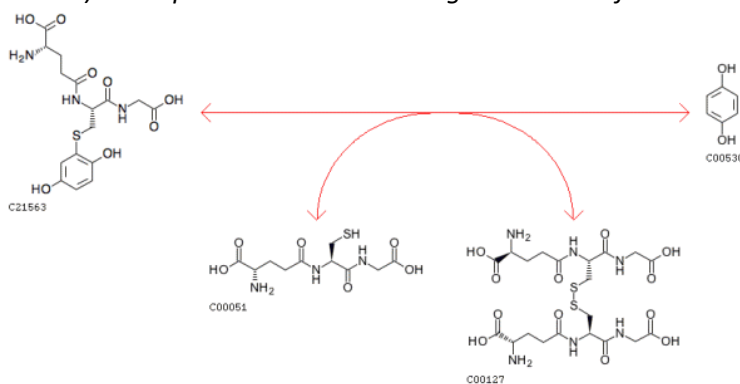


Figura 13. Mecanismo de reacción glutatiónil-hidroquinona reductasa (*gqr*) (*pp3998*) en *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 1.8.5.7. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas.

Citocromo c sintetasa (*ccmF*) (*pp4322*)

Esta enzima es necesaria para la biogénesis de los citocromos *c*, que son proteínas de transferencia de electrones que tienen uno o varios grupos hemo *c*, unidos a la proteína por uno o más (comúnmente dos) enlaces tioéter que implican grupos sulfhídrico de residuos de cisteína (Fig. 14)⁶⁴. En procariontes, los citocromos *c* cumplen 4 tipos de funciones: respiración, fotosíntesis, desintoxicación y señalización⁶⁵. Se ha reportado la formación de holocitocromos *c* por CcmFH y CcmG, un tioredoxina periplásmico⁶⁴. CcmG pertenece a la familia de tiorredoxina: disulfuro oxidoreductasas. Proteínas con esta misma función como DsbB han demostrado que median los efectos oxidantes del telurito en el sistema redox de membrana ciclo Q, actúa como un "conducto de electrones" entre el metaloide donde se observó una reducción de la reserva de citocromos *c* y *b*; y oxidación de ubiquinol⁶⁶. Es posible que en *Pseudomonas putida* CcmF actúa con un mecanismo similar a este y esto explicaría porque la ausencia de esta enzima afecta la reducción del selenito a selenio elemental al no poder reducirlo por medio de este sistema redox de membrana.

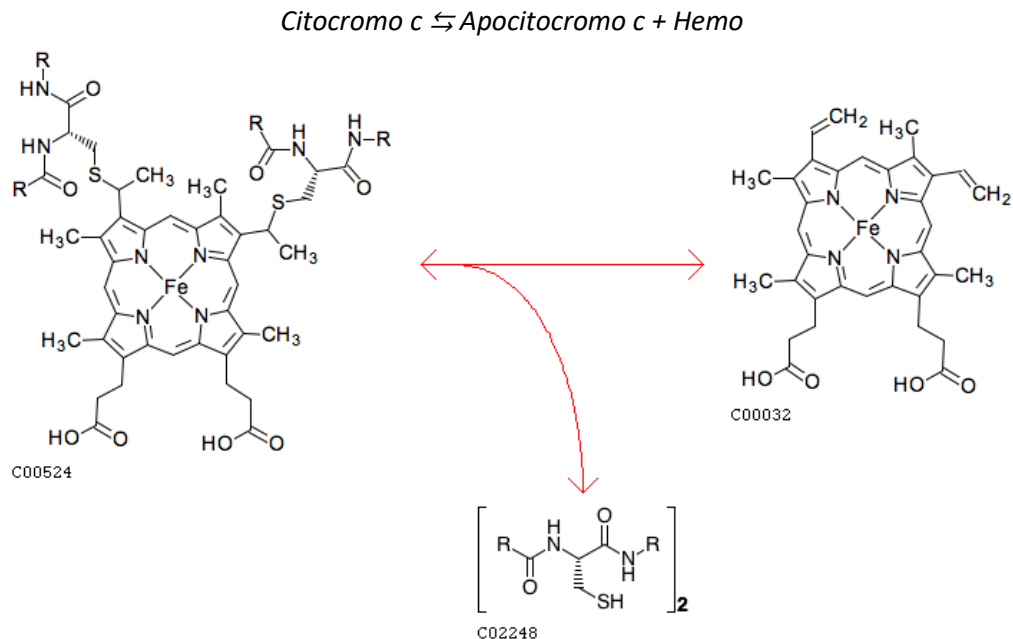


Figura 14. Mecanismo de reacción de citocromo *c* sintetasa (CcmF) (*pp4322*) en *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 4.4.1.17. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas.

2-oxoglutarato deshidrogenasa (*SucA*) (*pp4189*)

Esta proteína es un componente del complejo 2-oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH) que cataliza la descarboxilación de 2-oxoglutarato, el primer paso en la conversión de 2-oxoglutarato a succinil-CoA y CO₂ en el ciclo de ácidos tricarboxílicos (Fig. 15)^{67,68}. Sin *SucA* se ve interrumpido el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, alterando el crecimiento y disminuido el poder reductor (NADH) en el metabolismo central por ende el fenotipo del mutante.

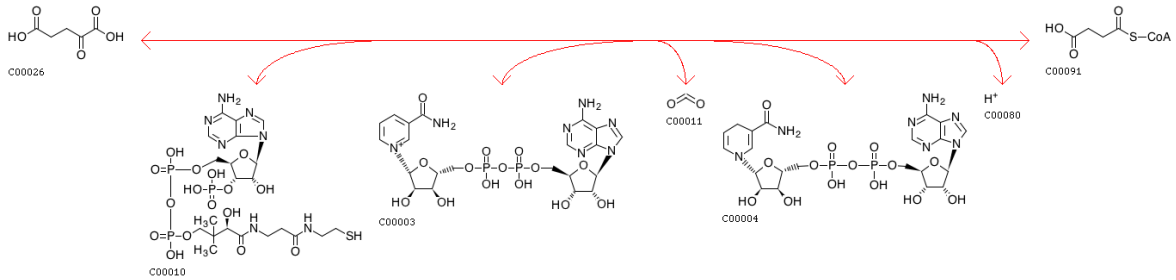
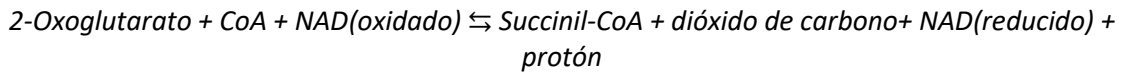


Figura 15. Mecanismo de reacción 2-oxoglutarato deshidrogenasa (*SucA*) (*pp4189*) de *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 1.2.4.2. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas

D-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa (*D2HGDH*) (*pp5154*)

Esta enzima cataliza la oxidación de D-2-hidroxiglutarato a 2-oxoglutarato (Fig. 16)⁶⁹⁻⁷¹. Se ha demostrado la participación de D2HGDH en la biosíntesis de L-serina por medio de una ruta relacionada con *SerA* en especies de *Pseudomonas*, incluidas *P. putida* KT2440, y esto define un enlace entre los intermediarios de la glicólisis, el ciclo de ácidos tricarbónicos y síntesis de serina. Además tiene efectos en el metabolismo de energía ya que, la flavoproteína de transferencia de electrones (ETF) y la ETF-ubiquinona oxidoreductasa (ETFQO), y proteínas de cadena de transporte de electrones, son esenciales en el metabolismo de D-2-hidroxiglutarato a través de su capacidad para transferir electrones de D2HGDH⁷². En el metabolismo del selenito la mutación de gen tiene un se reduce la cantidad de 2-oxoglutarato disponible en la célula para desviar este compuesto a la generación de L-glutamato, requerido en los precursores para el metabolismo del glutatión y porfirinas. Esto da como resultado un fenotipo deficiente para la reducción de selenito.

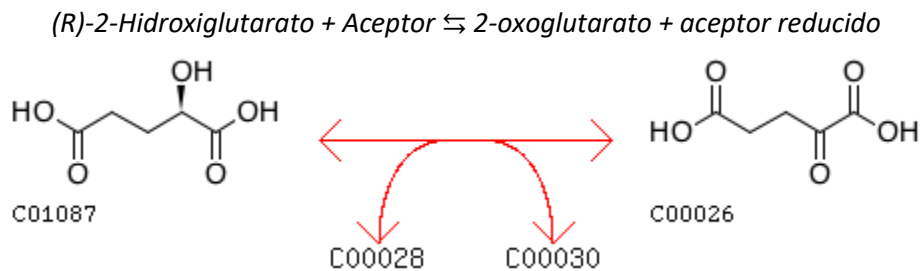


Figura 16. Mecanismo de reacción de D-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa (D2HGDH) propuesto para *pp5154* de *Pseudomonas putida* KT2440. Nomenclatura enzimática (EC): 1.1.99.39. Tomado del KEGG: Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas

Muranoiltetrapéptido carboxipeptidasa (*ldcA*) (*pp4799*)

De acuerdo a los estudios publicados por Templin *et al.* (1999) *LdcA* es una proteína que libera el residuo de D-alanina terminal del producto de reciclaje de tetrapéptidos citoplásmicos L-Ala-gamma-D-Glu-meso-Dap-D-Ala (EC: 3.4.17.13) (Fig. 17)⁷³. Los tripéptidos producidos por la reacción de *LdcA* se pueden reutilizar como bloques de construcción de peptidoglicanos; *LdcA* está involucrado en el reciclaje de mureína⁷⁴. Esta enzima no participa activamente en el metabolismo de selenito, sin embargo, hipotetizamos que la bacteria al no poder reemplazar los componentes de la pared celular dañados por estrés oxidativo, tiene una menor capacidad de defensa contra los

subproductos tóxicos del metabolismo del selenito (es decir superóxido y peróxido de hidrógeno), dando un fenotipo deficiente.

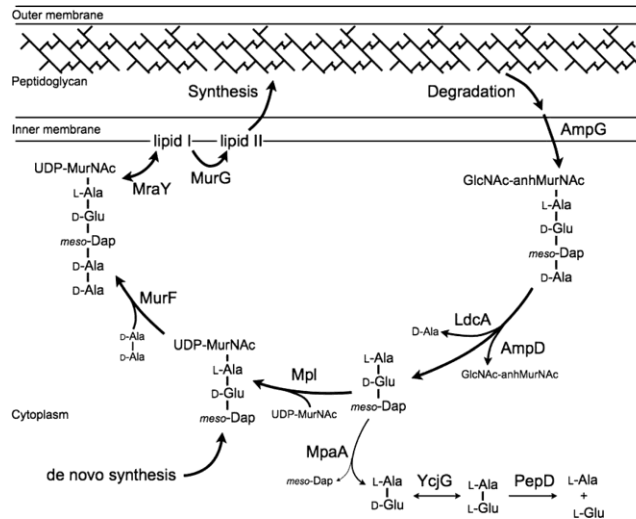
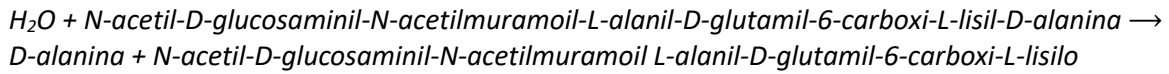


Figura 17. Ruta para el reciclaje de tripéptidos de mureína y sus aminoácidos en *E. coli*. Tomado de ⁷⁴.

Transportador lipídico ABC ATPasa (*MsbA*) (*pp4935*)

Esta proteína transportadora participa en la exportación de lípidos A y posiblemente también en la exportación de glicerofosfolípidos y biogénesis de la membrana externa (Fig. 18)^{75,76}. Los dominios transmembrana forman un poro en la membrana interna y el dominio de unión a ATP es responsable de consumo de energía⁷⁷. Al igual que *ldcA* no participa activamente en el metabolismo de selenito sin embargo, si por estrés oxidativo la pared celular resulta dañada en el lipido A o en glicerofosfolípidos, el hecho de que la bacteria no pueda exportarlos le resta capacidad de defensa contra el estrés oxidativo y por esta razón tiene un fenotipo deficiente.

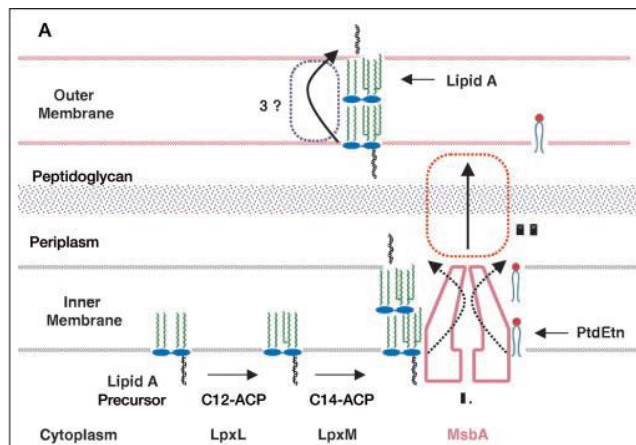


Figura 18. Función de *MsbA* en la exportación de fosfolípidos en *E. coli*. Actividad catalítica: $ATP + H_2O + \text{Lipido A (lado 1)} = ADP + \text{fosfato} + \text{Lipido A (Lado 2)}$. Nomenclatura enzimática (EC): 7.5.2.6. Tomado de ⁷⁷.

Polimerasa de antígeno-O (*wzy*) (*pp4936*)

Los antígeno-O son componentes principales de la superficie del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas y son muy variables en su estructura^{78,79}. *Wzy* es una polimerasa de antígeno-O cuya función es catalizar la adición de unidades repetitivas recién sintetizadas a un glicolípido que consiste en lípido A, polisacárido del núcleo interno y una unidad de repetición del antígeno-O (Fig. 19)⁸⁰. Al igual que *LdcA* y *MsbA*, *Wzy* no participa activamente en el metabolismo de selenito. Posiblemente, al participar en el ensamblaje de la membrana celular, los mutantes en este gen sean más vulnerables al estrés oxidativo y por eso no logran metabolizar el selenito tan rápido como la cepa silvestre.

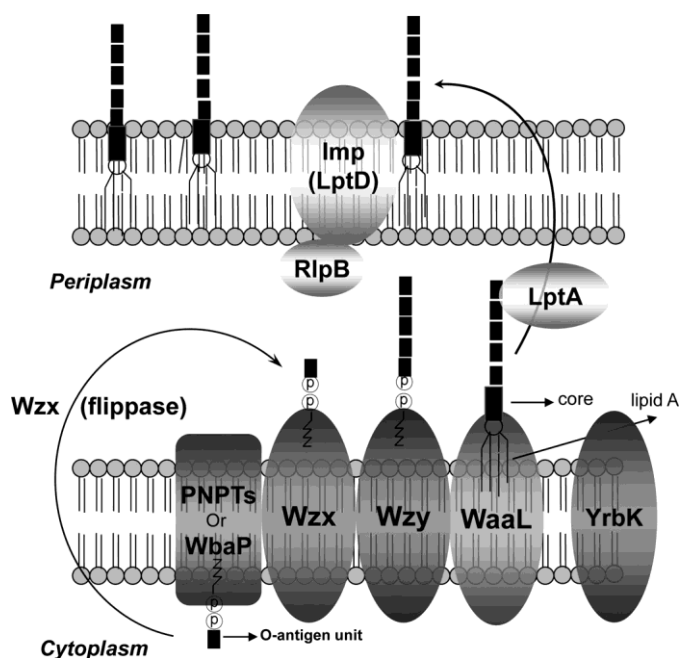


Figura 19. El ensamblaje del antígeno-O en *Francisella tularensis*. Las unidades de repetición se transfieren al periplasma y se polimerizan desde el extremo reductor por la O-antígeno polimerasa (*Wzy*). Tomado de ⁸⁰

Curvas de crecimiento y reducción de selenio a selenio elemental en las cepas mutantes

Al observar el crecimiento de las cepas deficientes en medio LB, la mayoría de las cepas tuvo un crecimiento similar a la cepa silvestre con una disminución inferior al 10% de crecimiento con la excepción de *sucA::km* (RF16) que tuvo un crecimiento lento (OD_{600} 24h, KT2440= 1,223; *sucA::km* (RF16)=0,841). Adicionalmente *wzy::km*, *cysG::km* no llegan a la fase estacionaria (10 h) al mismo tiempo que la cepa silvestre, sino que poseen una curva menos pronunciada y alargada alcanzando valores similares de OD_{600} hasta las 16 horas (Fig. 20). Las bacterias *sucA::km* pierden energía (ATP) y poder reductor (NADH) al no poder convertir el 2-oxoglutarato en succinato⁸¹. Por este motivo es esperable que una mutación de este tipo genere un crecimiento más lento. Por otro lado el gen *wzy*

es posible que una mutación en este gen genere una fase de crecimiento exponencial más lenta y alargada en el tiempo ya que es responsable del ensamblaje de una parte del lipopolisacárido de membrana⁷⁹. La cepa JJ3 tiene una mutación en *cysG* sin embargo, el comportamiento de otras cepas con la inserción del cassette de kanamicina en este gen (RF30 y RF31) tienen un crecimiento normal en LB, posiblemente esta divergencia en el crecimiento es debido al punto de inserción del cassette. Respecto a las curvas de crecimiento de las bacterias en medio LB con selenito 1 mM, se observa que los mutantes tienen valores de OD₆₀₀ similares o inferiores a la cepa silvestre a lo largo del tiempo (Fig. 21).

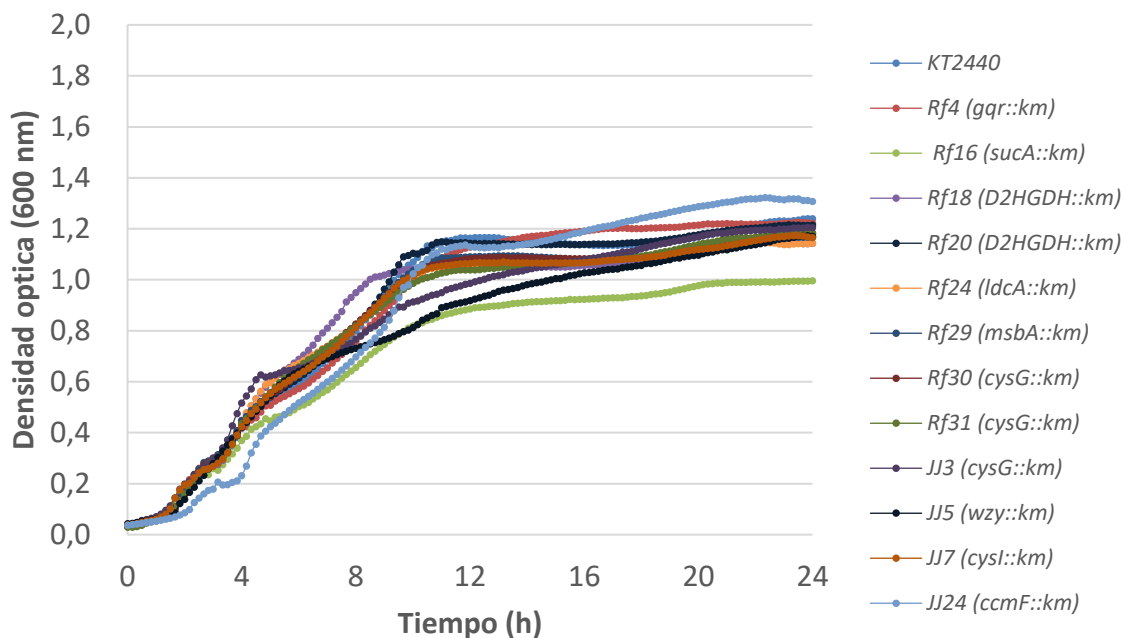


Figura 20. Curva de crecimiento de 24 h cepas mutantes deficientes de *P. putida* KT2440 en medio LB.

Hay que destacar que, con mediciones espectrofotométricas a esta longitud de onda, el selenio elemental también absorbe radiación o dispersa la misma, por lo que es claro que los valores de OD₆₀₀ medidos corresponden al crecimiento celular sumado a la acumulación de selenio elemental. Es esperable que mutantes que crecen de manera deficiente en LB sin selenito también lo hagan cuando se suplementa al medio. Este fue el caso para *sucA::km* (RF16) y *cysG::km* (JJ3) que obtuvieron los valores de OD₆₀₀ más bajos a las 24 horas al igual que *cysl::km* (JJ7) *ldc rA::km* (Rf24) y *ccmF::km* (JJ24). Al observar el crecimiento durante la fase exponencial, tres mutantes tuvieron retrasos importantes *ccmF::km* (JJ24), *sucA::km* (RF16) y *wzy::km* (JJ5) (Fig. 21). Sabemos por su comportamiento en el LB en ausencia de selenito, *sucA::km* (RF16) y *wzy::km* (JJ5) tienen problemas relacionados con el crecimiento, esto sumado a su participación indirecta en metabolismo del selenito como abastecimiento de precursores (*sucA*) y reparación/sustitución de componentes dañados de membrana por estrés oxidativo (*wzy*). Esto explicaría de una manera razonable los bajos valores de OD₆₀₀. La cepa *cysG::km* (JJ3) también presenta problemas de crecimiento, la mutación

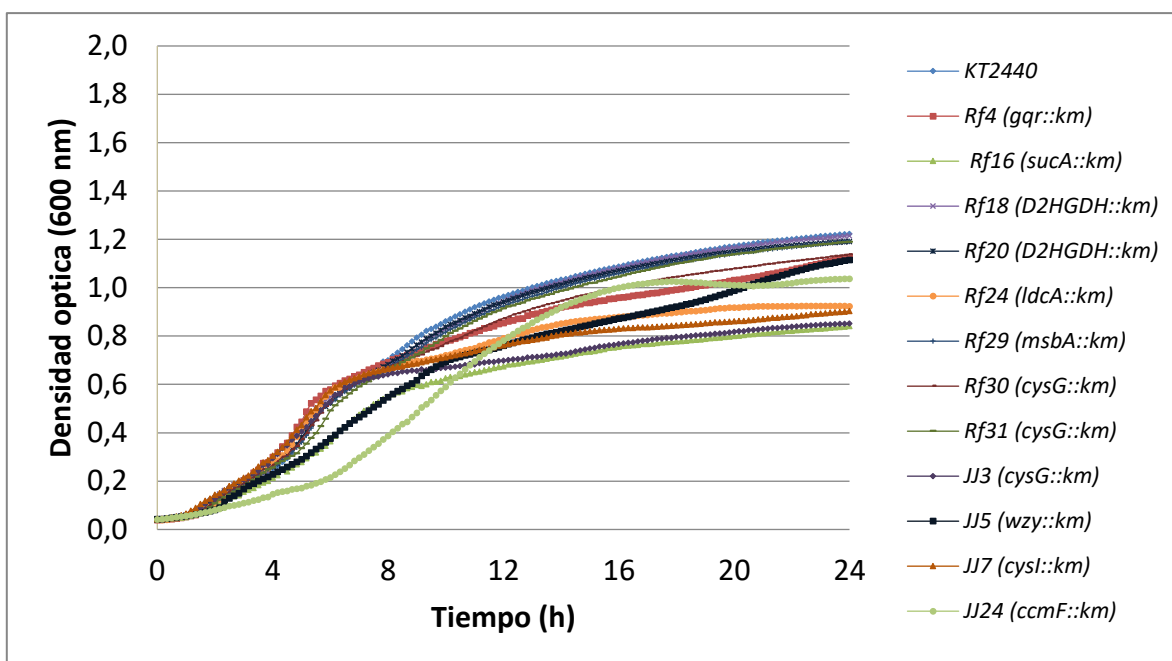


Figura 21. Curva de crecimiento de 24 h cepas mutantes deficientes de *P. putida* KT2440 en medio LB con selenito 1 mM.

en este gen está relacionada con procesos de catálisis del selenito por medio de la sulfito oxidorreductasa (*cysI*) y el valor bajo de OD se debe a su incapacidad de metabolizar selenito, esta sería la misma causa para *cysl::km* (JJ7). Por otra parte, *ccmF::km* (JJ24), además de tener participación en la catálisis del selenito, el citocromo c es parte importante de muchos otros procesos de oxidorreducción en membrana⁶⁵. Su fase exponencial es la más lenta y tardía de todas las cepas, empezando a las 5 h 50 mins (OD = 0,207) mientras el penúltimo en lograrlo fue *wzy::km* (JJ5) a las 3 h 30 mins (OD = 0,201) y la cepa silvestre a las 3h (OD = 0,206). Finalmente, *IdcA::km* (Rf24) está relacionado con el reciclaje de un componente de membrana: la mureína⁷⁴. Este gen no tiene relación directa con la catálisis del selenito, pero sugiere que el microorganismo al verse incapaz de reciclar los componentes de membrana disminuye el metabolismo del selenito, posiblemente promovido por daños oxidativos y formación de subproductos tóxicos.

Con el fin de tener datos más precisos y cuantitativos de la velocidad de biotransformación del selenito a selenio elemental en cada una de las cepas mutantes, se midió la cantidad de selenito remanente a las 24 horas de cultivo a través de FAAS. Como se esperaba, todas las cepas mutantes deficientes tienen valores de bioconversión inferiores a la cepa silvestre (Fig. 22). La cepa silvestre tiene una capacidad de reducción de selenito promedio de 80%, mientras que los mutantes transforman entre un 10% a un 70%. Los porcentajes de reducción más bajos fueron para los mutantes *D2HGDH::km* (RF18, RF20) así como para los genes relacionados con el metabolismo del azufre, específicamente *cysl::km* (JJ7) y *cysG::km* (RF30, JJ03) con menos del 20% de bioconversión. Sin embargo, *CysG::km* (RF31) tuvo un valor más alto que los otros mutantes para este gen, con un valor de aproximadamente 30%. Estos datos sugieren que genes relacionados con el abastecimiento

de precursores y metabolismo del azufre tienen el mayor impacto sobre la reducción de selenito a selenio elemental. No obstante, ninguno de los genes mutados es esencial para este proceso.

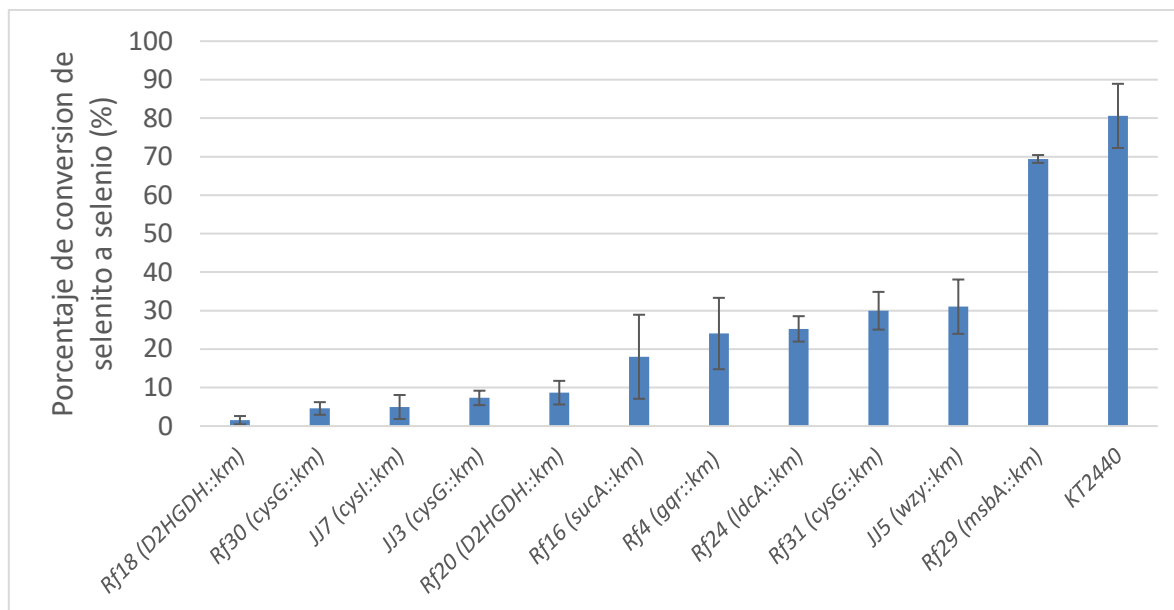


Figura 22. Reducción de selenito a selenio elemental a las 24 h en mutantes deficientes de *P. putida* KT2440 en medio LB con selenito 1 mM.

Como se mencionó anteriormente, además de los mutantes deficientes en la producción de nanopartículas de selenio, también se obtuvieron en el proceso de mutagénesis 3 cepas capaces de realizar el proceso de reducción a velocidades mayores que la cepa silvestre: JJ13 (*pp0051; FT FIS σ -54::km*), JJ14 (*pp0053; sqr/rho::km*) y JJ33 (*pp0052; pdo2::km*). Al igual que las cepas deficientes, estas se cultivaron en LB para evaluar su fisiología, observándose que su curva de crecimiento es similar a la de la cepa silvestre (Fig. 23).

Al cultivar estas cepas JJ13 (*FT FIS σ -54::km*), JJ14 (*sqr/rho::km*) y JJ33 (*pdo2::km*), en presencia de selenito, se observó que las mismas son capaces de metabolizar el selenito tiempo antes que la cepa silvestre (Fig. 24). Este efecto empieza a ser visible a partir de las 4 horas para las 3 cepas, que tienen un comportamiento casi idéntico, con menos de un 5% de desviación estándar en todos los 144 puntos a lo largo de la cinética de 24 h. Es claro que la diferencia en la densidad óptica observada en la figura 24 es producto de la absorbancia o dispersión de las nanopartículas de selenio y no debido a un crecimiento acelerado de los mutantes ya que en ausencia de selenito (Fig. 23) no se observan cambios en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre.

Para confirmar esta observación también determinamos la disminución en la concentración de selenito por la conversión a selenio elemental en las cepas JJ13 (*FT FIS σ -54::km*), JJ14 (*sqr/rho::km*) y JJ33 (*pdo2::km*). Para esto, se determinó el contenido de selenito remanente el sobrenadante desde las 0 h hasta 20 h con intervalos de 2,5 h. Los resultados demuestran que las cepas JJ13, JJ14 y JJ33 inicia el proceso de reducción varias horas antes que la cepa silvestre (Fig. 24), sin embargo el rendimiento de nanopartículas de selenio es el mismo en todos los casos después de 17 horas (Fig

25). En nuestro estudio publicado previamente concluimos que el proceso de reducción del selenito en *P. putida* KT2440, inicia en la fase exponencial²⁴. Los resultados obtenidos con los mutantes JJ13, JJ14 y JJ33 sugieren que ocurre un proceso de desrepresión metabólica que permite que los genes se activen desde el inicio de la fase exponencial temprana.

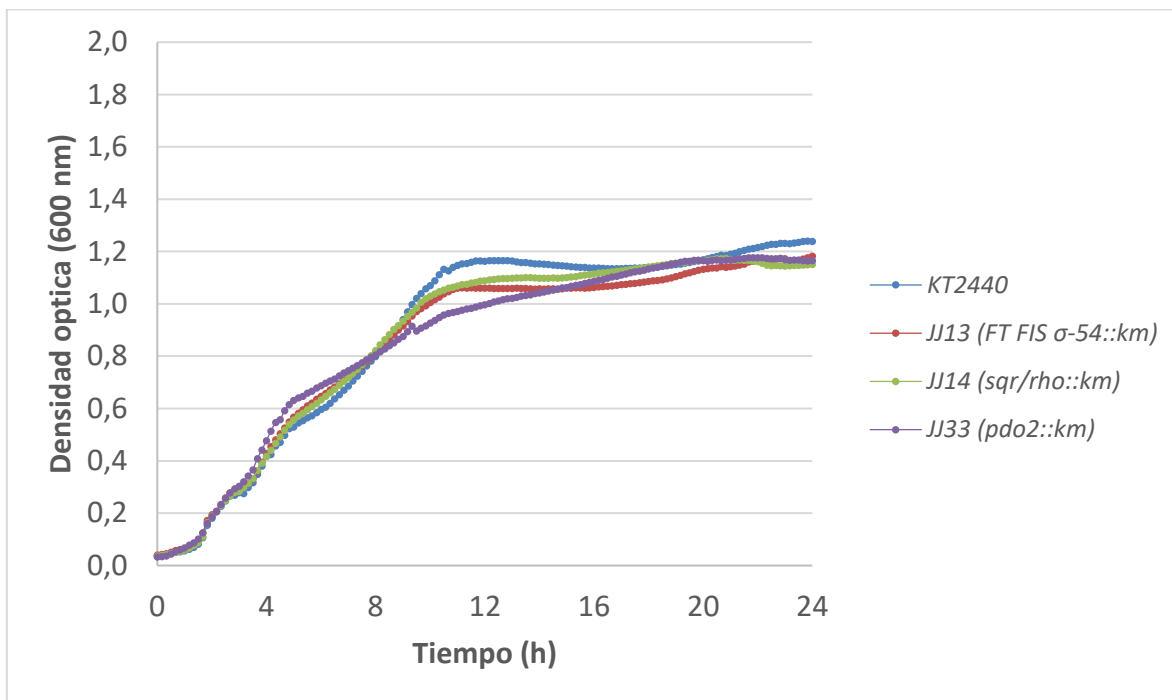


Figura 23. Curvas de crecimiento de 24 h de mutantes rápidos de *P. putida* KT2440 en medio LB.

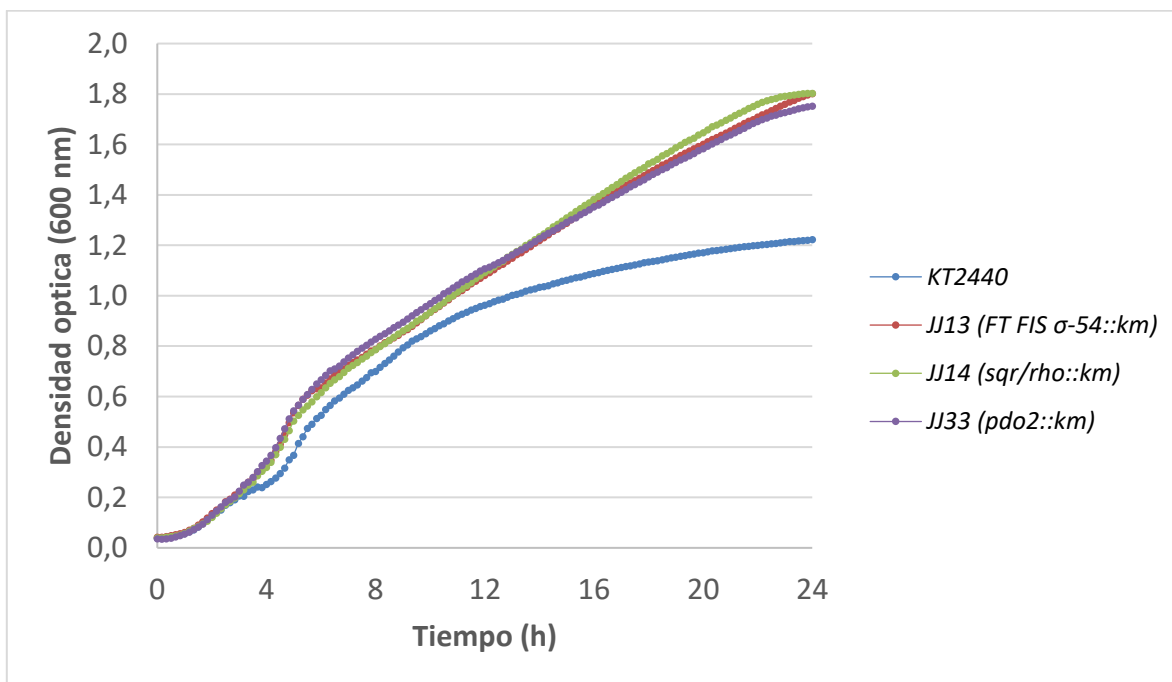


Figura 24. Curvas de crecimiento de 24 h mutantes rápidos de *P. putida* KT2440 en medio LB con selenito 1 mM

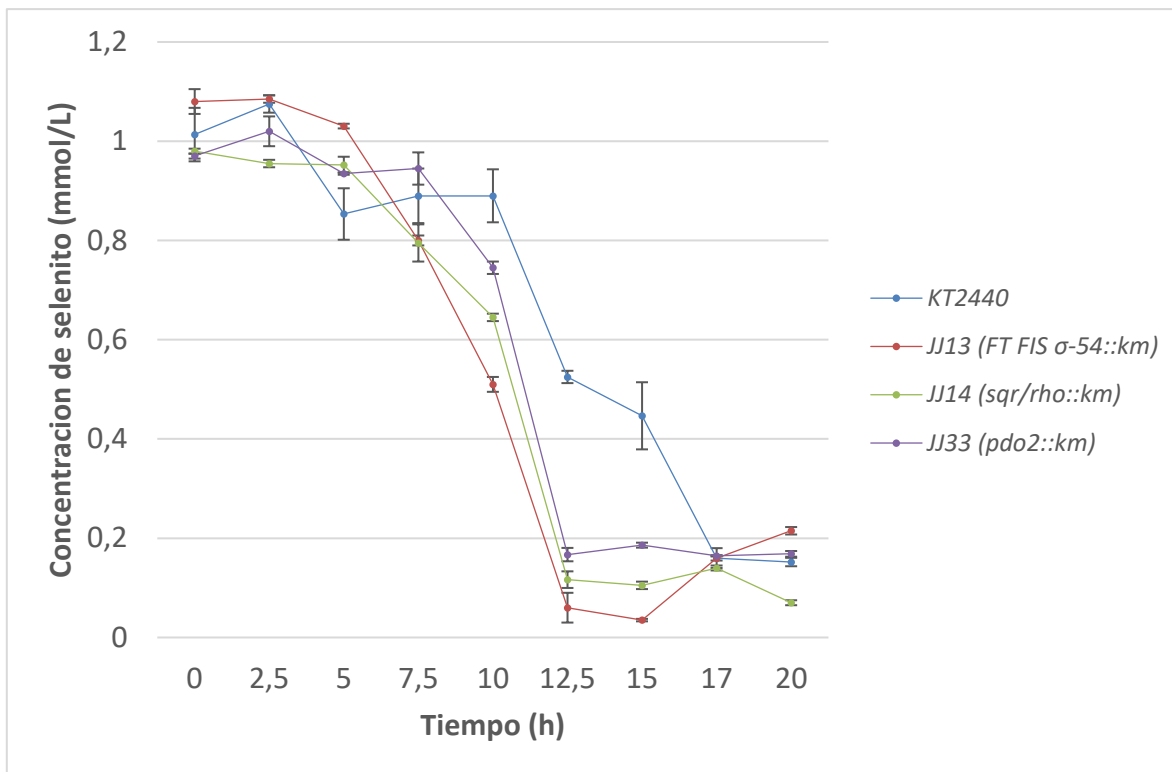


Figura 25. Disminución en la concentración de selenito por la conversión a selenio elemental en mutantes rápidos de *P. putida* KT2440 durante 20 h en medio LB con selenito 1 mM.

Complementación de las cepas mutantes deficientes en la reducción de selenito

Con el fin de validar adecuadamente los resultados obtenidos en la mutagénesis del pBAM1, se procedió a realizar la complementación de 9 de los mutantes deficientes en el proceso de reducción de selenito. Para ello, los genes fueron amplificados por PCR, clonados en el plásmido pSEVA438, y sobreexpresados en cada cepa mutante con el fin de evaluar si se produce la recuperación del proceso de reducción. En este caso, la confirmación de la recuperación del fenotipo es muy sencilla ya que se restablecería la formación del color rojizo en las colonias de *P. putida* debido a la acumulación de las nanopartículas de selenio. Como se observa en la figura 26, todas las cepas mutantes deficientes que fueron complementadas obtuvieron una coloración roja que denota la recuperación de la capacidad de producir selenio elemental, con la excepción de *D2HGDH::km* (RF20 y *ccmF::km*). Esto confirma la participación de los genes obtenidos en la mutagénesis en el proceso de reducción de selenito a selenio elemental.

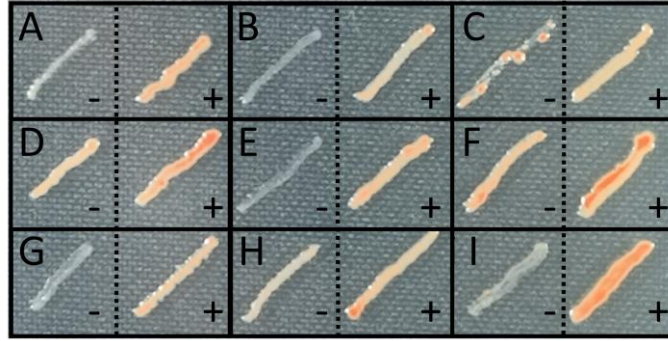


Figura 26. Complementación de cepas deficientes en medio LB con selenito 1 mM y 3-metil-benzoato (3MB) 0,5 mM. Fotografía tomada a las 24 horas. -: cepa sin complementación (plasmido pSEVA438 sin inserto). +: cepa complementada. A: Rf4 (*gqr::km*) B: Rf16 (*sucA::km*) C: Rf24 (*ldcA::km*) D: Rf29 (*msbA::km*) E: Rf30 (*cysG::km*) F: Rf31 (*cysG::km*) G: JJ3 (*cysG::km*) H: JJ5 (*wzy::km*) I: JJ7 (*cysl::km*)

Identificación de proteínas implicadas en el proceso de reducción de selenito

Con el fin de identificar proteínas que se expresen de forma diferencial en ausencia/presencia de selenito se analizó el perfil de proteínas en una dimensión (Fig. 1, anexos). En este experimento se logró determinar que la cepa silvestre en presencia de selenito produce mayor cantidad de una superóxido dismutasa dependiente de hierro. Al comparar la secuencia de péptidos, estas corresponden al producto del gen *sodB*, codificado en *P. putida* KT2440 como PP0915⁸². La función de esta enzima es la de transformar el radical aniónico superóxido, un compuesto altamente tóxico, en peróxido, un compuesto de una toxicidad inferior^{83,84}. El hecho de que esta enzima este en mayor cantidad cuando la bacteria se cultiva con selenito es razonable, ya que es necesario eliminar el superóxido generado como subproducto de la reducción de selenito a selenio elemental por medio de las rutas del glutatión y sulfito oxidoreductasa.

Cuadro 13. Péptidos identificados por espectrometría de masas de bandas recortadas en gel PAGE-SDS.

| Muestra | m/z | z | n | péptidos | confianza | Puntaje | Porcentaje de cobertura | Identificación por similitud | Gen | Código |
|---------|--------|---|---|----------------------|-----------|---------|-------------------------|------------------------------|-------------|--------|
| 1 | 2244.2 | 1 | 1 | AFELPPLPYAHDALQPHISK | 99 | 17 | 17.7 | Superóxido dismutasa [Fe] | <i>sodB</i> | Q88PD5 |
| | 1581.8 | 1 | 1 | TSVGTFGSGGWLVK | 99 | 9 | 7.6 | Superóxido dismutasa [Fe] | <i>sodB</i> | Q88PD5 |
| 2 | 1581.8 | 1 | 2 | TSVGTFGSGGWLVK | 99 | 9 | 7.6 | Superóxido dismutasa [Fe] | <i>sodB</i> | Q88PD5 |

Análisis de las rutas metabólicas implicadas en la producción de nanopartículas de selenio en *P. putida* KT2440.

Nuestros resultados apuntan a 4 módulos funcionales interconectados: 1) abastecimiento de poder reductor y bloques de construcción para precursores (*SucA pp4189*, *D2HGDH pp5154*, *PutA pp49472* 2) sistemas de catálisis (*Gqr pp3998*, *Cysl* & *siroheme pp2371*, *pp3999*, *ccmF pp4322*); 3) manejo de subproductos tóxicos (*SodB pp0915*); 4) síntesis y reparación de membrana (*LdcA pp4799*, *MsbA*

pp4935, *Wzy pp4936*). Además, se realizó la identificación de 3 cepas mutantes capaces de realizar la transformación del selenito a velocidades superiores que la cepa silvestre (FT FIS σ -54 *pp0051*; *Pdo2 pp0052*; *Sqr/Rho pp0053*).

Con respecto al primer módulo metabólico es claro que la producción de glutamato, glutatión y poder reductor son críticos para mantener para la reducción de selenito a selenio elemental. La síntesis de glutamato se realiza a partir 2-oxoglutarato del ciclo de ácidos tricarboxílicos, síntesis de serina o degradación de prolina^{85,86}. *Pseudomonas putida* KT2440 tiene reportado en su genoma la enzima encargada de este proceso, una glutamato sintetasa dependiente de NADPH (PP5076 + PP5075)²⁸. Una vez sintetizado el glutamato, el mismo se usa para la biosíntesis de glutatión y porfirinas como el citocromo c y siroheme (Fig. 27). Datos preliminares de ARN-seq y confirmados por PCR tiempo real realizados en el laboratorio del Dr. José I. Jiménez en la Universidad de Surrey indican que el gen *putA* (*pp4947*) cambió su expresión cuando *P. putida* KT2440 se cultivó en presencia del selenito (cuadro 1, anexos). Por tanto, con base a estos datos es posible hipotetizar que, para la reducción de selenito, *P. putida* KT2440 genera glutamato/glutatión a partir del 2-oxoglutarato (revelado por el mutante *D2HGDG::km*) y la degradación de prolina (revelado por la expresión aumentada de *putA* en el experimento de ARN-seq) y pierde capacidad de generar poder reductor si se afecta el ciclo de ácidos tricarboxílicos y su crecimiento empeora (mutante *SucA::km*). La generación de poder reductor es muy importante, ya que los procesos catalíticos requieren 3 NADPH por molécula de selenito para su reducción a selenio elemental adicional al poder reductor requerido para la síntesis *de novo* de las enzimas y cofactores implicados. La bacteria necesita abastecer estos procesos tomando precursores del metabolismo central. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos, al cual *SucA* pertenece, se enlaza por medio del piruvato al ciclo EDEMP (Entner – Doudoroff, Embden – Meyerhof – Parnas y las vías de la pentosa fosfato). El ciclo EDEMP dota a *P. putida* KT2440 de una red metabólica central de carbono capaz de satisfacer altas demandas de poder reductor. Esta habilidad surge de una arquitectura metabólica única que abarca el reciclaje parcial de triosas fosfatos a hexosas fosfatos^{37,38}. Es por esta razón que *P. putida* KT2440 un excelente chasis como biofabrica para esta clase de procesos de oxidorreducción. Por otro lado, las técnicas de mutagénesis (como la empleada en este estudio) tienen limitaciones para identificar genes que forman parte de un proceso metabólico cuando los genes tienen funciones esenciales o muy importantes ya que estas colonias no suelen crecer o lo hacen muy lentamente. Por ello, es posible que no se obtuviera una cepa mutante *putA::km* (*pp4947*) en la mutagénesis, cuando se hizo la selección en base a fenotipo.

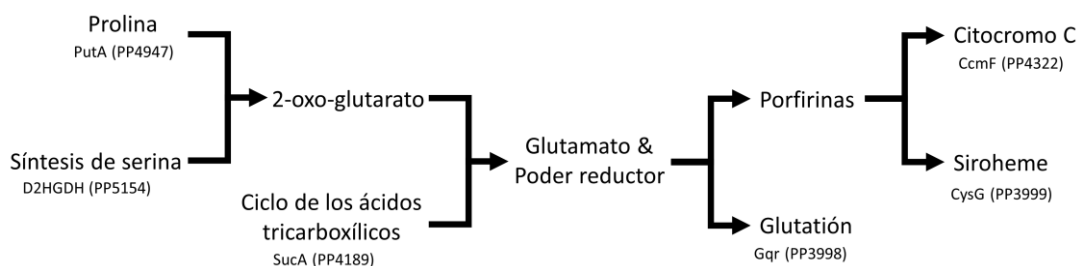


Figura 27. Diagrama propuesto en el que participan genes de mutantes para abastecer a la síntesis de precursores que catalizan la reducción de selenito a selenio elemental en *P. putida* KT2440.

Los resultados anteriores apuntan a la importancia de las rutas de síntesis del glutamato y glutatión para la reducción del selenito a selenio elemental, sin embargo, la obtención de un mutante *gqr::km* (*pp3998*) que codifica a una glutatiónil-hidroquinona reductasa confirma también la importancia de la forma reducida del glutatión en el proceso (Fig. 28). Estos resultados son acordes a los reportes previos, ya que una de las rutas descritas para la reducción del selenito a selenio elemental es por medio del glutatión¹⁶. Específicamente, en *P. moravenis* fue reportado que una enzima con actividad glutatión reductasa participa en la reducción del selenito⁸⁷. Al igual que en *Salmonella typhimurium*, *R. rubrum*, y *E. coli* entre otros^{16,88,89}. El fenotipo observado (mayor velocidad en la reducción del selenito) en los mutantes *pp0051*, *pp0052* y *pp0053* también dejan claro la importancia del glutatión en el proceso: las mutaciones generadas en estos genes parecen que eliminan una competencia directa por el glutatión.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de la enzima con actividad glutatión reductasa de *P. moravenis* contra el genoma de *P. putida* KT2440, la secuencia con el mejor alineamiento resultó ser PP3819 con un 99% de cobertura, 82.34% de identidad y está anotada como Gor, glutatión reductasa. Es muy posible que *P. putida* KT2440 utilice este gen para catalizar la reducción del glutatión disulfuro y selenito. Además del glutatión otra enzima reportada para esta reacción en el género *Pseudomonas* es la tiorredoxina reductasa²⁷. Hemos encontrado que Gqr puede estar implicada en esta reducción. Gqr sólo tiene un 57% de identidad con la de *E. coli*, por lo su función (Fig. 13) puede ser diferente en *P. putida* KT2440.

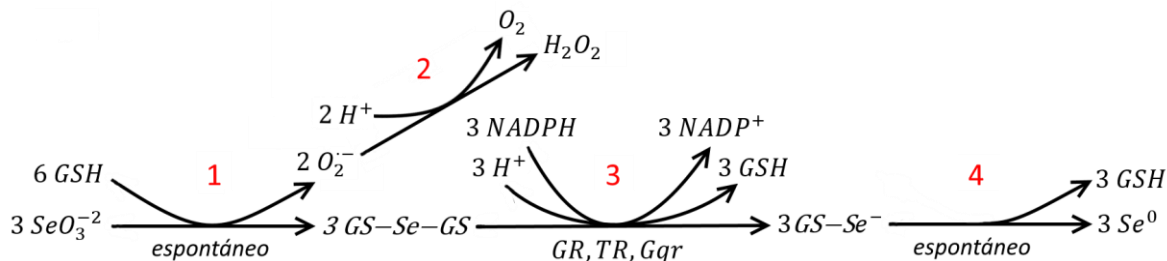


Figura 28. Diagrama propuesto de reducción de selenito por medio glutatión / tiorredoxina en *P. putida* KT2440. 1) Unión del selenito al glutatión reducido de manera espontánea y generación de selenio diglutatión y superóxido. 2) Eliminación del superóxido por *SodB* (PP0915). 3) Reducción a selenio persulfato de glutatión, consumo de poder reductor (NADPH) y reducción del glutatión / tiorredoxina por *Gqr* (PP3998), *Gor* (GR, PP3819) y/o *TrxB* (TR, PP0786). 4) Liberación de selenio elemental y glutatión. Adaptado de ¹⁶.

La segunda vía metabólica claramente implicada en la producción de nanopartículas de selenio a partir del selenito es la relacionada con el metabolismo del azufre. Los resultados sugieren la participación de dos rutas metabólicas redundantes: una por medio de la sulfito reductasa (CysI + siroheme) y la otra catalizada por *Sqr/Rho* y *Pdo2*. Ambas rutas están relacionadas específicamente con la conversión de sulfuro a sulfito. Para la ruta de *Sqr/Rho* y *Pdo2* nuestra hipótesis en *P. putida* KT2440 es que *Sqr* oxida el sulfuro a polisulfuro; la actividad rodanasa de PP0053, mejora la reacción de los polisulfuros con glutatión para producir GSSH; *Pdo2* oxida GSSH a sulfito; y el sulfito reacciona espontáneamente con los polisulfuros para generar tiosulfato (Fig. 29). Debido a que la química del azufre y el selenio es muy similar, nosotros hipotetizamos que estas enzimas también reconocen los compuestos de selenio. Podemos asumir que los mutantes capaces de producir selenio a mayor velocidad (*pp0051*, *pp0052*, *pp0053*) acumulan sulfuro de hidrógeno, el exceso de este compuesto

únicamente puede ser canalizado hacia sulfito por la sulfito reductasa (CysI + siroheme). Por esta razón aumenta el poder de reducción (3 NADPH) y las reservas reducidas del glutatión disponibles al no verse invertidos en este proceso que normalmente se utilizarían por este operón. Este poder reductor y glutatión reducido extra disponible se puede utilizar en otro sistema redox como glutatión / tioredoxina para reducir el selenito a selenio elemental más eficiente, explicando por qué estos mutantes son capaces de reducir más rápidamente el selenito a selenio elemental.

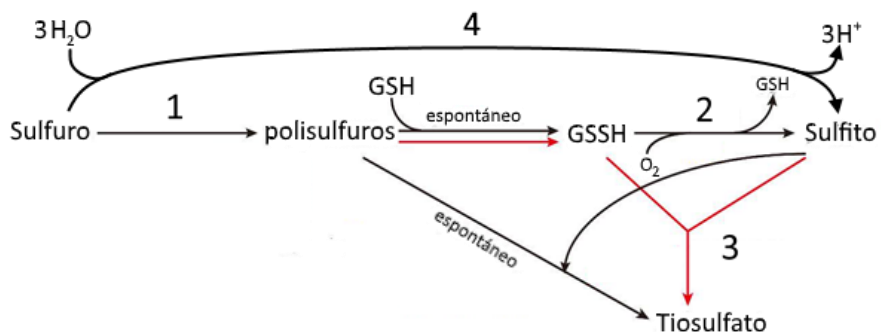


Figura 29. Ruta propuesta del metabolismo del azufre en la que participan genes relacionados con el metabolismo del selenio en *P. putida* KT2440. 1) Actividad sulfuro reductasa por Sqr (PP0053), 2) Actividad persulfuro dioxigenasa (PP0052). 3) En rojo: actividad rodanasa (PP0053). 4) Actividad sulfito oxidorreductasa por CysI + siroheme (PP3999, PP2371). Adaptado de ⁵⁶.

Otra posible hipótesis, explicaría por qué los mutantes en *pp0051*, *pp0052* y *pp0053* reducen el selenito más rápidamente que la cepa silvestre. En algunas bacterias, como *E. coli*, la sulfito reductasa puede aceptar selenito como sustrato de manera inespecífica⁹⁰. El selenito es estructuralmente análogo al sulfito y es probable que sea un competidor para el sitio activo de la enzima. Si este es el caso en *P. putida* KT2440, la enzima PP2371 (CysI) metaboliza el sulfuro extra acumulado en los mutantes rápidos (*pp0051*, *pp0052* y *pp0053*), y como efecto secundario reduce por inespecificidad el selenito por diferencia de concentración a seleniuro de hidrógeno. El ion seleniuro de hidrogeno reacciona con oxígeno ambiental de manera abiótica generando selenio elemental y superóxido⁹¹. Esto desplaza el balance de la reacción a favor en este sentido evitando que se revierta y acumulando el selenio elemental gradualmente (Fig. 30). Dado que esta enzima y su cofactor, siroheme (CysG; *pp3999*) serían inducidos por el exceso de sulfuro en estos mutantes, esto aumentará la reducción de selenito a seleniuro y luego a selenio elemental como efecto colateral. Este aumento de la eficacia puede explicarse por un pequeño bucle metabólico en el que 3 NADPH generados por la oxidación del sulfuro podrían usarse en la reducción de selenito y luego el NADP⁺ sería regenerado nuevamente por el sulfuro de hidrógeno (Fig. 30). Esto adicionalmente explicaría por qué los mutantes *cysI::km* y *cysG::km* tienen un fenotipo blanco, ya que tiene un sistema redox principal ausente para reducir el selenito a selenio elemental.

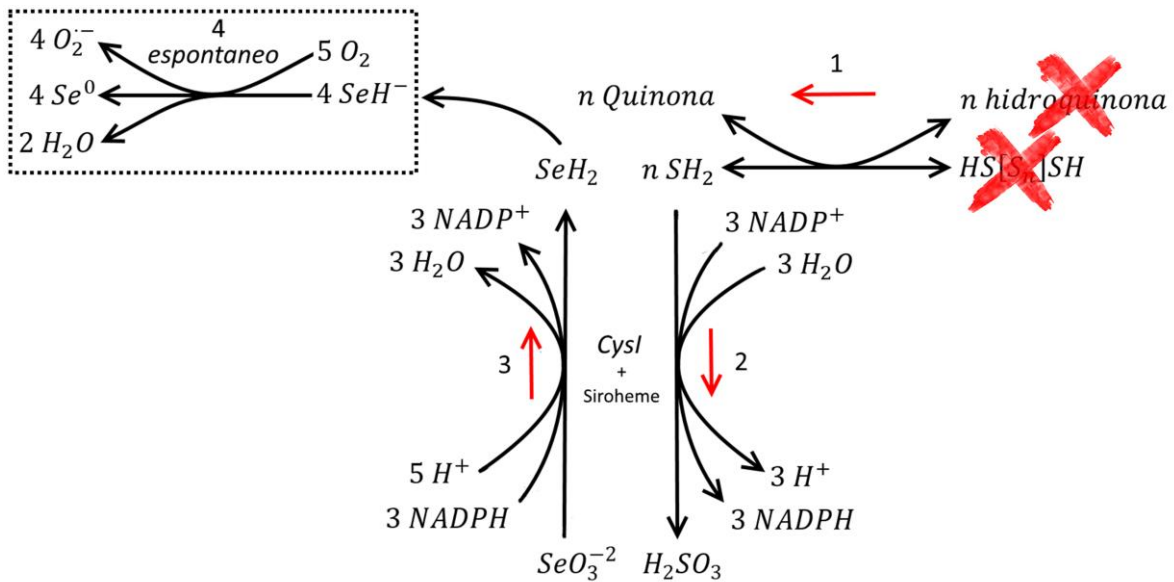


Figura 30. Ruta propuesta de reducción de selenito por medio de sulfito oxidoreductasa por actividad inespecífica (CysI + Siroheme) en *P. putida* KT2440. 1) Mutantes rápidos (*pp0051*, *pp0052* y *pp0053*) no pueden generar polisulfuro, acumulan sulfuro de hidrógeno extra 2) El sulfuro se oxida generando poder reductor (3 NADPH) 3) Inespecíficamente se reduce el selenito a seleniuro de hidrógeno. 4) El seleniuro de hidrógeno reacciona con oxígeno generando selenio elemental, agua y superóxido.

Con los resultados obtenidos durante este proyecto hemos identificado puntos claves en el proceso de producción de nanopartículas de selenio en *P. putida*. (Fig. 31). Demostramos cómo genes relacionados con el metabolismo central son utilizados para generar compuestos básicos (glutamato/glutación) y poder reductor (NADH / NADPH) para la transformación del selenito a selenio elemental. El glutamato es un precursor necesario para las porfirinas, que son uno de los bloques de construcción de los sistemas catalíticos de la reducción del selenito, como el citocromo C que actúa con el ciclo Q como un sistema redox de membrana, además se usa en la síntesis del cofactor siroheme de sulfito reductasa (*CysI*), y es necesario para sintetizar glutación, que tiene un papel protagónico en este proceso. Hemos demostrado que en cepas mutantes del operón hipotético *pdo2 – sqr/rho - tauE/safE* la reducción del selenito a selenio elemental se ve mejorada debido a que aumenta la cantidad de sulfito oxidoreductasa (*CysI*) y glutación disponible en la célula. Además, observamos que, para lidiar con sustancias altamente tóxicas como el superóxido, la bacteria necesita de proteínas para contrarrestar el estrés oxidativo y eliminarlas (como por ejemplo la superóxido dismutasa). Es muy posible que estas sustancias les generen daño a componentes de membrana y afecten procesos de síntesis o su reciclaje. En cepas donde estos sistemas de síntesis de membrana y reciclaje están mutados la capacidad de reducir el selenito se vio disminuida.

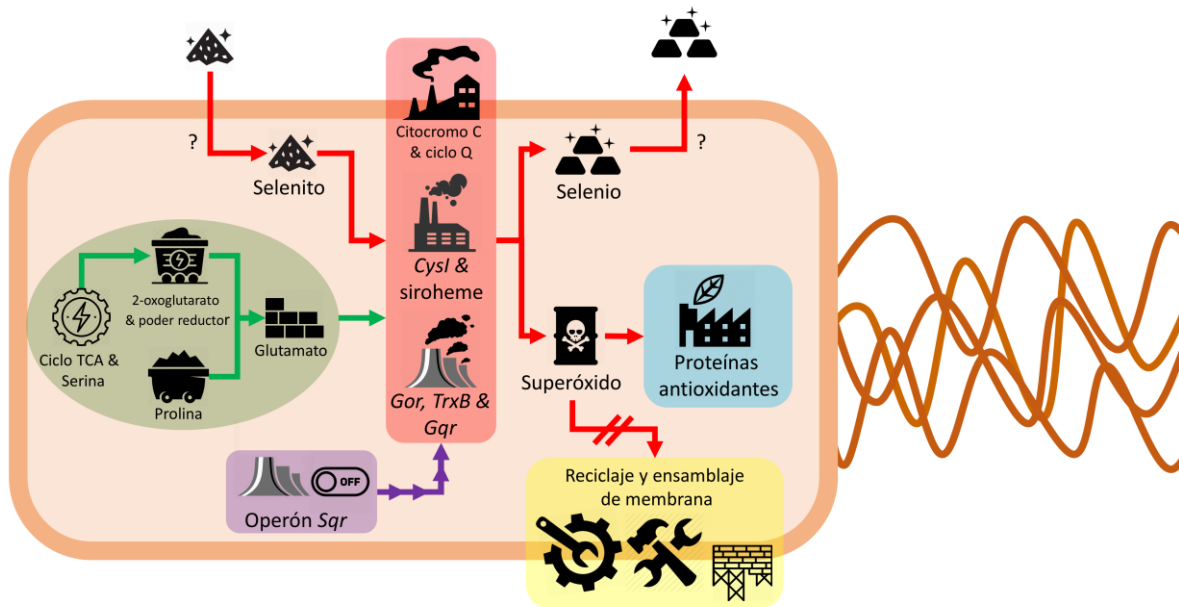


Figura 31. Diagrama general propuesto de reducción de selenito a selenio elemental en *P. putida* KT2440 como biofabrica para la biomineralización de selenito a selenio elemental. Verde: Abastecimiento de precursores por SucA (PP4189), D2HGDH (PP5154), PutA (PP4947). Rojo: reducción del selenito dada por 3 sistemas 1) Gor (PP3819) TrxB (PP0786), reducción de glutatión por Gqr (PP3998) 2) CysI & siroheme (PP2371, PP_3999) 3) ccmF (PP4322). Violeta: operón sqr (*FT FIS σ -54* PP0051; *Pdo2* PP0052; *Sqr/Rho* PP0053; *TauE/SafE* PP0054) compete por glutatión, al mutar sus genes, la reducción de selenito mejora. Amarillo: genes relacionados con el reciclaje y ensamblaje de membrana *LdcA* (PP4799) *MsbA* (PP_4935) *Wzy* (PP_4936). Celeste: proteínas antioxidantes identificadas encargadas de reducir el estrés oxidativo como subproducto de la generación de selenio elemental: *SodB* (PP915).

Conclusiones.

Este trabajo, identifica genes implicados en la producción de nanopartículas de selenio a partir de selenito en la bacteria del suelo *P. putida* KT2440. Nuestros resultados sugieren que el proceso de reducción se lleva a cabo por genes relacionados con la síntesis de la forma reducida del glutatión, así como por genes del metabolismo del azufre. Además, reportamos como la mutación de genes de un único operón putativo pueden potenciar aún más la capacidad de *P. putida* para producir nanopartículas de selenio lo cual es una observación de interés biotecnológico. Es importante destacar que el metabolismo de esta especie está adaptado para producir un alto poder reductor³⁶⁻³⁸ el cual es requerido para la bioconversión de selenito a selenio elemental. Como se ha descrito en la literatura esto sucede gracias a que posee un metabolismo central que enlaza las enzimas de la ruta de las pentosas, el paso de Embden-Meyerhof-Parnas, y el paso del Entner-Doudoroff y ciclo de ácidos tricarbóxicos^{36,37,92}. Estas rutas metabólicas permiten la generación de intermediarios flexibles como bloques básicos de construcción, NADH / NADPH en concentraciones que dan a *P. putida* KT2440 una mayor resistencia al estrés oxidativo en comparación con otras bacterias^{36,92}. Estas tres características: gran poder reductor, su versatilidad para redireccionar intermediarios del metabolismo central a biosíntesis de precursores para sistemas catalíticos y alta resistencia al estrés

oxidativo hacen de *P. putida* KT2440 una bacteria idónea para catalizar procesos de reducción como la biomineralización de selenio a partir de selenito.

Recomendaciones y futuro trabajo

Este trabajo establece las bases del metabolismo global de selenio en *P. putida* KT2440. Sin embargo, quedan preguntas aun por responder y se requiere validación experimental a través de ensayos bioquímicos para confirmar nuestras hipótesis. Es importante verificar las actividades catalíticas de glutatión reductasa, tiorredoxina reductasa, y sulfito reductasa, así como determinar los niveles de glutatión reducido en la cepa silvestre y mutantes. También sería de gran valor caracterizar el factor transcripcional PP0051 ya que se desconoce muy poco de este gen y si este es capaz de regular a los otros genes miembros del operón putativo (*pp0052*, *pp0053* y *pp0054*).

Bibliografía

1. Rayman, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Br. J. Nutr.* **100**, 254–68 (2008).
2. Turner, R. J., Weiner, J. H. & Taylor, D. E. Selenium metabolism in *Escherichia coli*. *Biometals* **11**, 223–227 (1998).
3. Thakkar, K. N., Mhatre, S. S. & Parikh, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine* **6**, 257–62 (2010).
4. Nancharaiah, Y. V. & Lens, P. N. L. Selenium biomineralization for biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **33**, 323–30 (2015).
5. Baedecker, M. J., Friedman, L. C., Survey, N. R. P. G. & U.S., G. S. *The U.S. Geological Survey National Research Program in the hydrologic sciences*. (U.S. Dept. of the Interior, U.S. Geological Survey, 2000).
6. Steinberg, N. A. & Oremland, R. S. Dissimilatory selenate reduction potentials in a diversity of sediment types. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3550–7 (1990).
7. Ike, M., Takahashi, K., Fujita, T., Kashiwa, M. & Fujita, M. Selenate reduction by bacteria isolated from aquatic environment free from selenium contamination. *Water Res.* **34**, 3019–3025 (2000).
8. Bajaj, M., Schmidt, S. & Winter, J. Formation of Se (0) nanoparticles by *Duganella* sp. and *Agrobacterium* sp. isolated from Se-laden soil of North-East Punjab, India. *Microb. Cell Fact.* **11**, 64 (2012).
9. Yee, N., Ma, J., Dalia, a., Boonfueng, T. & Kobayashi, D. Y. Se(VI) reduction and the precipitation of Se(0) by the facultative bacterium *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 are regulated by FNR. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1914–1920 (2007).
10. Oremland, R. S. *et al.* Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 52–60 (2004).

11. Tugarova, A. V. *et al.* Reduction of Selenite by *Azospirillum brasilense* with the Formation of Selenium Nanoparticles. *Microb. Ecol.* **68**, 495–503 (2014).
12. Debieux, C. M. *et al.* A bacterial process for selenium nanosphere assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13480–13485 (2011).
13. Torres, S. K. *et al.* Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *J. Nanoparticle Res.* **14**, 1236 (2012).
14. Schröder, I., Rech, S., Krafft, T. & Macy, J. M. Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*. *J. Biol. Chem.* **272**, 23765–23768 (1997).
15. Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., Tata, V. De & Casini, A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1499–1503 (2003).
16. Kessi, J. & Hanselmann, K. W. Similarities between the abiotic reduction of selenite with glutathione and the dissimilatory reaction mediated by *Rhodospirillum rubrum* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **279**, 50662–50669 (2004).
17. Bebien, M., Chauvin, J.-P., Adriano, J.-M., Grosse, S. & Vermeglio, A. Effect of Selenite on Growth and Protein Synthesis in the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4440–4447 (2001).
18. Ren, Y. *et al.* Antitumor activity of hyaluronic acid-selenium nanoparticles in Heps tumor mice models. *Int. J. Biol. Macromol.* **57**, 57–62 (2013).
19. Yang, J. *et al.* Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Dig. Dis. Sci.* **54**, 246–54 (2009).
20. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–22 (1999).
21. Tran, P. a. & Webster, T. J. Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 1553–1558 (2011).
22. Prasad, K. S., Patel, H., Patel, T., Patel, K. & Selvaraj, K. Biosynthesis of Se nanoparticles and its effect on UV-induced DNA damage. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **103**, 261–266 (2013).
23. Martínez-garcía, E. & Lorenzo, V. De. Synthetic Gene Networks. **813**, 267–283 (2012).
24. Avendaño, R. *et al.* Production of selenium nanoparticles in *Pseudomonas putida* KT2440. *Sci. Rep.* **6**, 37155 (2016).
25. Lortie, L., Gould, W. D., Rajan, S., McCready, R. G. L. & Cheng, K. J. Reduction of selenate and selenite to elemental selenium by a *Pseudomonas stutzeri* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4042–4044 (1992).
26. Li, X. *et al.* Draft Genome Sequence of Se(IV)-Reducing Bacterium *Pseudomonas migulae* ES3-33. *Genome Announc.* **3**, e00406-15 (2015).
27. Hunter, W. J. *Pseudomonas seleniipraecipitans* proteins potentially involved in selenite

- reduction. *Curr. Microbiol.* **69**, 69–74 (2014).
28. Belda, E. *et al.* The revisited genome of *Pseudomonas putida* KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis. *Environ. Microbiol.* **18**, 3403–3424 (2016).
 29. Nelson, K. E. *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**, 799–808 (2002).
 30. Timmis, K. N. *Pseudomonas putida*: a cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* **4**, 779–81 (2002).
 31. Kampers, L. F. C., Volkers, R. J. M. & Martins Dos Santos, V. A. P. *Pseudomonas putida* KT2440 is HV1 certified, not GRAS. *Microb. Biotechnol.* **12**, 845–848 (2019).
 32. Nikel, P. I., Martínez-García, E. & De Lorenzo, V. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 368–379 (2014).
 33. Jiménez, J. I., Miñambres, B., García, J. L. & Díaz, E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **4**, 824–841 (2002).
 34. Martins Dos Santos, V. A. P., Heim, S., Moore, E. R. B., Strätz, M. & Timmis, K. N. Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* **6**, 1264–1286 (2004).
 35. De Lorenzo, V. From the selfish gene to selfish metabolism: Revisiting the central dogma. *BioEssays* **36**, 226–235 (2014).
 36. Chavarría, M., Nikel, P. I., Pérez-Pantoja, D. & de Lorenzo, V. The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ. Microbiol.* **15**, 1772–85 (2013).
 37. Nikel, P. I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U. & de Lorenzo, V. *Pseudomonas putida* KT2440 Strain Metabolizes Glucose through a Cycle Formed by Enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and Pentose Phosphate Pathways. *J. Biol. Chem.* **290**, 25920–32 (2015).
 38. Nikel, P. I., Chavarría, M., Danchin, A. & de Lorenzo, V. From dirt to industrial applications: *Pseudomonas putida* as a Synthetic Biology chassis for hosting harsh biochemical reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **34**, 20–29 (2016).
 39. Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S. & De Lorenzo, V. SEVA 2.0: An update of the Standard European Vector Architecture for de-/re-construction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Res.* **43**, D1183–D1189 (2015).
 40. Aparicio, T., de Lorenzo, V. & Martínez-García, E. CRISPR/Cas9-Based Counterselection Boosts Recombineering Efficiency in *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. J.* **13**, 1–10 (2018).
 41. Herrero, M., De Lorenzo, V. & Timmis, K. N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **172**, 6557–6567 (1990).

42. Winsor, G. L. *et al.* Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* **44**, D646-53 (2016).
43. Sattler, S. A. *et al.* Characterizations of Two Bacterial Persulfide Dioxygenases of the Metallo- β -lactamase Superfamily. *J. Biol. Chem.* **290**, 18914–18923 (2015).
44. Crane, B. R., Siegel, L. M. & Getzoff, E. D. Structures of the siroheme- and Fe4S4-containing active center of sulfite reductase in different states of oxidation: heme activation via reduction-gated exogenous ligand exchange. *Biochemistry* **36**, 12101–19 (1997).
45. Crane, B. R., Siegel, L. M. & Getzoff, E. D. Sulfite reductase structure at 1.6 Å: Evolution and catalysis for reduction of inorganic anions. *Science (80-.)*. **270**, 59–67 (1995).
46. Warren, M. J. *et al.* Enzymatic synthesis of dihydrosirohydrochlorin (precorrin-2) and of a novel pyrrocorphin by uroporphyrinogen III methylase. *FEBS Lett.* **261**, 76–80 (1990).
47. Warren, M. J., Roessner, C. A., Santander, P. J. & Scott, A. I. The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes S-adenosylmethionine-dependent uroporphyrinogen III methylase. *Biochem. J.* **265**, 725–9 (1990).
48. Spencer, J. B., Stolowich, N. J., Roessner, C. A. & Scott, A. I. The *Escherichia coli* *cysG* gene encodes the multifunctional protein, siroheme synthase. *FEBS Lett.* **335**, 57–60 (1993).
49. Woodcock, S. C. *et al.* Effect of mutations in the transmethylase and dehydrogenase/chelatase domains of sirohaem synthase (CysG) on sirohaem and cobalamin biosynthesis. *Biochem. J.* **330**, 121–9 (1998).
50. Woodcock, S. C. & Warren, M. J. Evidence for a covalent intermediate in the S-adenosyl-L-methionine-dependent transmethylase reaction catalysed by sirohaem synthase. *Biochem. J.* **313**, 415–21 (1996).
51. Theissen, U., Hoffmeister, M., Grieshaber, M. & Martin, W. Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1564–74 (2003).
52. Hildebrandt, T. M. & Grieshaber, M. K. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J.* **275**, 3352–3361 (2008).
53. Jackson, M. R., Melideo, S. L. & Jorns, M. S. Human sulfide:Quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry* **51**, 6804–6815 (2012).
54. Libiad, M., Yadav, P. K., Vitvitsky, V., Martinov, M. & Banerjee, R. Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 30901–30910 (2014).
55. Shibata, H. & Kobayashi, S. Characterization of a HMT2-like enzyme for sulfide oxidation from *Pseudomonas putida*. *Can. J. Microbiol.* **52**, 724–30 (2006).

56. Xin, Y., Liu, H., Cui, F., Liu, H. & Xun, L. Recombinant *Escherichia coli* with sulfide:quinone oxidoreductase and persulfide dioxygenase rapidly oxidises sulfide to sulfite and thiosulfate via a new pathway. *Environ. Microbiol.* **18**, 5123–5136 (2016).
57. Liu, H., Xin, Y. & Xun, L. Distribution, Diversity, and Activities of Sulfur Dioxygenases in Heterotrophic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1799–1806 (2014).
58. Osuna, R., Lienau, D., Hughes, K. T. & Johnson, R. C. Sequence, regulation, and functions of *fis* in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **177**, 2021–32 (1995).
59. Wilson, R. L. *et al.* *Fis*, a DNA nucleoid-associated protein, is involved in *Salmonella typhimurium* SPI-1 invasion gene expression. *Mol. Microbiol.* **39**, 79–88 (2001).
60. Wold, S., Crooke, E. & Skarstad, K. The *Escherichia coli* *Fis* protein prevents initiation of DNA replication from *oriC* in vitro. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3527–32 (1996).
61. Green, A. R., Hayes, R. P., Xun, L. & Kang, C. Structural Understanding of the Glutathione-dependent Reduction Mechanism of Glutathionyl-Hydroquinone Reductases. *J. Biol. Chem.* **287**, 35838–35848 (2012).
62. Lam, L. K. M., Zhang, Z., Board, P. G. & Xun, L. Reduction of benzoquinones to hydroquinones via spontaneous reaction with glutathione and enzymatic reaction by *S*-glutathionyl-hydroquinone reductases. *Biochemistry* **51**, 5014–21 (2012).
63. Xun, L. *et al.* *S*-Glutathionyl-(chloro)hydroquinone reductases: a novel class of glutathione transferases. *Biochem. J.* **428**, 419–27 (2010).
64. San Francisco, B., Sutherland, M. C. & Kranz, R. G. The CcmFH complex is the system I holo-cytochrome *c* synthetase: engineering cytochrome *c* maturation independent of CcmABCDE. *Mol. Microbiol.* **91**, 996–1008 (2014).
65. Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G. & Merchant, S. Molecular mechanisms of cytochrome *c* biogenesis: three distinct systems. *Mol. Microbiol.* **29**, 383–96 (1998).
66. Borsetti, F., Francia, F., Turner, R. J. & Zannoni, D. The Thiol:Disulfide Oxidoreductase DsbB Mediates the Oxidizing Effects of the Toxic Metalloid Tellurite (TeO₃²⁻) on the Plasma Membrane Redox System of the Facultative Phototroph *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* **189**, 851–859 (2007).
67. Frank, R. A. W., Price, A. J., Northrop, F. D., Perham, R. N. & Luisi, B. F. Crystal structure of the E1 component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. *J. Mol. Biol.* **368**, 639–51 (2007).
68. Shi, Q., Chen, H.-L., Xu, H. & Gibson, G. E. Reduction in the E2k Subunit of the -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Has Effects Independent of Complex Activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 10888–10896 (2005).
69. Achouri, Y. *et al.* Identification of a dehydrogenase acting on D-2-hydroxyglutarate. *Biochem. J.* **381**, 35–42 (2004).
70. Araújo, W. L. *et al.* Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron

transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* **22**, 1549–63 (2010).

71. Engqvist, M. K. M. *et al.* Plant d-2-Hydroxyglutarate Dehydrogenase Participates in the Catabolism of Lysine Especially during Senescence. *J. Biol. Chem.* **286**, 11382–11390 (2011).
72. Zhang, W. *et al.* Coupling between d-3-phosphoglycerate dehydrogenase and d-2-hydroxyglutarate dehydrogenase drives bacterial l-serine synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E7574–E7582 (2017).
73. Templin, M. F., Ursinus, A. & Höltje, J. V. A defect in cell wall recycling triggers autolysis during the stationary growth phase of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 4108–17 (1999).
74. Park, J. T. & Uehara, T. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 211–27 (2008).
75. Polissi, A. & Georgopoulos, C. Mutational analysis and properties of the *msbA* gene of *Escherichia coli*, coding for an essential ABC family transporter. *Mol. Microbiol.* **20**, 1221–33 (1996).
76. Zhou, Z., White, K. A., Polissi, A., Georgopoulos, C. & Raetz, C. R. Function of *Escherichia coli* *MsbA*, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 12466–75 (1998).
77. Doerrler, W. T. & Raetz, C. R. H. ATPase activity of the *MsbA* lipid flippase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 36697–705 (2002).
78. Bengoechea, J. A. *et al.* Functional characterization of Gne (UDP-N-acetylglucosamine-4-epimerase), Wzz (chain length determinant), and Wzy (O-antigen polymerase) of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *J. Bacteriol.* **184**, 4277–87 (2002).
79. Yi, W. *et al.* Formation of a new O-polysaccharide in *Escherichia coli* O86 via disruption of a glycosyltransferase gene involved in O-unit assembly. *Carbohydr. Res.* **341**, 2254–2260 (2006).
80. Kim, T. *et al.* Characterization of the O-antigen polymerase (Wzy) of *Francisella tularensis*. *J. Biol. Chem.* **285**, 27839–49 (2010).
81. Sudarsan, S. *et al.* Dynamics of benzoate metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Metab. Eng. Commun.* **3**, 97–110 (2016).
82. Kim, Y. C., Miller, C. D. & Anderson, A. J. Transcriptional regulation by iron of genes encoding iron- and manganese-superoxide dismutases from *Pseudomonas putida*. *Gene* **239**, 129–35 (1999).
83. Bakshi, C. S. *et al.* Superoxide dismutase B gene (*sodB*)-deficient mutants of *Francisella tularensis* demonstrate hypersensitivity to oxidative stress and attenuated virulence. *J. Bacteriol.* **188**, 6443–8 (2006).
84. Sorkin, D. L. & Miller, A. F. Spectroscopic measurement of a long-predicted active site pK in iron-superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **36**, 4916–24 (1997).
85. Vanoni, M. A. & Curti, B. Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. *Cell. Mol.*

Life Sci. **55**, 617–38 (1999).

86. Vílchez, S., Manzanera, M. & Ramos, J. L. Control of expression of divergent *Pseudomonas putida* put promoters for proline catabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5221–5 (2000).
87. Nemeth, R., Neubert, M., Butz, Z. J., Ni, T. W. & Ackerson, C. J. Metalloid Reductase of *Pseudomonas moravenis* Stanleyae Conveys Nanoparticle Mediated Metalloid Tolerance. *ACS omega* **3**, 14902–14909 (2018).
88. Combs, G. F. *et al.* Bioavailability of selenium accumulated by selenite-reducing bacteria. *Biol. Trace Elem. Res.* **52**, 209–225 (1996).
89. Kramer, G. F. & Ames, B. N. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na₂SeO₃) in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **201**, 169–180 (1988).
90. Barman, T. E. *Enzyme Handbook*. **10**, (Springer Berlin Heidelberg, 1969).
91. Nuttall, K. L. & Allen, F. S. Kinetics of the reaction between hydrogen selenide ion and oxygen. *Inorganica Chim. Acta* **91**, 243–246 (1984).
92. Sudarsan, S., Dethlefsen, S., Blank, L. M., Siemann-Herzberg, M. & Schmid, A. The Functional Structure of Central Carbon Metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 5292–5303 (2014).
93. Moxley, M. A., Tanner, J. J. & Becker, D. F. Steady-state kinetic mechanism of the proline:ubiquinone oxidoreductase activity of proline utilization A (PutA) from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **516**, 113–20 (2011).
94. Zhou, Y. *et al.* Structural basis of the transcriptional regulation of the proline utilization regulon by multifunctional PutA. *J. Mol. Biol.* **381**, 174–88 (2008).

Apéndice y anexos.

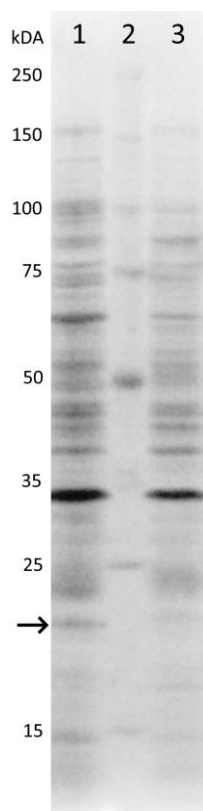


Figura 1. Patrones de bandas de *P. putida* KT2440 en cultivos con y sin selenito en LB en un gel SDS-PAGE de gradiente 20% a 4%. 1: *P. putida* KT2440 cultivada en LB con selenito 1 mM. 2: marcador de peso molecular. 3: *P. putida* KT2440 cultivada en LB. La banda indicada con flecha en el carril 1 fue recortada para identificación por espectrometría de masas.

La enzima PutA (PP4947) cataliza la oxidación irreversible de glutamato-gamma-semialdehído a L-glutamato como parte de la ruta de degradación de la prolina. (S)-1-pirrolina-5-carboxilato, el producto de la primera enzima de la vía (prolina deshidrogenasa) se encuentra en equilibrio espontáneo con su tautómero L-glutamato gamma-semialdehído⁹³. En muchas especies bacterianas (incluyendo *P. putida* KT2440), ambas actividades son llevadas a cabo por una sola enzima trifuncional⁸⁶. PutA actúa también como un factor represor transcripcional⁹⁴. Esta es su tercera función. Es un represor transcripcional de sí mismo y del gen *putP* (*pp4946*). Este gen en *P. putida* KT2440 tuvo un gran cambio de expresión cuando se cultivó en LB suplementado con selenito 1 mM (Cuadro 1).

Cuadro 1. Cambio en la expresión del gen *putA* (PP4947) de *P. putida* KT2440 en presencia y ausencia de selenito cuantifica por PCR tiempo real.

| Código | LB | LB + Selenito 1mM | Cambio en la expresion | Activacion o repression | Nombre |
|--------|------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-------------|
| PP4947 | 55.9684232 | 419.69145 | 2.90664407 | Activación | <i>putA</i> |
| PP0952 | 136.409564 | 168.904093 | 0.30825949 | Activación | <i>rpoN</i> |

