

Resumen

El metabolismo del fosfato (Pi) es crucial para todos los organismos vivos, tanto en términos energéticos como de biosíntesis. En bacterias lácticas (BAL), como *Lactocaseibacillus paracasei*, este proceso podría estar vinculado a algunas de sus funciones probióticas, como la retención de metales/metaloideos tóxicos, como el mercurio y el arsénico (As), y la síntesis de polifosfato (poli-P), una molécula de relevancia en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. En distintos lactobacilos se han identificado genes (*pstSCAB*) que codifican un transportador ABC específico de Pi que podría ser el responsable de la acumulación de arsenato [As(V)], un análogo estructural del Pi. Estos genes se encuentran habitualmente adyacentes a un sistema de dos componentes (TCS) *phoP-phoR*, el cual regula el metabolismo del Pi en otras bacterias. Por otro lado, se ha descrito que la enzima poli-P quinasa (Ppk) es la responsable de la síntesis de poli-P, mientras que su degradación es llevada a cabo por la enzima exopolifosfatasa (Ppx). En *Lc. paracasei* BL23, el gen que codifica Ppk está agrupado con dos genes que codifican exopolifosfatasa con diferente composición de dominios, con el orden génico *ppx1-ppk-ppx2*, pero la función de estos genes *ppx* aún no ha sido explorada. El objetivo principal de esta tesis fue estudiar cómo el metabolismo del Pi y su regulación en lactobacilos afectan a la captación del metaloide As(V) y la producción de poli-P.

Con este fin, se evaluó el papel del transportador PtsSCAB y el TCS PhoPR de lactobacilos en la incorporación de especies inorgánicas de As. Para evaluar la posible contribución de este sistema a la incorporación de As se utilizaron mutantes de los genes *pstC* del transportador PstSCAB, del gen regulador del transporte de Pi *phoU* y del gen *phoP* del TCS PhoPR en la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* Lpp+, y en la cepa *Lp. plantarum* WCFS1. Además, se construyeron mutantes en estos genes en nuestra bacteria modelo del laboratorio, *Lc. paracasei* BL23, incluyendo un mutante en el gen *phoR* del TCS PhoPR. Estas cepas mutantes fueron cultivadas en diferentes concentraciones de As(V) y arsenito [As(III)], y se estudió su capacidad de incorporación de As y de crecimiento. Nuestros resultados demostraron que es probable que el As(V) sea captado por el sistema de transporte PstSCAB en *Lp. plantarum*. También hemos demostrado que la cepa de *Lc. paracasei* que carece de *phoP* mostró una mayor resistencia a As(III) sin presentar una detoxificación (oxidación) aparente de As(III) a As(V).

La inesperada resistencia a As(III) en la cepa Δ *phoP* de *Lc. paracasei* BL23 nos llevó a caracterizar el regulador transcripcional PhoP, con el fin de intentar dar respuesta a este fenotipo. Para ello, realizamos un análisis transcriptómico comparativo entre la cepa *Lc. paracasei* BL23 y el mutante deficiente en *phoP*. Los resultados obtenidos mediante RNA-seq revelaron que la ausencia de PhoP en *Lc. paracasei* BL23 conduce a efectos pleiotrópicos significativos, evidenciados por los cambios sustanciales en el transcriptoma. La unión de PhoP a los promotores de los genes *pstS* y *phnD* (utilización de fosfonatos) pudo demostrarse mediante ensayos de retardo en gel. A su vez, uno de los hallazgos más destacados fue la disminución en la expresión del gen *ackA* (acetato quinasa), que no parecía debida a una interacción de PhoP con el promotor de *ackA*. Esta observación nos decidió a construir un mutante en este gen, el cual presentó el mismo fenotipo de resistencia a As(III) que la cepa Δ *phoP*. Esto evidenció que el déficit en la expresión de la acetato quinasa es el causante de la resistencia a As(III) en el mutante *phoP*.

Por otro lado, con el fin de explorar en detalle los mecanismos implicados en la síntesis y degradación de poli-P en lactobacilos, especialmente las funciones de los genes que codifican para las exopolifosfatasa Ppx1 y Ppx2 en *Lc. paracasei* BL23, se obtuvieron mutantes en sus respectivos genes y se estudió su impacto en la síntesis de poli-P. Los resultados obtenidos mostraron que, al igual que ocurre en otras bacterias, la síntesis de poli-P en los lactobacilos está estrechamente regulada. Observamos también un fenotipo inesperado para la falta de Ppx1 en *Lc. paracasei* BL23, que presentó una ausencia total de síntesis de poli-P. Así, Ppx1 es necesaria para la producción *in vivo* de poli-P, lo cual difiere de lo descrito para mutantes *ppx* de *E. coli* o mutantes de otras especies

bacterianas en las que se eliminó *ppx1* y/o *ppx2*. Los ensayos de las actividades catalíticas de Ppk, Ppx1 y Ppx2 y el análisis de las secuencias proteicas sugieren que Ppx1 podría no actuar como una exopolifosfatasa. Tras este resultado decidimos estudiar cómo una mutación en el residuo conservado Glu-112 en Ppx1 afectaba a la acumulación de poli-P en *Lc. paracasei* BL23. Esta mutación resultó en un incremento significativo en la síntesis de poli-P, indicando una función reguladora o catalítica para este residuo de la proteína.

Hemos demostrado también que la transición a la fase estacionaria y la posible limitación de nutrientes desencadenan la acumulación de poli-P. Analizamos cómo la variación de los niveles de poli-P influye en la supervivencia bacteriana durante la fase estacionaria. Demostramos que la supresión de un segundo gen (*ppk2*), que codifica una Ppk adicional identificada en el genoma de *Lc. paracasei* BL23, afecta negativamente a la supervivencia durante esta fase, lo que sugiere su papel en el metabolismo del poli-P en los lactobacilos.

En conjunto, estos hallazgos profundizan en la comprensión del metabolismo del Pi y del poli-P en *Lc. paracasei* BL23, lo que podría tener importantes implicaciones en el desarrollo de aplicaciones probióticas, especialmente en el contexto de la resistencia a metales tóxicos y la homeostasis intestinal.