



| UNR

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**“Homeostasis de cobre en *Salmonella enterica*.
Análisis transcripcional y funcional del
sistema Scs y otros sistemas involucrados”**

Lic. Ma. Carolina López

Director: Dr. Fernando C. Soncini

Rosario, Argentina

2017

“Homeostasis de cobre en *Salmonella enterica*. Análisis transcripcional y funcional del sistema Scs y otros sistemas involucrados”

Ma. Carolina López

Licenciada en Biotecnología

Universidad Nacional del Litoral

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Laboratorio de Patogénesis Bacteriana, Departamento de Microbiología, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 2012 y 2017 bajo la dirección del Dr. Fernando C. Soncini.

A Victorina, Delia, Estela y Julia

En primer lugar, quiero agradecer a Fernando por darme la oportunidad de tener una entrevista, de conocer el laboratorio y por darme la buena noticia, casi para Navidad del 2011, de que formaría parte de su grupo. Gracias Fernando por tu entusiasmo y dedicación, tan contagiosos, por la actividad científica. Por compartir siempre tus conocimientos y por ayudarme en esta última etapa de escritura, por hacer todo más sencillo.

A Susana y a Eleonora, gracias por estar siempre predispuestas para escuchar y solucionar dudas. Gracias Susan por lo primeros meses de adaptación, que estuviste al lado mío, enseñándome con mucha paciencia.

A todos mis compañeros de laboratorio, somos un grupo enorme y siempre fue excelente la convivencia con ustedes. Gracias Javi (maestro yoda), Yiya, Gabi, Tico, Martu, Aye, Nana, Cin, Uri, Flor, Vicky, Lau, Nina, Koki, Julián, Ro, Juliana, Germán, Aldi, Gasti, Seba, Ale, Niquito y Tati. También a los compañeros de piso, campito y cole. Gracias por tantas charlas, risas, discusiones de experimentos y trabajo en equipo.

A Tatita, Seba, Ale, Niquito y Gasti...gracias infinitas por su amistad. Los quiero mucho. Tatita a pesar de la distancia, estuviste muy presente, sobre todo este último tiempo, te agradezco toda la paz que me transmitiste. Seba y Gasti, brillantina para nosotros que logramos que a Tati y a Ale les guste Lisandro, quien me acompañó con sus creaciones musicales durante todo mi trabajo de Tesis. Niquito, gracias por tantas risas y por el idioma gatuno que inventamos.

A Brunito, gracias por tantos años de amistad, por la complicidad y ayuda constante.

A papá Ricardo, mamá Estela, hermanos, Edu y Gera, y sobris. Les agradezco su amor incondicional. Los amo con todo mi corazón. Papá y mamá, gracias por su contención y por las risas que nunca faltan, al igual que las anécdotas, por darme tanto cariño y amor. Gera, sos un grande, gracias por tu ayuda y paciencia, sobre todo durante la impresión. Edu, gracias por estar siempre para nosotros y por hacerme tía y madrina. Sobris, Julia, Feli y Tomi, las sonrisas más gigantes me las roban ustedes.

A Simonita y Kalisi, por los ronroneos desestresantes. Por la compañía diaria y por los regalos divertidos.

A mi compañero de vida, Ezequiel. Gracias por estar a mi lado desde el primer día, aquel primero de febrero del 2012. Por todo tu amor, por el cariño en cada comida casera, en cada vinito elegido, por la música que me saca sonrisas cuando estoy cansada. De nuevo, gracias. Te amo.

Parte de los resultados que aquí se describen han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas:

Trabajos publicados:

- Pezza A, Pontel LB, **López C**, Soncini FC. *Compartment and signal-specific codependence in the transcriptional control of Salmonella periplasmic copper homeostasis*. Proc Natl Acad Sci USA. 2016. Oct 11; 113(41):11573-11578.

Presentaciones a reuniones científicas:

- **C. Lopez**, G. F. Giri, A. Pezza, L. B. Pontel, F. C. Soncini. "Comparative analysis of CueP and *cus* for *Salmonella* periplasmic copper homeostasis and virulence". 5th ASM Conference on Salmonella. 2016. Potsdam, Alemania.

- **MC Lopez**, SK Checa, FC Soncini. "Análisis funcional y transcripcional del locus *scs* que codifica para proteínas "tipo" tiorredoxinas periplasmáticas de *Salmonella enterica*". XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-CAM. 2016. Rosario, Argentina.

- **López, MC**; Checa, SK; Soncini, FC. "Transcriptional control of a Salmonella copper-resistance locus coding for thioredoxin-like proteins". L Reunión anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 2014. Rosario, Argentina.

- **López, MC**; Checa, SK; Soncini, FC. "Transcriptional control of a Salmonella-specific copper-resistance locus". IX Congreso de Microbiología General SAMIGE. 2013. Rosario, Argentina.

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. El género <i>Salmonella</i>	2
I.2. Ciclo de vida de <i>Salmonella</i> y supervivencia en el medio ambiente	4
I.3. Invasión y sobrevida de <i>Salmonella</i> dentro de células eucarióticas	8
I.4. Los metales de transición y su rol en los sistemas biológicos	9
4.1. Generalidades de los metales de transición	9
I.5. Particularidades del Cu	11
5.1. Rol del Cu en los microorganismos	11
5.2. Toxicidad del Cu en los microorganismos	12
5.3. Homeostasis de cobre en las bacterias	13
5.3.1. Determinantes de la resistencia al cobre en <i>E. coli</i>	14
El regulón Cue	14
La oxidasa CueO	17
La bomba de eflujo CopA	17
El sistema Cus y su rol en monitorear el exceso de cobre en condiciones anaeróbicas	18
5.3.2. Determinantes de la resistencia al cobre en <i>Salmonella</i>	19
La cuproproteína CueP	22
I.6. Los metales de transición y su rol en la virulencia bacteriana	25
6.1. Adquisición de los metales por parte de las bacterias e inmunidad nutricional del hospedador	25
6.2. Dualidad del cobre: tóxico y micronutriente esencial	25
6.2.1. Iones de cobre como munición	26
Adquisición y tráfico de cobre desde el hospedador a las bacterias	26
Homeostasis de cobre en <i>Salmonella</i> durante la sobrevida intracelular	27
I.7. El estrés oxidativo	28
7.1. Las especies reactivas del oxígeno y su rol en la virulencia de <i>Salmonella</i>	30
I.8. El periplasma es un compartimento oxidante donde ocurre la formación de puentes disulfuro	32
8.1. Detoxificadores de EROs que actúan el periplasma bacteriano	35
8.2. Reparación de las proteínas de la envoltura dañadas por oxidación	36
8.3. Reparación de residuos de cisteínas oxidados	37
8.4. Reparación de los residuos de metionina oxidados	39
I.9. El sistema Scs	40
Rol de los genes <i>scsABCD</i> en la invasividad y virulencia de <i>Salmonella</i> Typhimurium	45

Rol de los genes *scs* en la replicación incrementada de *S. Typhimurium* en respuesta a estrés _ 46

I.10. Respuesta a estrés de envoltura. Monitoreo de la envoltura celular bacteriana	47
10.1. Sistemas regulatorios de dos componentes	47
10.2. El sistema de dos componentes de respuesta a estrés de envoltura Cpx	49
Caracterización de la región promotora de los genes del regulón Cpx	54
Cpx y su vínculo con los metales	55
Cpx y su vínculo con la virulencia	56
II. OBJETIVOS	58
II.1. Objetivos generales	59
II.2. Objetivos específicos	59
III. MATERIALES Y MÉTODOS	60
III.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	61
III.2. Medios de cultivo, antibióticos y condiciones de crecimiento	67
III.3. Extracción de ARN total	67
III.4. Extracción de ADN	68
4.1. Extracción de ADN genómico	68
4.2. Extracción de ADN plasmídico	69
III.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	70
5.1. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias	70
5.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR).	71
III.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	71
6.1. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	72
III.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción	72
III.8. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN	72
III.9. Construcción de plásmidos reporteros	73
III.10. Preparación de células competentes	73
III.11. Transformación y selección	74
III.12. Manipulación genética	74
12.1. Construcción de mutantes polares y no polares en <i>Salmonella</i>	74
12.2. Construcción de fusiones transcripcionales a <i>lacZY</i>	75

12.3. Construcción de fusiones FLAG _____	76
III.13. Mutagénesis dirigida mediante la técnica de <i>megaprimer</i> -PCR _____	77
III.14. Transducción generalizada con el bacteriófago P22 _____	78
14.1. Obtención de lisado en medio semisólido _____	78
14.2. Obtención de lisado en medio líquido _____	79
14.3. Transducción generalizada _____	79
III.15. Ensayos de actividad β -galactosidasa _____	79
III.16. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) _____	80
III.17. Halos de inhibición _____	81
17.1. Técnica con espátula de Drigalsky _____	81
17.2 Técnica con LB-agar _____	81
III.18. Curvas de crecimiento _____	81
III. 19. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína _____	81
19.1. Fosforilación de oligonucleótidos _____	82
19.2. Cuantificación de ADN marcado radiactivamente _____	82
19.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida _____	82
19.4. Ensayos de protección a la digestión por ADNasa I o ADN " <i>footprinting</i> " _____	84
19.5 Secuenciación del ADN _____	85
III.20. Expresión y purificación de CpxR, de CueR nativa y de CueR mutante (CueR _{C120S}) _____	86
20.1. Purificación de CueR y de CueRC120S _____	86
20.2. Purificación de CpxR _____	87
III.21. Determinación de la concentración de proteínas _____	87
III.22. Electroforesis de proteínas _____	88
III.23. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (Western blot) _____	89
RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	90
IV. CAPÍTULO I _____	91
IV.1. La expresión de <i>cueP</i> depende tanto del regulador de respuesta CpxR como de la quinasa sensora CpxA _____	93
IV.2. Rol fisiológico de la regulación coordinada de <i>cueP</i> _____	96
2.1. La regulación coordinada de <i>cueP</i> es requerida para su rol en la resistencia a cobre _____	96
2.2. La co-regulación de la expresión de CueP garantiza el crecimiento óptimo de <i>Salmonella Typhimurim</i> en aerobiosis y en condiciones de estrés oxidativo _____	97

IV.3. Regulación del inicio de la transcripción de <i>cueP</i> _____	105
3.1. La interacción productiva de la ARN Polimerasa con el promotor de <i>cueP</i> requiere tanto de CpxR fosforilado como de CueR activado por cobre _____	105
3.2. La formación de complejos estables y productivos requiere de la interacción ARNP/CueR-Cu/CpxR-P con el promotor de <i>cueP</i> _____	107
3.3. Las interacciones activas y productivas de la ARNP con el promotor óptimo de <i>cueP</i> requieren únicamente de CpxR-P _____	111
3.4. El complejo de iniciación es estable al tratamiento con heparina _____	113
3.5. La fosforilación de CpxR controla la formación de complejos abiertos activos transcripcionalmente _____	115
IV.4. Conclusiones Capítulo I _____	118
V. CAPÍTULO II _____	120
V.1. Los genes <i>scsABCD</i> se inducen por cobre _____	121
V.2. Los genes <i>scsA</i> , <i>scsB</i> , <i>scsC</i> y <i>scsD</i> se transcriben principalmente a partir de la región promotora de <i>scsA</i> . _____	125
V.3. Rol de los componentes codificados en el locus <i>scs</i> frente al agregado de cobre exógeno _____	127
V.4. <i>ScsABCD</i> es requerido para el crecimiento óptimo de <i>S. Typhimurium</i> frente a un exceso de cobre, pero no de otros metales _____	129
V.5. El par <i>ScsB/ScsC</i> tiene un rol más relevante que el sistema <i>DsbD/DsbC-DsbG</i> en la protección de la envoltura de <i>S. Typhimurium</i> frente al estrés por cobre _____	132
V.6. El operón <i>scsABCD</i> forma parte del regulón Cpx _____	137
6.1. CpxR activa la transcripción de <i>scsABCD</i> en respuesta al estrés mediado por Cu _____	137
6.2. CpxR regula la expresión de <i>scsABCD</i> actuando en forma directa sobre su promotor _____	140
V.7. Rol de <i>ScsABCD</i> en la respuesta a estrés oxidativo _____	144
V.8. <i>DsbC</i> cumple un rol en la protección contra el estrés oxidativo en <i>Salmonella Typhimurium</i> _____	152
8.1. <i>DsbC</i> es requerida para el crecimiento óptimo en aerobiosis _____	153
V.9. Conclusiones Capítulo II _____	156
VI. CONCLUSIONES GENERALES _____	159
RESUMEN _____	164
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	167

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ACP	Acetil fosfato de litio y potasio
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina 5' difosfato
ATP	Adenosina 5' trifosfato
ATPasa	Adenosina 5' trifosfato hidrolasa
BSA	Albúmina sérica bovina
Ci	Curie
Cm	Cloranfenicol
Csp	Cantidad suficiente para
C-terminal	Carboxilo terminal
Cys	Cisteína
CXXC	Cisteína, cualquier aminoácido, cisteína, cualquier aminoácido
DNasal	Desoxirribonucleasa I
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
ϵ	Coeficiente de extinción molar
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético
EROs	Especies reactivas del oxígeno
ERNs	Especies reactivas del nitrógeno
ERCs	Especies reactivas del cloro
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
g	Gramo
h	Horas
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HQ	Histidina quinasa
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido

kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
Kpb	Kilopares de bases
l	Litro
LB	Luria Bertani
LPS	lipopolisacárido
mA	Miliamperios
ME	Membrana externa
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MI	Membrana interna
min	Minutos
MS	Espectrometría de masa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
nm	Nanometro
N-terminal	Amino terminal
ONPG	o-nitrofenil-galactopiranosido
P	Promotor
p/v	Peso en volumen
pb	Pares de bases
ppb	Partes por billón
PPi	Pirofosfato
ppm	Partes por millón
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Regulador de respuesta
s	Segundos
SCV	Vacuola conteniendo a <i>Salmonella</i>
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T3SS	Sistema de secreción tipo 3
Tc	Tetraciclina
TCS	Sistema de dos componentes

Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad
Ufp	Unidades formadoras de placas
UV	Ultravioleta
V	Voltio
v/v	Volumen en volumen



INTRODUCCIÓN

I.1. El género *Salmonella*

La primera descripción de bacterias del género *Salmonella* se remonta a finales del siglo XIX, cuando el médico veterinario Daniel Elmer Salmon y su estudiante Theobald Smith obtuvieron el primer aislamiento de *Salmonella Choleraesuis* en muestras tomadas en un cerdo con peste porcina clásica y en 1900 el bacteriólogo francés Joseph Lignières propuso que estas bacterias se denominaran *Salmonella*, en honor a Salmon.

Salmonella es un género de bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, móviles, pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. Son causantes de una amplia variedad de enfermedades en animales, incluido el hombre; que abarcan desde gastroenteritis, fiebre entérica, bacteriemia e infecciones localizadas, hasta un estado de portador asintomático. El tipo de infección depende del serotipo de *Salmonella* y de diversos factores del hospedador (Finiay y Falkow 1989).

El género *Salmonellae* es actualmente clasificado en sólo dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, basado en la alta similitud de secuencia del genoma (96-99%). Existe sólo una subespecie dentro de *S. bongori*, nombrada subespecie V, mientras que *S. enterica* comprende las restantes 7 subespecies, diferenciadas bioquímicamente y por relaciones genómicas: I, *S. enterica* subespecie *enterica*; II, subespecie *salamae*; IIIa, subespecie *arizonae*; IIIb, subespecie *diarizonae*; IV, subespecie *houtenae*; VI, subespecie *indica*; y VII, sin nombre (Boyd y Hartl 1998; Brenner y col. 2000). En general, los serotipos de la subespecie I se aíslan de animales de sangre caliente, como los mamíferos, aunque también se han reportado aislamientos de reptiles y otros animales de sangre fría (Pasmans y col. 2005). Las restantes subespecies infectan animales de sangre fría y comúnmente se aíslan de estos reservorios y del ambiente (Lee y col. 2009). El CDC (siglas en inglés correspondientes a *Center for Disease Control and Prevention* de los Estados Unidos) utiliza nombres para los distintos serotipos de la subespecie I (por ejemplo, serotipos Enteritidis, Typhimurium, Typhi y Choleraesuis) y utiliza fórmulas antigénicas para los serotipos no nombrados en las subespecies II, IV, VI y en *S.*

bongori. Dentro de estas 7 subespecies, existen actualmente más de 2500 serotipos de *Salmonella* (Boyd y col. 1996; Brenner y col. 2000; Garai y col. 2012).

Existe una enorme variación en la virulencia y en la epidemiología de los diferentes serotipos de *S. enterica* subesp. *enterica*. Por ejemplo, mientras el serovar Typhi (*S. Typhi*) es un patógeno exclusivo de humanos, agente causal de la enfermedad sistémica conocida como fiebre tifoidea, con más de 27 millones de casos a nivel mundial cada año, resultando en una estimación de 217.000 muertes (de Jong y col. 2012), otros serotipos de la misma subespecie *enterica* están adaptados a una variedad de hospedadores, como es el caso de los serovares Dublin, Typhimurium y Choleraesuis, que causan enfermedad tanto en humanos como en animales (Coburn y col. 2007).

Los serotipos no tifoideos de *Salmonella* (NTS) causan gastroenteritis o enterocolitis en humanos, caracterizadas por inflamación intestinal y diarrea. En general estos serotipos también causan infecciones en múltiples hospedadores tales como ganado vacuno, equino, porcino, aves de corral, etc. *S. enterica* subespecie *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) es uno de los serovares no tifoideos más comúnmente aislados en el mundo (El-Aziz 2013). La gastroenteritis causada por los serotipos NTS generalmente es autolimitada y suele cursar sin complicaciones, aunque en algunas ocasiones pueden aparecer manifestaciones extra-intestinales más graves, como bacteriemias e infecciones focales localizadas en cualquier órgano (Lee y col. 2000). Por su parte, las bacteriemias transitorias en el seno de una gastroenteritis aguda se producen principalmente en niños y el mayor riesgo de adquisición de infecciones focales se asocia con la existencia de una enfermedad de base o inmunodepresión. Algunas de las infecciones causadas por serovares NTS pueden requerir terapia antimicrobiana y en el hombre estas infecciones causadas por cepas de *Salmonella* resistentes a los antimicrobianos se han asociado con un mayor riesgo de infecciones extra-intestinales, hospitalización, mayor duración de la enfermedad y un mayor número de casos, en comparación con los aislamientos susceptibles a los antibióticos (Chen y col. 2007). Se calcula que las infecciones por serovares NTS causan 93,8 millones de casos de gastroenteritis y 3,4 millones de casos de enfermedad invasiva en los seres humanos cada año, con un

estimativo de 155.000 muertes, lo que ejerce un enorme peso sobre la salud pública mundial (Afema y col. 2016).

S. Typhimurium es capaz de provocar una infección sistémica en ratones susceptibles, que se asemeja a la fiebre tifoidea y del estudio de la infección de ratones con el serotipo *Typhimurium* surgió la mayor parte del entendimiento de la patogénesis de la fiebre entérica (Broz y col. 2012). En este trabajo de Tesis, se utilizó como organismo silvestre la cepa *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo *Typhimurium* (ATCC® 14028™) y que a partir de ahora se nombrará como *Salmonella Typhimurium* o *S. Typhimurium*.

I.2. Ciclo de vida de *Salmonella* y supervivencia en el medio ambiente

El éxito evolutivo de los patógenos bacterianos depende de su capacidad para colonizar y causar enfermedad en los hospedadores susceptibles. Igualmente importante es la efectividad con que estos patógenos se transmiten. La persistencia de *Salmonella*, o su capacidad para sobrevivir bajo condiciones de estrés, ha sido tradicionalmente estudiada por separado de la virulencia. Sin embargo, el éxito continuo de estos patógenos indica que ambos rasgos deben estar conectados de manera inherente (MacKenzie y col. 2015).

Los serotipos de *S. enterica* subespecie *enterica* se pueden describir como restringidos o adaptados al hospedador, o bien como serotipos "generalistas" o adaptados a una amplia variedad de hospedadores (Waldner y col. 2012). Esta categoría tiene implicancias importantes en las características de transmisión de cada aislamiento. Por su parte, los serovares restringidos a un dado hospedador han desarrollado estrategias para persistir y eludir las defensas inmunitarias del hospedador. *Salmonella Typhi*, por ejemplo, se disemina desde el tracto gastrointestinal hacia el sistema retículo-endotelial, una vez que alcanza los órganos de este sistema (médula, bazo, ganglios linfáticos, hígado) puede infectar macrófagos y pasar de nuevo a la circulación para luego ingresar a distintos órganos como la vesícula biliar, donde puede establecerse de manera crónica formando biopelículas tanto en el epitelio de la vesícula como así también en cálculos biliares (Gonzalez-Escobedo y Gunn 2013). Aproximadamente un porcentaje del 1 al 6% de

los pacientes que han sido infectados con *Salmonella* Typhi se convierten en portadores asintomáticos crónicos. Por el contrario, la patogénesis de los serotipos generalistas por lo general conduce a gastroenteritis, y los pacientes infectados excretan *Salmonella* durante un período de tiempo relativamente corto. Ha habido casos en los que la excreción ocurre después de la recuperación, pero sólo a niveles bajos (Waldner y col. 2012). Por esto, el ciclo de vida de las cepas NTS generalistas tiene una mayor dependencia de la sobrevivencia en el medio ambiente.

Una estrategia para la supervivencia bacteriana es a través de la formación de biopelículas, también llamadas *biofilms*, donde las células se agregan y se incrustan en una matriz extracelular autoproducida, generalmente en contacto con una superficie. Esto se ha descrito en *Salmonella* como el morfotipo *rdar*, que significa rojo, seco y rugoso (Römling 2005; Jain y Chen 2007). La matriz extracelular que rodea a las células *rdar*-positivas está compuesta de polímeros de proteína (fimbrias tipo curli) y polisacáridos extracelulares (celulosa y antígeno-O capsular) que unen físicamente a las células. Las células embebidas en la matriz extracelular tienen mayor persistencia tras la exposición a condiciones de inanición, desecación y tratamiento con desinfectantes, así como una mayor capacidad para adherirse tanto a las superficies bióticas como abióticas. Las células *rdar*-positivas también pueden causar infecciones después de largos períodos, pero no parecen estar específicamente adaptadas para la virulencia (Waldner y col. 2012; MacKenzie y col. 2015). En contraste, los aislados de *Salmonella* *rdar*-negativos tienden a causar formas más invasivas de la enfermedad (MacKenzie y col. 2015). La mayoría de los aislamientos de serotipos NTS son *rdar*-positivos, y la mayoría de los aislados tifoideos de *Salmonella* son *rdar*-negativos. Una posible explicación de esta correlación es que el morfotipo *rdar* es una adaptación necesaria para la vida fuera del hospedador (MacKenzie y col. 2015). La transmisión de los serotipos NTS desde los animales a los seres humanos normalmente se produce a través de la vía fecal-oral mediante el consumo de productos alimenticios contaminados, agua contaminada, o por el contacto directo con los animales portadores. Aunque el tracto intestinal de los animales de producción se considera el principal reservorio de los serotipos no tifoideos de *Salmonella*, estas bacterias también se encuentran en muchas especies de vida silvestre (Bondo y col. 2016).

Los brotes de *Salmonella* se han relacionado con la carne contaminada, las aves de corral, los huevos, los productos lácteos no pasteurizados, los tomates, las semillas de alfalfa, los melones, la lechuga, mangos, chocolate, fórmula infantil en polvo, almendras crudas, condimentos secos y cereales, entre otros. Estos brotes de *S. enterica* asociados con estos vehículos alimentarios involucran a los serovares generalistas de hospedador, NTS. El agua de riego y los suelos conducen a la contaminación previa de los reservorios recién mencionados (Waldner y col. 2012).

A diferencia de otras bacterias patógenas, los serotipos NTS son capaces de persistir y proliferar en el medio ambiente desarrollando un estilo de vida cíclico hospedador-ambiente externo-hospedador (Figura 1). *Salmonella* no tifoidea puede sobrevivir y en algunos casos, es capaz de replicarse, al menos durante un año en el suelo, de semanas a meses en el agua y en las plantas, y hasta un mes en las excreciones de cerdos infectados, que frecuentemente se utilizan como abono (Winfield y Groisman 2003; Afema y col. 2016). La diversidad y la abundancia de *Salmonella* en las muestras de agua están fuertemente influenciadas por las precipitaciones estacionales y la temperatura del agua, y la detección en muestras de suelo está asociada con la humedad y con la actividad humana y animal (Bondo y col. 2016). Así, la mayoría de los ambientes no hospedadores se caracterizan por una elevada variabilidad térmica, alta osmolaridad, fluctuaciones de pH y baja disponibilidad de nutrientes.

Se postula que la capacidad adaptativa de *Salmonella* se debe a que posee un repertorio de genes no requeridos para la virulencia, pero ausentes en especies entéricas relacionadas, que le permiten la adaptación a su ciclo de vida, que incluye la supervivencia en ambientes hospedadores y no hospedadores (Winfield y Groisman 2003).

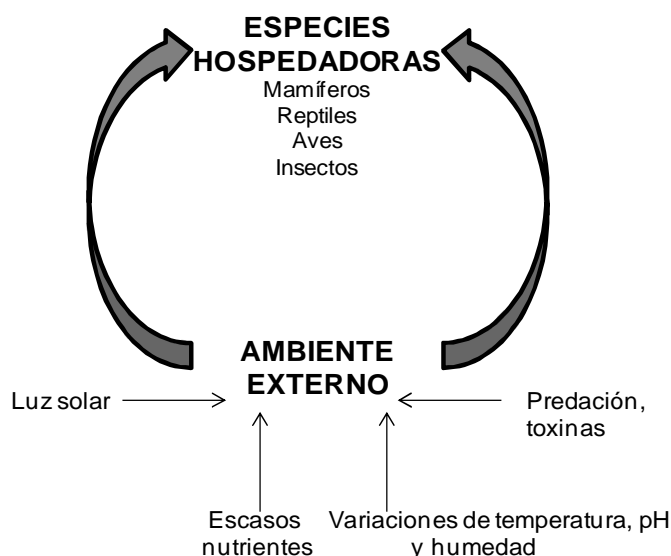


Figura 1. El ciclo de vida de *Salmonella alterna* entre las especies hospedadoras y el ambiente externo. Figura adaptada de Winfield y Groisman, 2003.

Serotipos de NTS se han aislado de suelos ricos en metales pesados y en piensos, dedicados a la alimentación porcina, suplementados con micronutrientes como cobre y zinc (Winfield y Groisman 2003; Yang y col. 2011; Thacker 2013; Medardus y col. 2014). Cuando estos micronutrientes se utilizan a elevadas concentraciones en la alimentación de cerdos jóvenes pueden promover su crecimiento (Yang y col. 2011; Medardus y col. 2014). Recientemente, se ha demostrado que serovares como Typhimurium presentan resistencia a múltiples fármacos y justamente se ha observado la aparición de *Salmonella* multiresistentes (MDR) en los sistemas de producción porcina, aún cuando no existían antecedentes de uso de antimicrobianos, ya sea como terapéuticos o como promotores del crecimiento (Gebreyes y col. 2006; Medardus y col. 2014). Además de la presión selectiva directa de la resistencia antibiótica, existe una co-selección debida a otros agentes químicos estructuralmente relacionados o no, incluyendo el uso de micronutrientes de metales pesados que se utilizan en la alimentación porcina a niveles mayores a los requerimientos diarios recomendados (Medardus y col. 2014), lo que podría potencialmente aumentar la presión selectiva y su asociación con la resistencia antimicrobiana, aunque para confirmarlo se requiere de más investigación.

I.3. Invasión y supervivencia de *Salmonella* dentro de células eucarióticas

Gracias a muchos de los factores de virulencia codificados en su genoma, *Salmonella* puede invadir y sobrevivir intracelularmente replicándose tanto en células fagocíticas como no fagocíticas (Garai y col. 2012). *Salmonella enterica* posee dos sistemas de secreción de tipo III (T3SS) codificados en islas de patogenicidad (SPIs) que inyectan proteínas efectoras a las células hospedadoras para manipular su fisiología (Manon y col. 2008). La SPI1 contiene 39 genes que codifican para proteínas estructurales del T3SS-1 (operones *inv/spa* y *prg*), proteínas del traslocón (SipB, SipC, SipD), algunos efectores (SipA, SptP, AvrA), algunas chaperonas (SicA, InvB, SicP) y cuatro reguladores transcripcionales (HilA, HilC, HilD e InvF) (Gong y col. 2010). Dichos factores en conjunto producen una serie de modificaciones dentro del hospedador, cruciales para la invasión de las células no fagocíticas como las células M, y para la activación de respuestas pro-inflamatorias (de Jong y col. 2012).

Siguiendo el curso de la internalización, *Salmonella* permanece dentro de un fagosoma modificado conocido como la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV, del inglés *Salmonella containing vacuole*). La formación y mantenimiento de la SCV involucra eventos que son controlados por la SPI2 (Ochman y col. 1996; Hensel y col. 1998; Brumell y col. 2002). Su principal función es la de remodelar la vacuola, formando un nicho de replicación intracelular mediante la alteración del tráfico endocítico (Brumell y col. 2002). Las actividades realizadas por los diversos efectores incluyen la alteración de la fusión entre lisosomas y la SCV (Uchiya y col. 1999), la evasión de la muerte de macrófagos dependiente de la NADPH oxidasa (Volkman y col. 2001), el retraso de la muerte celular programada (van der Velden y col. 2000), la alteración de la membrana vacuolar y la manipulación del citoesqueleto asociado a la SCV (Ruiz-Albert y col. 2002; Poh y col. 2008).

I.4. Los metales de transición y su rol en los sistemas biológicos

4.1. Generalidades de los metales de transición

Los metales están involucrados en todas las fases de la existencia microbiana y juegan roles primordiales en el crecimiento celular y el funcionamiento metabólico (D. Nies 2007). Además de los principales elementos químicos, carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S), utilizados como componentes de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y azúcares, las células requieren de metales para su desarrollo normal. Algunos, como sodio (Na), magnesio (Mg), potasio (K) y calcio (Ca), son requeridos en grandes cantidades por lo que se los denomina macronutrientes, mientras que otros, entre los que se incluye metales de transición o “metales pesados” como manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), vanadio (V), molibdeno (Mo), zinc (Zn), cobre (Cu) y tungsteno (W), son requeridos en cantidades mucho menores (Hobman y col. 2007).

Debido al potencial redox único de algunos de estos metales de transición, también denominados micronutrientes, muchos tienen importantes roles como cofactores en enzimas y se requieren para la transferencia de electrones (Wackett y col. 2004). Se estima que entre el 30-45% de las enzimas son metaloproteínas cuyas funciones requieren de un cofactor metálico (Porcheron y col. 2013).

Se han definido cinco grupos que contienen a los metales de transición según su contenido en la corteza terrestre frente a su movilidad, lo que nos indica la disponibilidad de los mismos (Figura 2). La movilidad se calcula como el contenido de ese metal en agua de mar dividido por el contenido en la corteza terrestre. Los metales con alta movilidad a pesar de su bajo contenido en la corteza terrestre están en el grupo I), en el II) los que tienen elevada biodisponibilidad, en el III) aquellos con biodisponibilidad extremadamente limitada, en el IV) los que presentan elevado contenido en la corteza terrestre pero con baja movilidad y en el grupo V) el hierro. En general, las bacterias utilizan los metales de transición de los grupos I y II (Figura 2) ya que son los que presentan mayor movilidad. Aunque existen tres excepciones: cromo (Cr) del grupo IV, ya que es capaz de formar el oxianión de cromato altamente soluble, el itrio (Y), del grupo II, porque precipita como un hidróxido similar a otros cationes metálicos trivalentes, y el hierro (Fe) que tiene

una posición en el grupo V. Bajo condiciones óxicas, existe como Fe(III), precipitando como hidróxido insoluble. Al pertenecer al grupo V es el elemento con menor biodisponibilidad, pero a pesar de ello es ampliamente utilizado como elemento biológico. Antes que el oxígeno esté disponible en la tierra, hace 2400 millones de años, el hierro existía como Fe(II) y era en gran medida biodisponible y utilizado por las primeras formas de vida. Después de este evento, las células se enfrentaron a una limitación de Fe(II) debido a la precipitación de hidróxido de Fe(III), lo que fue resuelto gracias a la evolución de vías de importación de hierro dependientes de los sideróforos. En los ambientes anóxicos, el Fe(II) es la forma predominante y disponible del hierro. Es por esto que a pesar de su baja biodisponibilidad, el hierro es un importante bioelemento (D. H. Nies 2016).

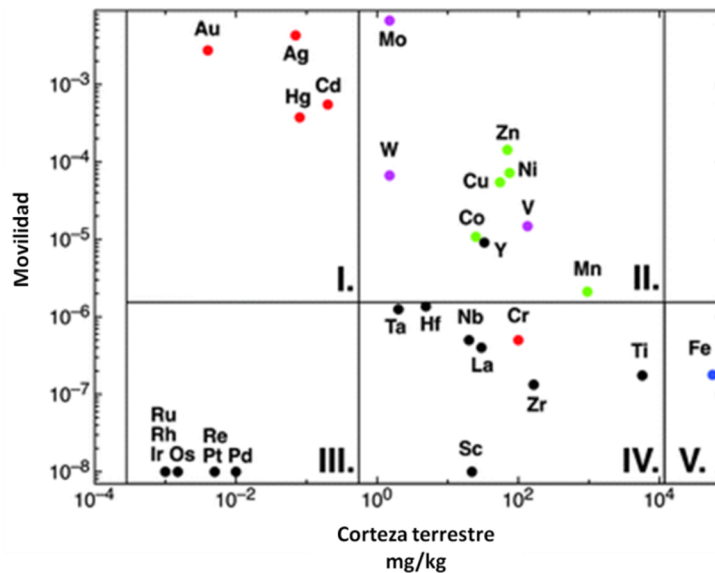


Figura 2. Disponibilidad de los metales de transición. Representación del contenido de un metal de transición frente a la movilidad, calculada como el contenido de ese metal en agua de mar dividido por el contenido en la corteza terrestre. Esto define cinco grupos: I) aquellos con alta movilidad a pesar de su bajo contenido en la corteza terrestre, II) con elevada disponibilidad, III) con disponibilidad extremadamente limitada, IV) con elevado contenido en la corteza terrestre pero con baja disponibilidad y V) hierro. El grupo II contiene todos los oxianiones esenciales (violeta), cationes esenciales-pero tóxicos (verde), además del hierro que no es tóxico (azul) y pertenece al grupo V y en rojo los metales de transición tóxicos del grupo I y IV. Adaptado de (D. H. Nies 2016).

I.5. Particularidades del Cu

5.1. Rol del Cu en los microorganismos

El cobre (Cu), es un elemento común en el planeta y se distribuye en el ambiente a través de procesos naturales. Su concentración media en la corteza terrestre es de 60 ppm (Kiaune y Singhasemanon 2011), donde se encuentra formando compuestos como pirita (CuFeS_2), calcocita (Cu_2S), cuprita (Cu_2O) y malaquita ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$) (Magnani y Solioz 2007).

El Cu se ha utilizado durante gran parte de la civilización como agente antimicrobiano. El uso medicinal más antiguo registrado del cobre se remonta a las antiguas civilizaciones de egipcios, romanos y aztecas para el tratamiento de heridas y la esterilización del agua. Debido a sus propiedades antimicrobianas, actualmente el cobre se utiliza en muchos materiales diferentes. Es empleado en dispositivos médicos para reducir infecciones nosocomiales, y por sus propiedades biocidas también se lo utiliza en productos textiles y en agricultura (Borkow y Gabbay 2006). Su uso a nivel mundial se incrementa día a día, lo que conlleva a su acumulación en la corteza terrestre (Kiaune y Singhasemanon 2011).

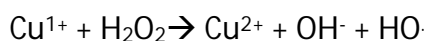
En los sistemas biológicos el cobre puede existir tanto en el estado reducido Cu(I) ($3d^{10}$) como en el estado oxidado Cu(II) ($3d^9$). Es un bioelemento joven ya que en las condiciones reductoras prevalentes previas al advenimiento del oxígeno atmosférico, el Cu se encontraba en el estado Cu(I), insoluble en agua en forma de sulfuros y por lo tanto no biodisponible. Con el advenimiento de los microorganismos fotosintéticos como las cianobacterias y la concomitante acumulación de oxígeno molecular, ocurrieron cambios irreversibles en la vida sobre la Tierra (Rensing y Grass 2003). Mientras las enzimas involucradas en el metabolismo anaeróbico funcionan en la porción baja del espectro redox, la presencia de oxígeno molecular creó la necesidad de utilizar un metal activo con potenciales $E_0 \text{M}^{n+1} / E_0 \text{M}^n$ de 0 a 0,8 V. El potencial redox Cu(II)/Cu(I) es usualmente mayor que el del Fe(III)/Fe(II) y la mayoría de las cupro-enzimas trabajan entre 0,25 y 0,75V. Este alto potencial, puede ser utilizado para la oxidación directa de compuestos fácilmente oxidables como superóxido, ascorbato, catecol o fenolato. Es

por esta razón, que las cuproproteínas están ampliamente distribuidas entre los organismos aeróbicos y principalmente llevan a cabo dos funciones: la transferencia de electrones y el transporte y activación de O₂, estando presentes en procesos vitales tales como la respiración, el transporte de hierro, la protección al estrés oxidativo, la coagulación sanguínea y pigmentación (Rensing y Grass 2003).

En el genoma de *E. coli* K12 hay codificadas sólo unas pocas proteínas que unen Cu y se considera que todas ellas son de localización extracitoplásmica (Keseler y col. 2013). Ejemplos de ello son la citocromo *bo* oxidasa que facilita el flujo de electrones en la respiración aeróbica, amino-oxidasas como TynA que permite a la célula usar feniletilamina como única fuente de carbono y energía, las Cu-Zn superóxido dismutasas que protegen a las células de las especies reactivas del oxígeno (EROs), generadas por ejemplo dentro de los fagocitos profesionales, y la multicobre oxidasa CueO que oxida el Cu(I) a Cu(II) menos tóxico para las células (Wayne Outten y Munson 2013).

5.2. Toxicidad del Cu en los microorganismos

Si bien el Cu es un metal esencial, su alta reactividad hace que sea tóxico a concentraciones relativamente bajas. La causa principal de la toxicidad celular del Cu continúa siendo una incógnita. La hipótesis más apoyada (Dupont y col. 2011) sostenía que, tal como ocurre *in vitro*, el Cu reacciona con moléculas de H₂O₂ endógenas para generar radicales hidroxilos en un proceso análogo a la reacción de Fenton:



Cuando la reacción análoga es generada *in vivo* por Fe(II) en el citoplasma, los radicales hidroxilos son potentes oxidantes del ADN causando mutagénesis y letalidad (Imlay y col. 1988). Sin embargo, el crecimiento de cepas de *E. coli* sensibles al Cu que acumulan mayor cantidad del catión intracelularmente, se ve favorecido frente a la exposición a H₂O₂ cuando se agrega Cu al medio (Macomber y col. 2007). El Cu no generaría cantidades significativas de EROs que dañen al ADN, sino que reduciría la generación de radicales tóxicos generados a causa del Fe(II),

conduciendo a una menor cantidad de lesiones en el genoma (Macomber y col. 2007). Este efecto se debe en parte a que la mayor proporción del Cu con actividad redox estaría presente en el periplasma sin acceso directo al ADN (Macomber y col. 2007). Estos estudios, sumado al hecho de que el Cu ejerce su efecto tóxico aún en condiciones anaeróbicas motivaron a investigar sobre el origen del mecanismo primario de toxicidad del metal. Recientemente, se observó en cepas de *E. coli* que niveles micromolares de Cu inhiben el crecimiento de las células y que el agregado de aminoácidos de cadena ramificada es suficiente para restablecerlo, indicando que el Cu bloquea la biosíntesis de dichos aminoácidos (Macomber y Imlay 2009). Efectivamente, el tratamiento con el metal rápidamente inactiva enzimas de la familia de las deshidratasas que contienen centros Fe-S entre las cuales se encuentra la isopropilmalato deshidratasa implicada en la biosíntesis de aminoácidos ramificados (Jang y Imlay 2007). Dicha inactivación ocurre tanto *in vivo* como *in vitro* y el daño sucede concomitantemente con el desplazamiento de átomos de Fe desde los centros Fe-S expuestos al solvente, sugiriendo que Cu(I) inactiva a estas proteínas actuando como ligando de coordinación con los átomos de azufre (Macomber y Imlay 2009; Chillappagari y col. 2010). Tanto el eflujo del cobre mediante las bombas específicas, el quelado del mismo con glutatión, como los sistemas de ensamblado que reparan los centros Fe-S aumentan la resistencia de las células a este metal (Pontel y col. 2015).

Otra causa de la toxicidad del Cu está asociada a la tendencia tanto de la forma cúprica (Cu^{+2}) como la cuprosa (Cu^{+1}) de formar complejos con bases de Lewis débiles como tioles, hidruros, cianuros y fosfinas, interfiriendo con la actividad de moléculas importantes para la célula (Magnani y Solioz 2007). Los enlaces estables Cu(II)-N usualmente son inertes mientras que los enlaces con ligandos dadores de oxígeno son más lábiles; por su parte, el Cu(I) se une preferencialmente a ligandos como grupos sulfhidrilos (Rensing y Grass 2003).

5.3. Homeostasis de cobre en las bacterias

Los microorganismos han desarrollado estrategias para prevenir la acumulación de Cu(I) en los compartimentos celulares de manera tal de evitar la

toxicidad del metal libre. Esto se logra gracias a una maquinaria conformada por reguladores transcripcionales, transportadores de membrana y moléculas pequeñas de unión a Cu(I) que en conjunto controlan estrictamente los niveles de cobre.

Los mecanismos de adquisición del cobresólo se han identificado en muy pocas especies y no han sido dilucidados por completo. En las bacterias patógenas, aún no se han identificado importadores específicos de cobre lo que sugiere que la demanda intracelular de Cu es baja o que el metal está fácilmente disponible en los hospedadores infectados (Pontel y col. 2015). Hasta el momento, sólo se ha reportado que *E. coli* uropatogénica, sintetiza un sideróforo llamado yersiniabactina que une Cu(II) y que puede ser esencial para la adquisición del metal en condiciones limitantes del mismo y en algunos casos para secuestrarlo y evitar su toxicidad (Fu y col. 2014; Palmer y Skaar 2016). Por el contrario, los patógenos dedican la mayor parte de sus esfuerzos a restringir la disponibilidad de Cu, utilizando mecanismos de eflujo, conversión redox o secuestro del metal, así como dirigiendo el tráfico intracelular del cobre sólo a las proteínas diana.

A continuación, se explicarán los mecanismos de homeostasis de cobre en enterobacterias.

5.3.1. Determinantes de la resistencia al cobre en *E. coli*

En *E. coli* se han identificado dos sistemas cromosomales involucrados en la tolerancia al Cu que catalizan el eflujo del exceso del catión desde la célula hacia el espacio extracelular. Uno de ellos es el sistema Cue, del inglés *Cu-efflux*, y el otro, es el sistema de eflujo de cobre Cus, del inglés *Cu-sensing* (Outten y col. 2001).

El regulón Cue

Uno de los principales sistemas de resistencia a Cu es el regulón Cue, esquematizado en la Figura 3. En presencia de Cu en el citoplasma, el regulador transcripcional CueR activa la expresión de los genes de resistencia al Cu *copA* y *cueO* (Outten y col. 2001; Stoyanov y col. 2001). Este regulador pertenece a la familia

MerR; por lo tanto para entender su funcionamiento se describirá brevemente el mecanismo con el cual el regulador MerR, el primero caracterizado en esta familia de factores transcripcionales, actúa sobre los promotores de sus genes blanco.

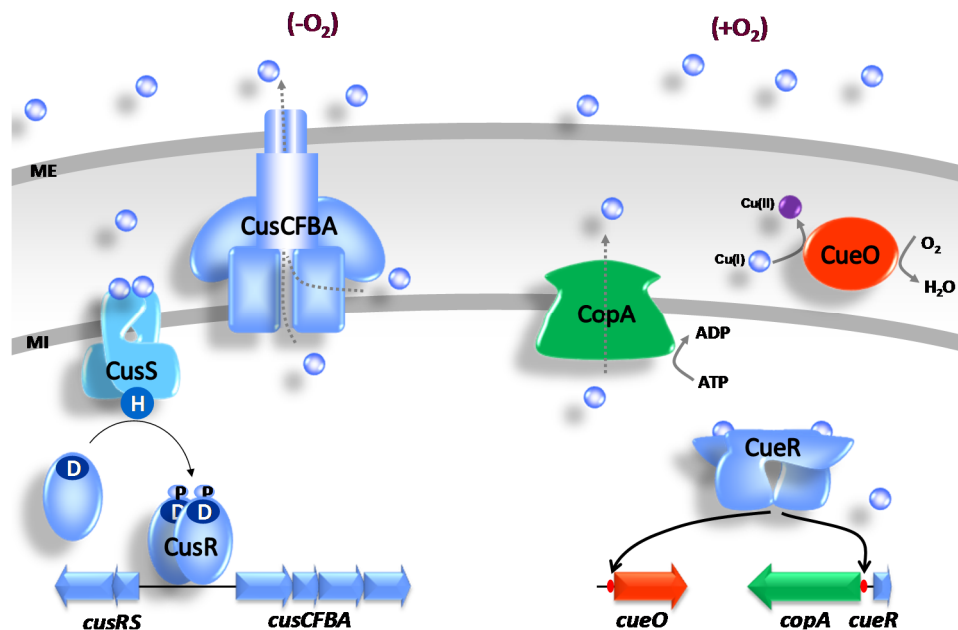


Figura 3. Resistencia a Cu en *E. coli*. La detoxificación de Cu está a cargo de los sistemas Cue y Cus. En presencia de Cu en el citoplasma interviene el sistema Cue. CueR detecta la presencia de Cu y activa la expresión de *copA* y *cueO* que brindan resistencia al metal principalmente en aerobiosis (+O₂). El sistema Cus, detecta Cu en el periplasma activando la expresión de la bomba de eflujo CusCFBA de importancia en la resistencia al Cu en anaerobiosis (-O₂).

MerR (del inglés *Mercury Resistance Regulator*), fue identificado en el año 1986 como el gen responsable de la activación de los genes que otorgan resistencia a mercurio (Hg) en bacterias (Lund y col. 1986). La posterior expresión recombinante y estudios bioquímicos determinaron que se trataba de una proteína capaz de unirse a los promotores bajo su control transcripcional, reconociendo un operador que se caracteriza por repeticiones invertidas que forman una diada simétrica, ubicado entre las cajas -10 y -35 de estos promotores, tanto en presencia como ausencia de Hg (O'Halloran y Walsh 1987).

Mientras que el espaciamiento óptimo entre las cajas -10 y -35 en un promotor típico es de 17 pares de bases (pb), los promotores *mer* operan con un espaciamiento subóptimo de 19 pb (Heldwein y Brennan 2001; Brown y col. 2003); esta es una característica crucial de los promotores modulados por MerR y es el centro del mecanismo de distorsión del ADN con el cual operan estos reguladores.

El hecho de que el espaciamiento entre sus elementos -10 y -35 difiera de los 17 pb consenso, hace que estos promotores sean malos sustratos para la ARN Polimerasa (ARNP) (Outten y col. 1999). En el mecanismo de distorsión del ADN provocado por MerR, la transición desde la represión a la activación involucra varias alteraciones locales en la estructura del ADN y se propone que una serie de distorsiones específicas convierten al promotor en un sustrato propicio para la ARNP (Philips y col. 2015). Se propone que el regulador en su forma apo-MerR provoca una curvatura en el ADN produciendo dos pliegues en la estructura de dicha molécula y el agregado del inductor libera la tensión de esta curvatura a la altura de los pliegues.

Cuando el metal se une a MerR se produce un sub-enrollamiento del ADN (diferente al estado natural sin metal apo-MerR) cuyo efecto es ubicar a las cajas -10 y -35 en un alineamiento apropiado para la unión de la ARNP con lo cual se produce la formación del complejo abierto y el posterior comienzo de la transcripción (Ansari y col. 1992; Outten y col. 1999). El sub-enrollamiento además podría ayudar energéticamente a la separación de las hebras para la formación del complejo abierto. El acortamiento de la región espaciadora, mediante una delección de 2 pb, alinea las cajas -10 y -35 en una conformación apropiada para la unión de la ARNP generando así un promotor "constitutivo" para el regulador de tipo MerR involucrado (Outten y col. 1999).

En el año 2001 se reportó que el regulador de la expresión de la ATPasa que exporta Cu en *E coli*, CopA, es un activador transcripcional de la familia MerR al cual se denominó CueR (Stoyanov y col. 2001). Estudios con el gen reportero *lacZ* demostraron que la expresión de *copA* aumenta en presencia de Cu dependiendo de la presencia de CueR, que se une a su operador y promueve la formación del complejo abierto de un modo similar al descrito para MerR (Espariz y col. 2007; Changela y col. 2003; Philips y col. 2015; Martell y col. 2015).

La calibración termodinámica para CueR revela una sensibilidad zeptomolar (10^{-21}) para la unión de Cu^{1+} libre, que representa menos de un átomo por célula (Changela y col. 2003), sugiriendo que no habría iones de Cu libres en el citoplasma. CueR activa la expresión de los genes que codifican para la multicobre oxidasa CueO y la ATPasa tipo P CopA, que serán detallados a continuación.

La oxidasa CueO

CueO es una multicobre oxidasa periplásmica que cataliza la oxidación de varios sustratos tales como polifenoles, poliaminas aromáticas, L-ascorbato e iones metálicos, transfiriendo los electrones liberados a un grupo de iones Cu con la concomitante reducción de oxígeno molecular a agua (Sakurai y Kataoka 2007). Esta proteína requiere de O₂ para su actividad y por lo tanto es inactiva en anaerobiosis. Aunque aún se debe establecer su rol con mayor precisión, se propone que CueO contribuye a la detoxificación del Cu convirtiendo el Cu(I) en Cu(II), menos tóxico para la célula (Osman y Cavet 2008).

CueO une 4 iones de Cu y es exportada al periplasma por el sistema TAT (para proteínas pre-plegadas), donde exhibe actividad oxidasa inducida por el ión metálico (Roberts y col. 2002; Singh y col. 2004). Esto sugiere que la proteína se pliega y es metalada en el citoplasma antes de su exportación al periplasma. Se propone que la metalación citoplásmica de esta proteína contribuye a la tolerancia a cobre en condiciones anaerobias cuando la actividad oxidasa de esta proteína se encuentra inhibida (Espariz y col. 2007; Pontel y col. 2015).

Además de Cu(I), CueO puede oxidar otros compuestos en presencia de Cu, incluyendo al sideróforo de hierro enterobactina (Grass y col. 2004). De esta forma, *E. coli* se protege de la toxicidad por Cu previniendo la reducción de Cu(II) a Cu(I) mediada por dicho sideróforo (Osman y Cavet 2008).

La bomba de eflujo CopA

Las ATPasas de tipo P_{1B} transportan Cu(I) a través de las membranas celulares en una amplia gama de organismos, incluyendo bacterias, arqueas, y eucariotas. CopA es responsable del eflujo de Cu(I) desde el citosol, impulsada energéticamente por ATP, hacia el periplasma bacteriano (Rensing y col. 2000) tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Osman y Cavet 2008; Espariz y col. 2007). Mutantes por delección en *copA* son hipersensibles al Cu, mientras que la tolerancia a otros metales no se ve afectada, al menos bajo condiciones aeróbicas (Rensing y col. 2000).

El sistema Cus y su rol en monitorear el exceso de cobre en condiciones anaeróbicas

Además del regulón Cue, *E. coli* cuenta con el sistema Cus de detoxificación de Cu; éste, está codificado por el operón *cusCFBA*, y controlado transcripcionalmente por el sistema de transducción de señal de dos componentes CusR/CusS que en presencia de exceso de Cu periplásmico activa su expresión (Figura 3) (Outten y col. 2001).

Mientras que el sistema Cue confiere tolerancia al Cu bajo niveles moderados a altos del metal, el sistema Cus solamente es requerido bajo condiciones extremas de estrés por Cu y es particularmente importante en ambientes anaeróbicos (Bondarczuk y Piotrowska-Seget 2013). Se ha reportado que mientras que la expresión máxima de los promotores de *cueO* y *copA* ocurre a una concentración de 10 μM Cu, la inducción máxima de *cusCFBA* ocurre a niveles mucho mayores, 200 μM Cu, sugiriendo que el sistema de dos componentes sólo se activa ante un estrés de cobre prolongado y/o ante un incremento de las concentraciones del metal (Osman y Cavet 2008). En contraste, bajo condiciones anaeróbicas, la expresión máxima para el promotor de *cusCFBA* ocurre a niveles menores de Cu que los observados en aerobiosis (70 μM), mientras que los niveles de Cu requeridos para la inducción máxima de *cueO* se incrementan a 60 μM , sugiriendo un rol más importante para el sistema Cus bajo condiciones anaeróbicas, posiblemente relacionado a un aumento en la proporción periplasmática de Cu(I) (Osman y Cavet 2008). En concordancia con estas observaciones, mutantes delecionadas en *cusR* o *cusA* poseen una tolerancia normal al Cu en presencia de O₂, pero la sensibilidad y el incremento de la acumulación del metal se evidencian en anaerobiosis (Outten y col. 2001). Sin embargo, la doble mutante $\Delta\text{cueR } \Delta\text{cusR}$, muestra una reducción substancial en la tolerancia al Cu en aerobiosis, comparada ya sea con la cepa silvestre o con las mutantes individuales, y la deleción de los genes estructurales *cusCFBA* en simultáneo con *cueO* también causan pérdida de tolerancia al Cu respecto a la simple mutante *cueO* (Grass y Rensing 2001; Franke y col. 2003), sugiriendo que el sistema Cus posee un rol de respaldo en condiciones aeróbicas cuando el sistema Cue no puede funcionar correctamente.

Los productos de los genes *cusC*, *cusB*, y *cusA* forman un complejo transportador multi-componente que atraviesa ambas membranas así como también el espacio periplasmático (Outten y col. 2001). CusC es una proteína de membrana externa con homología a la proteína de respuesta a estrés TolC; CusB pertenece a la familia de proteínas de fusión de membranas, anclada a la membrana interna y con un gran dominio que atraviesa el espacio periplasmático; y CusA es miembro de la familia RND de antiportadores de protones asociado con el eflujo de un amplio rango de sustratos incluyendo iones metálicos. Tanto CusA como CusB, presentan dominios periplasmáticos con agrupaciones de metioninas posiblemente involucradas en la unión de Cu(I) (Osman y Cavet 2008). Además de estos tres componentes, el operón *cusCFBA* codifica para CusF, una proteína periplasmática pequeña (10 kDa) que une un ión Cu(I) e interacciona tanto con CusC como con CusB, pudiendo participar del eflujo celular de Cu desde el periplasma (Franke y col. 2003).

Existen evidencias de que CusF interactúa con el sistema de eflujo CopA, de manera que el Cu(I) se transfiere de manera unidireccional desde CopA a CusF gracias a la hidrólisis del ATP: por lo que se estableció una relación entre las chaperonas de cobre solubles, como CusF y los sistemas de transporte de cobre de membrana, como CopA (Padilla-Benavides y col. 2014).

5.3.2. Determinantes de la resistencia al cobre en *Salmonella*

A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, en donde la homeostasis de cobre intracelular está mayoritariamente controlada por la acción coordinada de los sistemas Cue y Cus, *Salmonella* conserva sólo el regulón Cue y perdió los genes que codifican para CusCFBA y para el sistema de dos componentes que activa su expresión CusR/CusS. Estudios realizados en nuestro laboratorio (Espariz y col. 2007; Pontel y Soncini 2009) indican que los factores codificados en el regulón Cue de *Salmonella* son responsables de la protección al cobre tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Este regulón incluye el regulador transcripcional CueR (91 % idéntico a su ortólogo en *E. coli*), que en presencia de cobre activa la expresión de la oxidasa periplásmica CueO, también llamada CuiD, que posee un 80 % de identidad

con CueO de *E. coli* (Kim y col. 2002; Lim y col. 2002) y de la ATPasa de tipo P, CopA (Espariz y col. 2007). Además, en *Salmonella* existe el locus *gol* (por su sigla en inglés *gold-resistance*) que codifica para un sistema con homología a Cue y que también contribuye a la homeostasis de cobre en *Salmonella*. El locus *gol* se encuentra ubicado en una región genómica de 45 kb presente exclusivamente en algunos serotipos de *Salmonella*, y comprende los operones *golTS* (*golT*, del inglés *GolS regulated transporter*, y *gols* por *gold sensor*), *gesABC* (del inglés *GolS induced CBA-efflux system*) y el gen *golB* (*GolS induced binding protein*). GolS es un activador transcripcional de la familia MerR, 41 % idéntico a CueR de *E. coli* y *Salmonella*. Actúa controlando la transcripción de los genes *golB*, *golT* y *ges* en presencia de Au(I) en el medio de cultivo (Checa y col. 2007). Aunque es altamente selectivo para iones de Au, GolS es capaz de detectar otros metales como Cu y Ag, aunque el nivel de activación de GolS en presencia de estos iones es mucho menor que el observado para CueR (Checa y col. 2007). El gen *golT*, ubicado corriente arriba del regulador, codifica para una ATPasa de tipo P (estructural y funcionalmente homóloga a CopA, con un 42 % de identidad), mientras que el gen *golB*, corriente abajo del regulador, codifica para una proteína de unión a metal.

Tal como ocurre en *E. coli*, el sistema Cue de *Salmonella* protege al citosol del exceso de Cu. Aunque *Salmonella* carece del sistema de eflujo de Cu periplasmático CusCFBA, puede soportar concentraciones del metal bajo condiciones anaeróbicas. Esta resistencia está dada, en gran medida por *cueP*, un gen que codifica para una proteína periplásmica de unión a Cu (Pontel y Soncini 2009) (Figura 4), que está ausente en *E. coli* y forma parte del regulón Cue de *Salmonella*.

cueP, del inglés *CueR- induced periplasmic protein*, fue inicialmente identificado como parte del regulón Cue por poseer un operador controlado por CueR en su región promotora (Pontel y Soncini 2009). Más adelante, L. Pontel y A. Pezza, en sus respectivos trabajos de Tesis en nuestro laboratorio, observaron que *cueP* exhibe una expresión diferencial dentro del regulón Cue, evidenciada por la ausencia de inducción transcripcional por Cu en cultivos crecidos a pH ácido y un retraso temporal relativo en la inducción de la expresión por el metal a pH neutro a alcalinos. Asimismo, se identificó una región en el promotor de *cueP* responsable de este fenotipo. Dentro de esta región, y mediante estudios bioinformáticos, se

encontró un sitio probable de unión para CpxR, regulador de respuesta del sistema de dos componentes CpxR/CpxA que responde a estrés de envoltura. Mediante el uso de mutantes y reporteros transcripcionales se demostró que la expresión diferencial de *cueP* depende de CpxR/CpxA y se observó que los niveles proteicos de CueP se corresponden con los niveles transcripcionales, manteniendo el mismo perfil de expresión tanto en presencia como en ausencia de oxígeno donde su función en la resistencia al Cu es crucial para la sobrevivencia de *Salmonella*. También se verificó *in vivo* e *in vitro* que CpxR regula la expresión de *cueP* de forma directa, interaccionando con un sitio único de unión en su región promotora que coincide con la secuencia consenso predicha. Dicho sitio se localiza corriente arriba del sitio de unión de CueR y ambos reguladores pueden interaccionar con el promotor de *cueP* independientemente de la presencia del otro (Tesis Pezza, 2016).

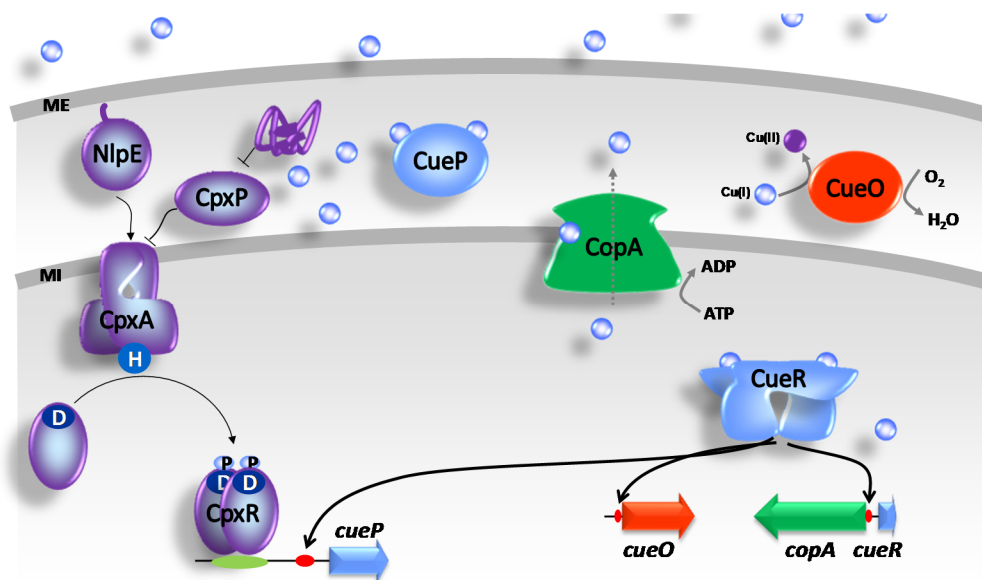


Figura 4. Resistencia a Cu en *Salmonella*. Tanto en anaerobiosis como en aerobiosis los componentes del regulón Cue intervienen en la resistencia al Cu, a diferencia de *E. coli*. CueR activa la expresión de *copA* y *cuiD* (importantes en la resistencia al Cu en presencia de oxígeno). La expresión de CueP está coordinada entre la acción de CueR y el sistema de dos componentes CpxRA.

Estos y otros resultados, orientados a responder cómo estos dos reguladores, CueR y CpxR, son requeridos para la formación del complejo abierto y el inicio de la transcripción y cuál es el rol fisiológico de la regulación tan controlada de *cueP*, fueron publicados por nuestro grupo (Pezza y col. 2016) y forman parte de este

trabajo de Tesis, por lo que serán abordados y discutidos en la sección Resultados y Discusión de este Trabajo. A continuación se hará una descripción de CueP.

La cuproproteína CueP

CueP es una proteína de 19,3 KDa sin un dominio conocido o caracterizado funcionalmente. La fusión del epítopo 3xFLAG C-terminal ubica a la proteína en el periplasma de las células crecidas en presencia de Cu, aumentando su concentración a medida que aumentan las concentraciones del catión en el medio, de forma dependiente de CueR (Pontel y Soncini 2009). Análisis del contenido del periplasma mediante ensayos de Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) indicaron que CueP es la cupro-proteína periplásmica predominante en *Salmonella Typhimurium*, demostrando además, que es capaz de unir Cu *in vivo* (Osman y col. 2010). Asimismo, se determinó Zn asociado a CueP, lo cual sugiere que dicha proteína posee la capacidad de unir Zn o bien la existencia de algún complejo de Zn dependiente de la misma (Osman y col. 2010).

El rol de CueP en la resistencia a Cu no es evidente en aerobiosis ya que no se observan diferencias en las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para dicho metal entre la mutante $\Delta cueP$ y la cepa silvestre. Sin embargo, el requerimiento de CuePadquiere relevancia en una mutante en *cuiD*, además que susobreexpresión aumenta la CIM para Cu de la cepa $\Delta cuiD$ aunque no alcanza los niveles de resistencia de la cepa silvestre (Pontel y Soncini 2009).

CueP cobra un rol significativo en la resistencia al Cu en ausencia de oxígeno/anaerobiosis, observándose una disminución en la CIM de 0,2 mM CuSO₄ para una cepa mutante $\Delta cueP$ comparada con 0,4 mM CuSO₄ para la cepa silvestre (Pontel y Soncini 2009). La ausencia de *cueP* produce un efecto más pronunciado en la resistencia a Cu en anaerobiosis que una mutante en los otros dos genes controlados por CueR, *copA* y *cuiD* (Pontel y Soncini 2009).

Se observó que la ausencia simultánea de *copA* y *golT* aumenta sustancialmente el contenido total de Cu celular (Osman y col. 2010). Los productos de estos genes participan del transporte del catión desde el citoplasma al periplasma pero se desconoce cómo ocurre el eflujo desde el periplasma hacia el exterior celular (Osman y col. 2010). Para determinar si CueP está involucrada en este proceso de

secreción del catión se determinó la cantidad de Cu total en una cepa mutante en *cueP* crecida en medio mínimo suplementado con concentraciones no inhibitorias de Cu y se observó que la misma presenta un incremento de aproximadamente 3 veces en el contenido de átomos de Cu por célula, indicando que CueP participa de algún mecanismo involucrado en la eliminación celular del exceso del ión metálico (Osman y col. 2010).

Recientemente se reportó que CueP posee un rol en el metalado de la Cu-Zn superóxido dismutasa SodCII (Osman y col. 2013). Las Cu-Zn superóxido dismutasas son metaloenzimas importantes para proteger a las células de las especies reactivas del oxígeno, EROs (Bannister y col. 1987). Su localización en el espacio periplasmático sugiere que protege a las bacterias del superóxido extracelular generado por ejemplo por células fagocíticas (Desideri y Falconi 2003) favoreciendo la persistencia bacteriana dentro del hospedador y por ende su virulencia (Piddington y col. 2001; Gee y col. 2005). Teniendo en cuenta que las Cu-Zn superóxido dismutasas también están en microorganismos no patogénicos se propone que tienen funciones en la detoxificación de anión superóxido generado en el periplasma durante el crecimiento aeróbico (Korshunov y Imlay 2006). Todas las cepas de *Salmonella enterica* poseen un gen que codifica para SodCII ortólogo al gen *sodC* de *E. coli* (Fang y col. 1999). Además, muchas cepas de *Salmonella* poseen un gen que codifica para SodCI, que tiene una mayor tasa de actividad catalítica que SodCII (Ammendola y col. 2005).

Mediante la examinación de la actividad SOD en las fracciones periplásmicas se observó que se acumula SodCII inactiva cuando se sobre-expresa dicha enzima en una mutante en *cueP* (Osman y col. 2013). Acorde a los resultados de actividad, cuando se llevaron a cabo medidas del contenido metálico de SodCII en la mutante en *cueP*, se evidenció que la proteína presenta iones de Zn unidos pero no de Cu, y que la suplementación con un exceso de este último catión en las fracciones que contenían a la enzima restablece la actividad SOD a los niveles observados en las fracciones obtenidas de la cepa silvestre (Osman y col. 2013). Esto sugiere un rol fisiológico de CueP a concentraciones bajas de Cu donde puede participar como chaperona en el metalado de SodCII.

Se determinó que CueP forma un dímero con forma de V unido no covalentemente, cuyas cisteínas e histidinas conservadas se encuentran agrupadas sobre un lado del dominio C-terminal, sugiriendo que esta región es importante para la función de CueP (Yoon y col. 2013). Dicha caracterización se llevó a cabo por difracción de rayos X y el cálculo de la estructura corresponde a la forma no metalada. Análisis biofísicos adicionales muestran que CueP une Cu y Zn con buena afinidad y que una mutación en la Cys104, presente en la región rica en cisteínas e histidinas, reduce dramáticamente dicha afinidad, sugiriendo que tal región es responsable de la unión del Cu (Yoon y col. 2013). CueP presentaría un equilibrio en su estado de oligomerización más allá de las interacciones no covalente descrita por Yoon y colaboradores, incluyendo uniones de puente disulfuro en una nueva interface. Dicha interface involucra rulos conservados, interfiere con la unión de Cu, y contiene residuos críticos para la función de CueP *in vivo* (Abriata y col. 2014). La expresión de CueP en *E. coli* en ausencia de Cu seguida de un análisis de SDS-PAGE muestra la presencia de una única banda de 17 kDa correspondiente al monómero. Sin embargo, en condiciones no reductoras se observa un patrón complejo con dos bandas principales a 30-34 kDa, dos bandas a alrededor de 15-17 kDa y otra a 68 kDa, correspondientes a las especies dimérica, monomérica y tetramérica, respectivamente (Abriata y col. 2014). En presencia de Cu se observan las mismas especies pero aumentan las bandas correspondientes al monómero y en menor medida al tetrámero y baja la proporción del dímero. Estos resultados sugieren que el estado de oligomerización de CueP incluye la formación de dímeros por puentes disulfuro y que la unión al Cu interfiere en dicho proceso (Abriata y col. 2014). La sustitución de la Cys104 y Cys172 por serina (pero no la de la Cys96) disminuye la formación del dímero e impide la formación del tetrámero. Estudios *in vitro* de titulación con Cu de la proteína silvestre como de las mutantes en las cisteínas tanto en sus formas reducidas como oxidadas, muestran que existe un equilibrio complejo que acopla la dimerización con la formación de enlaces disulfuros intra e intercatenarios y con la unión de Cu. Abriata y colaboradores proponen que la dimerización dinámica a través de esta nueva interface puede acoplar la actividad funcional de CueP con el monitoreo del estado redox del periplasma, con la transferencia de equivalentes de reducción a través de DsbC, o con el suministro de Cu a SodCII (Abriata y col. 2014).

I.6. Los metales de transición y su rol en la virulencia bacteriana

6.1. Adquisición de los metales por parte de las bacterias e inmunidad nutricional del hospedador

Las bacterias han desarrollado tres clases principales de sistemas de adquisición de metales: la importación de metal, la adquisición de metal a partir de proteínas del hospedador y la captura de metal extracelular por metalóforos, como enterobactina y yersiniabactina, entre otros (Behnsen y Raffatellu 2016). En respuesta, los mamíferos han desarrollado estrategias para restringir la adquisición de metales por parte de las bacterias. La proteína transferrina fue la primera en ser reportada por su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano mediante el quelado de hierro en claras de huevo y plasma humano en la década de 1940, y más tarde se demostró que la lactoferrina tiene propiedades similares en las superficies de las mucosas. Treinta años más tarde, Eugene Weinberg popularizó el término inmunidad nutricional para describir este fenómeno, que desde entonces se ha ampliado para incluir no sólo la restricción del hierro sino también la limitación de Zn, Mn y nutrientes no metálicos, tales como los aminoácidos, por parte del hospedador (Palmer y Skaar 2016).

6.2. Dualidad del cobre: tóxico y micronutriente esencial

Dependiendo del tipo de patógeno que causa una infección, bacterias o patógenos eucariotas, así como también del sitio y del curso de la infección, el organismo invasor puede estar sujeto a una sobrecarga del metal, o bien ser sometido a una limitación de este micronutriente esencial. Si bien está aceptado y establecido el rol de la toxicidad del cobre impuesta por el hospedador (detallado a continuación), aún resta seguir analizando su rol como micronutriente esencial tanto para el hospedador como para el patógeno, ya que hasta el momento sólo se ha reportado el papel de la limitación del cobre para patógenos fúngicos (Besold y

col. 2016). Serán necesarios más estudios para determinar si las bacterias patógenas también se ven afectadas por una limitación activa del cobre por parte del hospedador.

6.2.1. Iones de cobre como munición

Un suministro suficiente de cobre en la dieta es necesario para resistir a una infección en general. Es importante para el desarrollo inmune y puede servir como intoxicante microbiano. De hecho, se ha establecido que el hospedador aprovecha la toxicidad del cobre para crear microambientes nocivos para las bacterias intracelulares (Becker and Skaar 2015).

Adquisición y tráfico de cobre desde el hospedador a las bacterias

En eucariotas, desde levaduras a mamíferos, la adquisición de cobre celular requiere de un importador de Cu(I) conservado localizado en la membrana plasmática, Ctr1 (Figura 5, izquierda). En células fagocíticas, el Cu(I) se acumula en vesículas citoplasmáticas que se fusionan parcialmente con el fagolisosoma que finalmente transita en un compartimento antimicrobiano y existe evidencia que sugiere que esta acumulación puede depender del tráfico de la ATPasa transportadora de Cu(I), ATP7A, específicamente a las membranas de estas vesículas (Fig.5) (Fu y col. 2014).

Los patógenos exitosos explotan al menos dos estrategias recientemente caracterizadas para minimizar los efectos de la toxicidad del cobre en este compartimento antes de que el metal ingrese a la célula bacteriana (Fu y col. 2014).

E. coli uropatogénica (UPEC) sintetiza un sideróforo llamado yersiniabactina (Ybt), Figura 5, que une Cu(II) y cataliza la dismutación del superóxido a H₂O₂ y O₂. Un trabajo reciente revela que esta actividad le otorga una ventaja a UPEC en su sobrevivencia en los fagolisosomas (Fu y col. 2014). *Mycobacterium tuberculosis* codifica para una SOD5 (SodC) que se secreta como una apoproteína y que es rápidamente metalada por el cobre extracelular disponible. Existen evidencias de que SodC es secretada al espacio extracelular, se asocia también con la pared celular y con las fracciones de membrana donde funciona extra-citoplasmáticamente (Figura5).(Fu y

col. 2014). La deficiencia de cobre se asocia con neutropenia y aumenta la susceptibilidad a infecciones por *Mannheimia haemolytica* y *S. enterica* en modelos animales (Palmer y Skaar 2016).

Homeostasis de cobre en *Salmonella* durante la sobrevivencia intracelular

La disponibilidad del ión metálico en las SCV de macrófagos se monitoreó utilizando el promotor de *copA* fusionado al reportero *lacZ*, revelando que dicho compartimento contiene una elevada concentración de Cu (Osman y col. 2010), y sugiriendo fuertemente que la resistencia al metal es de importancia para la sobrevivencia de la bacteria. Esto se correlaciona con una mayor tasa de muerte de una cepa mutante $\Delta copA \Delta goIT$ respecto a la cepa silvestre pasadas las 12 horas de infección en macrófagos en cultivo (Osman y col. 2010). Por otra parte, una cepa mutante $\Delta cueO$ de *S. Typhimurium* que no expresa la multicobre oxidasa, está atenuada en un modelo murino de infección, recuperando menos bacterias desde bazo y hígado respecto a la cepa silvestre, destacando el rol de los mecanismos de resistencia a cobre y la virulencia en este patógeno (Achard y col. 2010).

Entonces, la acumulación de cobre en el lumen del fagolisosoma representa una de las múltiples estrategias del hospedador para generar un ambiente tóxico en torno al microorganismo invasor, que incluye un pH ácido; especies reactivas del nitrógeno (ERNs), como el óxido nítrico; especies reactivas del oxígeno (EROs), como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido O_2^- derivado de la oxidasa NADPH; y especies reactivas de cloro (ERCs), como el hipoclorito (HOCl).

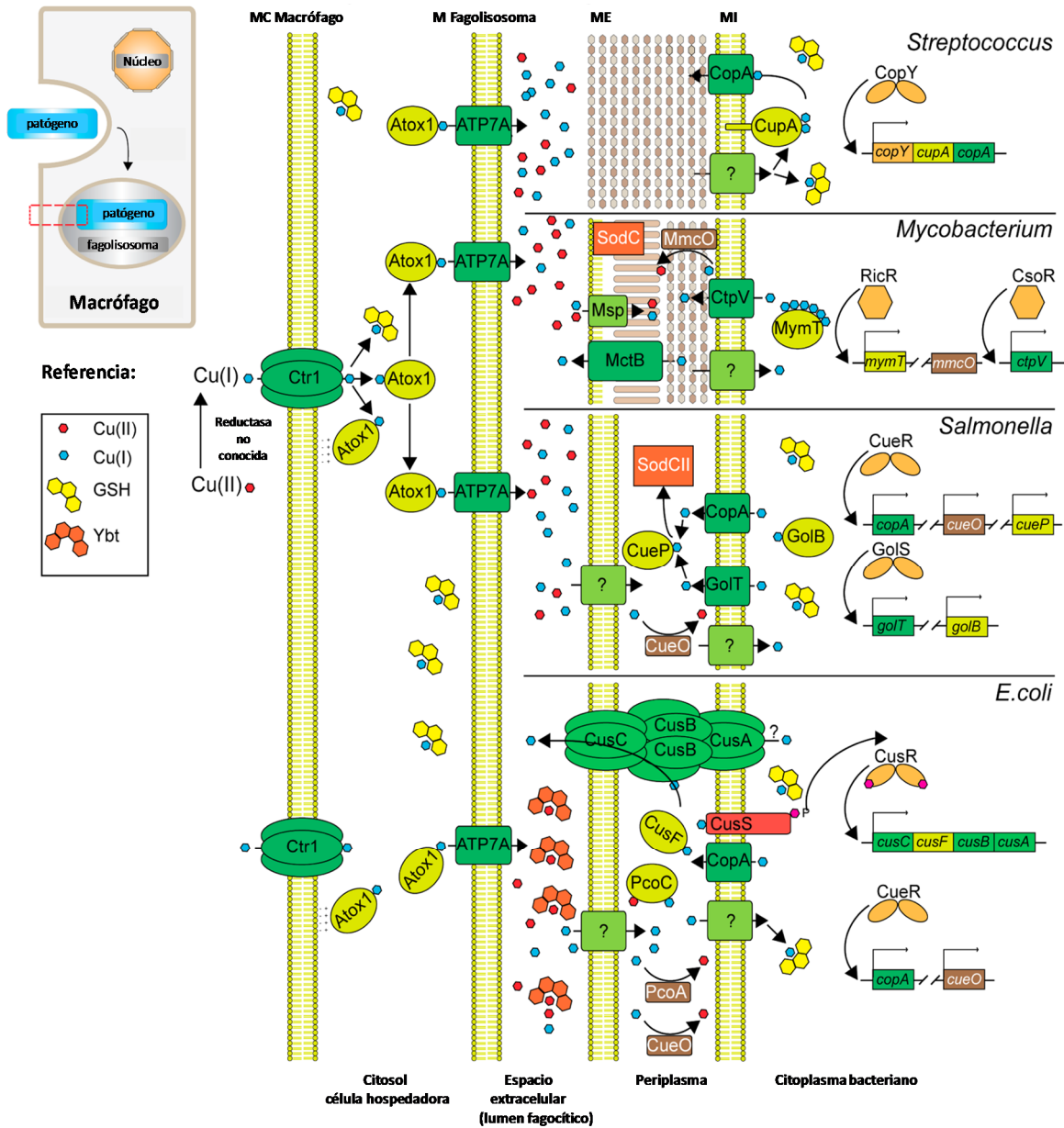


Figura 5. Vías de transporte, tráfico, sensado y resistencia de cobre en varias bacterias patógenas, incluyendo *S. pneumoniae* (Gram +), *M. tuberculosis* y dos bacterias Gram (-) relacionadas, *E. coli* y *Salmonella enterica*, en la interface patógeno-hospedador. Parte superior izquierda, representación de un macrófago internalizando a un patógeno bacteriano, finalmente secuestrado en un compartimento fagolisosomal intracelular. La caja roja destaca el citosol, el lumen fagocítico y las membranas externas / internas de la bacteria (de izquierda a derecha), ampliado en el cuerpo principal de la figura. Tanto CueO, PcoA y MmcO6 son multicobre oxidasas (MCOs). A la derecha se muestran las proteínas metaloregulatorias representativas. Adaptado de (Fu y col. 2014).

1.7. El estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un evento que ocurre cuando se altera la homeostasis de óxido-reducción intracelular; es decir, se pierde el equilibrio entre la producción de especies reactivas y la producción y/o acción de los antioxidantes (Winyard y col.

2005) e involucra numerosas especies oxidantes (Nordberg y Arnér 2001). Entre ellas, las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (EROs y ERNs, respectivamente) juegan un importante rol, dado que son altamente reactivas y formadas por un proceso natural, inevitable y constante. Todas las células independientemente del tipo, están permanentemente en contacto con estas moléculas reactivas, ya sea por influencias externas o como subproductos del propio metabolismo (Winyard y col. 2005). El daño que estas especies reactivas provoquen dependerá del balance entre las EROs y las defensas antioxidantes que disponen las células. En esta situación de estrés oxidativo se manifiestan las lesiones que producen los radicales libres al reaccionar químicamente con lípidos, proteínas, hidratos de carbono, ácidos nucleicos y componentes de la matriz extracelular; por lo que puede desencadenar un daño irreversible que, si es muy extenso, lleva a la misma muerte celular (Winyard y col. 2005).

Las EROs incluyen el anión superóxido (O_2^- , $+1 e^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , $+2 e^-$) y el radical hidroxilo (HO^\bullet , $+3e^-$) (Figura 6). Además de producirse como productos del metabolismo aeróbico, las EROs también pueden generarse activamente por enzimas. Incluso las bacterias encuentran altos niveles de EROs liberados por microorganismos competidores o por las células fagocíticas del hospedador, como así también en ambientes ricos en metales (Arts y col. 2015).

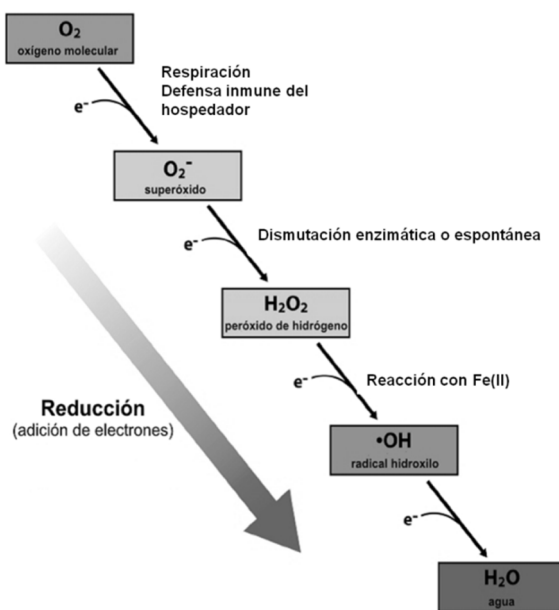


Figura 6. Formación de especies reactivas del oxígeno, EROs. Pueden generarse por el metabolismo aeróbico, las defensas inmunes innata del hospedador, por microorganismos competidores y por entornos ricos en metales. Adaptado de (Mishra y Imlay 2012).

7.1. Las especies reactivas del oxígeno y su rol en la virulencia de *Salmonella*

Las células fagocíticas están entre los componentes más importantes de la respuesta inmune innata, que es la primera línea de defensa del hospedador. Dos de los sistemas antimicrobianos más importantes de las células fagocíticas son la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), y la enzima oxidasa de NADPH fagocítica (también conocida como Phox), responsables de la generación de óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y de superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), respectivamente (Ferric C. Fang 2004). Los ratones que carecen de una oxidasa de NADPH fagocítica funcional sucumben rápidamente a dosis de infección que son bien sobrellevadas por los ratones de tipo silvestre (Mastroeni y col. 2003). Además, los individuos que sufren de la enfermedad granulomatosa crónica, una condición caracterizada por una respuesta fagocitaria oxidativa defectuosa, muestran un aumento de la prevalencia de infecciones extraintestinales causadas por los serotipos no tifoideos de *Salmonella* (Mastroeni y col. 2003).

El superóxido producido por la oxidasa de NADPH fagocítica (Phox) no posee la capacidad de penetrar membranas lipídicas y suele quedar confinado en el compartimento que se produce. Puede ingresar al periplasma bacteriano a través de porinas o a través de la membrana externa parcialmente permeabilizada por péptidos antimicrobianos (Slauch 2011). Esta especie puede causar el mismo daño que el peróxido producido de manera endógena, mediante la química de Fenton. La enzima SodCI periplasmática protege a la célula dismutando el superóxido al peróxido de hidrógeno, que puede difundir libremente a través de las membranas hasta el citoplasma. *Salmonella* codifica para tres catalasas (KatE, KatG y KatN) y tres peroxididasas (AhpC, TsaA y Tpx), capaces de mantener la concentración de peróxido citoplásmico por debajo de los niveles tóxicos (Slauch 2011) (Figura 7).

Hebrard y colaboradores mostraron que las cepas de *Salmonella* que carecían únicamente de las tres catalasas, o de dos de las tres peroxididasas, mostraban una virulencia silvestre, mientras que una mutante que carecía de las cinco enzimas era atenuada en su virulencia (Hebrard y col. 2009). Estos resultados demuestran el rol

de los sistemas citoplasmáticos detoxificadores de H_2O_2 en la protección frente al estallido oxidativo que puede sufrir *Salmonella* durante el proceso infeccioso.

Los detoxificadores de EROs, como catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas (SODs), reaccionan directamente con las especies oxidantes interceptándolas antes de que puedan producir daño. Las oxidoreductasas, tales como las tiorredoxinas, glutaredoxinas y proteínas de tipo tiorredoxinas, no sólo suministran a algunos de estos detoxificadores de EROs los equivalentes reductores que necesitan para combatir la batalla del estrés oxidativo, sino que también están implicados activamente en la reparación de proteínas dañadas por oxidación (Arts y col. 2015). Los mecanismos de defensa citoplasmáticos de bacterias contra el estrés oxidativo han sido extensamente estudiados. Por el contrario, los mecanismos de resistencia a estrés oxidativo de la envoltura bacteriana están poco descritos y comprendidos.

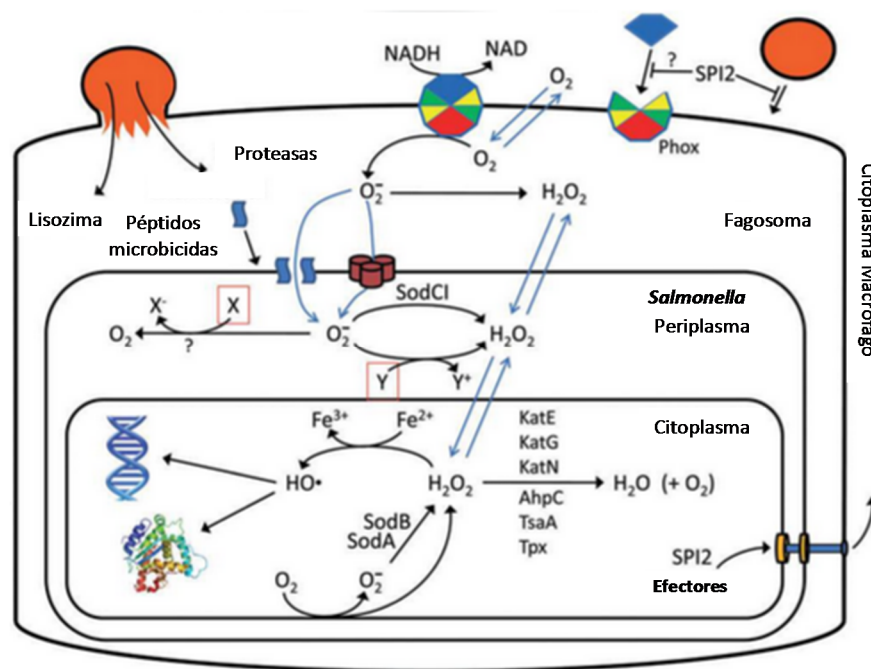


Figura 7. Especies reactivas del oxígeno en la vacuola que contiene a *Salmonella*. Cuando *S. Typhimurium* es internalizado por los macrófagos produce una serie de factores de virulencia que le permiten inhibir el suministro de las sustancias microbicidas al fagosoma, sobrevivir a los diversos mecanismos de muerte y propagarse en un compartimento único denominado vacuola que contiene *Salmonella*. Aunque *Salmonella* puede reducir el ensamblado de Phox al fagosoma, la producción de EROs por parte del hospedador es muy importante para controlar la infección. El complejo oxidasa fagocítica dependiente de NADPH genera superóxido de la reducción univalente del oxígeno molecular. Las superóxido dismutasas, localizadas tanto en el periplasma (SodC) como en el citoplasma (SodA y SodB) bacteriano, dismutan el superóxido a H_2O_2 y oxígeno molecular. El H_2O_2 puede difundir libremente a través de las membranas y formar el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) en presencia de Fe(II) . Estas EROs pueden oxidar y dañar proteínas, ADN y membranas. *Salmonella* cuenta con 3 catalasas (KatE, KatG y KatN) y 3 peroxidasas (AhpC, TsaA y Tpx) para degradar el H_2O_2 . Adaptado de (Slauch 2011).

I.8. El periplasma es un compartimento oxidante donde ocurre la formación de puentes disulfuro

La envoltura celular de las bacterias Gram(-) es una barrera estructural y selectivamente permeable, la cual es esencial para la forma y el crecimiento celular. La misma sirve para proteger a estos microorganismos de su entorno impredecible, y muchas veces hostil (Silhavy y col. 2010). Se compone de la membrana interna (MI), que está en contacto directo con el citoplasma, la membrana externa (ME), que constituye la interface entre la célula y el medio externo, y el espacio entre las mismas, llamado periplasma. La MI y la ME difieren en términos de estructura y composición. Mientras que la MI es una bicapa de fosfolípidos clásica, la ME es asimétrica y compuesta de fosfolípidos y lipopolisacáridos (LPS) en la cara interna y externa, respectivamente. El periplasma contiene una capa delgada de peptidoglicano y representa el 10-20% del volumen total de células. En *E. coli*, cerca de 400 proteínas son dirigidas al periplasma, donde realizan una variedad de funciones fisiológicas importantes, tales como ayudar al plegamiento de proteínas nacientes, mediando la captación y transporte de nutrientes o detoxificando compuestos tóxicos (Silhavy y col. 2010).

Con un potencial redox superior al del citoplasma (-165 mV frente a -260/-280 mV en *E. coli*, respectivamente), el espacio periplásmico es considerado un compartimento oxidante. Consistentemente, la mayoría de los residuos de cisteína presentes en las proteínas periplasmáticas se oxidan a disulfuro. Estos enlaces disulfuro, importantes para la estabilidad de las proteínas, son introducidos en las proteínas periplasmáticas por la oxidoreductasa soluble DsbA, una proteína con plegamiento de tipo tiorredoxina con un motivo Cys-cualquier aminoácido-Cys-cualquier aminoácido, CXXC (Bardwell y col. 1991). Estos residuos de cisteína forman un enlace disulfuro muy inestable, que se transfiere a las proteínas recién sintetizadas a medida que entran en el periplasma, liberando a DsbA en estado reducido. DsbA se recicla de nuevo al estado oxidado por la proteína de membrana interna DsbB (Figura 8), que genera enlaces disulfuro de *novoo* de la reducción de las quinonas (Missiakas y col. 1993; Bader y col. 1999; Inaba y Ito 2008). DsbA introduce de manera preferencial enlaces disulfuro en las proteínas que entran al

periplasma por oxidación de los residuos de cisteínas que son consecutivos en la secuencia proteica. Por lo tanto a menudo introduce disulfuros incorrectos en proteínas que requieren que los puentes disulfuro se formen entre cisteínas no consecutivas (Nakamoto y Bardwell 2004; Ruiz y col. 2010); y esto mismo ocurre cuando en el periplasma hay exceso de cobre libre que también puede formar enlaces disulfuro no nativos (Hiniker y col. 2005). Estos enlaces disulfuros no nativos son corregidos por otra proteína periplasmática de la superfamilia de las tiorredoxinas, DsbC (Figura 8). Esta isomerasa de puentes disulfuro tiene una estructura homodimérica con forma de V (McCarthy y col. 2000). Cada subunidad de DsbC contiene un motivo catalítico CXXC, situado dentro del plegamiento de tipo tiorredoxina. En contraste con DsbA, las cisteínas catalíticas de DsbC se mantienen reducidas en el periplasma, lo que le permite a esta proteína funcionar como una isomerasa o una reductasa (Rietsch y col. 1996). Mientras decenas de proteínas se han identificado como sustratos de DsbA (Hiniker y Bardwell 2004; Kadokura y col. 2004; Leichert y col. 2004; Vertommen y col. 2008), sólo se conocen muy pocas proteínas con múltiples residuos de cisteína que dependen de DsbC para su correcto plegado. Entre ellas se encuentran las enzimas periplásmicas MepA, AppA, RNasa I y End1 (Hiniker y Bardwell 2004; Vertommen y col. 2008; Berkmen y col. 2005), como así también la proteína LptD localizada en la membrana externa (Denoncin y col. 2010) y la lipoproteína sensora de estrés RcsF (Leverrier y col. 2011). La proteína que mantiene el motivo CXXC de DsbC en estado reducido es DsbD (Figura 8), una proteína de membrana interna que transfiere el poder reductor a través de la membrana pasando los electrones recibidos de la tiorredoxina citoplasmática (Trx) a una variedad de vías reductoras que funcionan en la envoltura celular (Katzen y Beckwith 2000; Cho y Collet 2013) Trx es una oxidoreductasa ubicua que se mantiene reducida por la tiorredoxina reductasa (TR) a expensas del NADPH (Figura 8).

DsbD contiene tres dominios: un dominio N-terminal periplásmico (DsbD α), un dominio C-terminal periplásmico (DsbD γ) y un dominio hidrofóbico embebido en la membrana (DsbD β). Cada uno de estos dominios contiene dos cisteínas redox químicamente activas, esenciales para la función de la proteína (Cho y col. 2012). Los electrones se transfieren a través de la membrana por la proteína DsbD,

comenzando con la reducción de un enlace disulfuro intramembrana en el dominio hidrofóbico DsbD β gracias a la acción de la tiorredoxina citoplasmática Trx-1 (también llamada TrxA). Los electrones luego se transfieren desde las cisteínas reducidas de DsbD β al dominio de tipo tiorredoxina periplasmático DsbD γ . Desde DsbD γ , al dominio de tipo inmunoglobulina DsbD α , el cual luego reduce a sus sustratos, como DsbC, DsbG y CcmG (Katzen y Beckwith 2000; Cho y col. 2012).

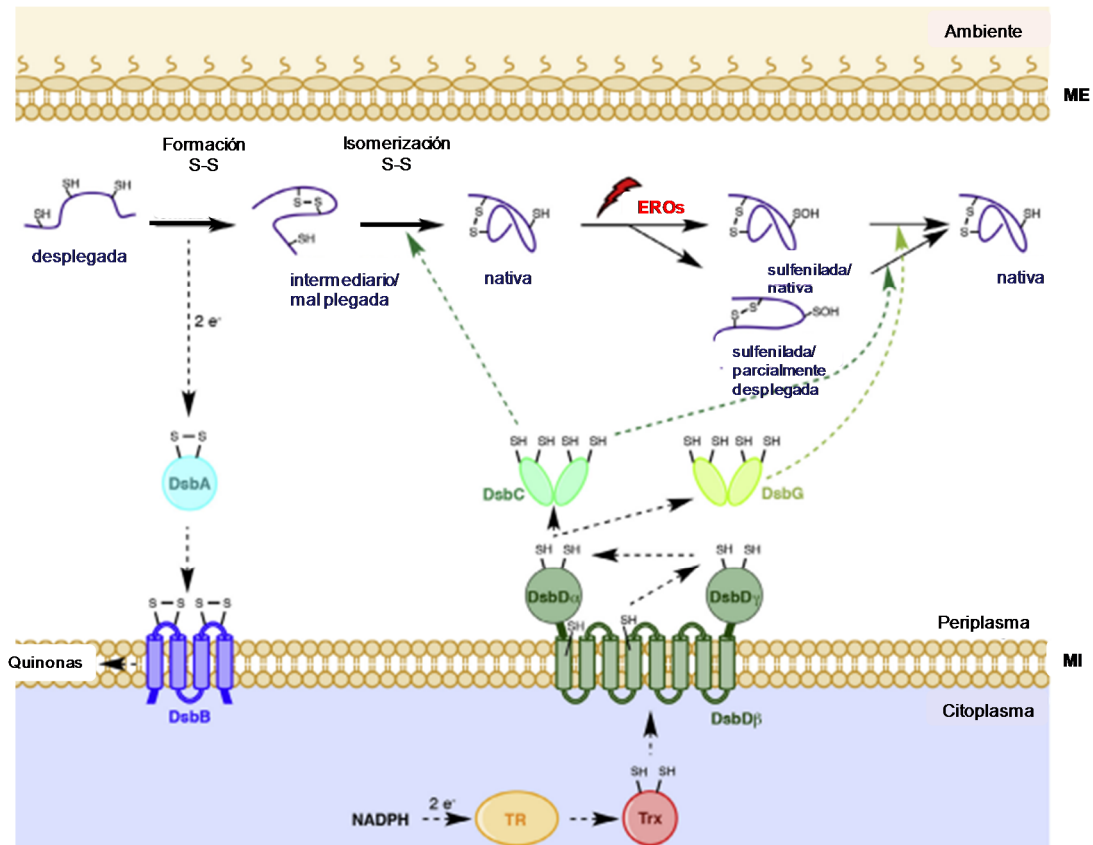


Figura 8. Sistema de formación de puentes disulfuro (S-S) en el periplasma de *E. coli*. Los S-S son introducidos por DsbA en las proteínas desplegadas recién translocadas al periplasma. Los e- son transferidos luego a la proteína de MI DsbB y finalmente a las quinonas. DsbC corrige los errores de DsbA y es mantenida en estado reducido por DsbD, una proteína de MI que recibe los e- de la tiorredoxina citoplasmática (Trx). DsbG, rescata a las proteínas sulfeniladas en el periplasma, también es reducida por DsbD. Asimismo, DsbC coopera con DsbG para rescatar a ciertas proteínas sulfeniladas en el periplasma. Se propone que DsbC interactúa de manera preferencial con proteínas sulfeniladas desplegadas (parcialmente). En contraste, DsbG parece estar diseñada para interactuar con proteínas globulares que presentan Cys oxidadas. Las flechas discontinuas indican el flujo de e-. TR: tiorredoxina reductasa. ME: membrana externa y MI: membrana interna. Adaptado de (Arts y col. 2015).

Algunas bacterias expresan una proteína homóloga que contiene únicamente el dominio citoplasmático de membrana DsbD β , como por ejemplo CcdA de *Rhodobacter capsulatus*. Recientemente se inició la caracterización de una tercera clase distinta de proteínas que forman parte de la vía reductora de la envoltura celular, además de DsbD y CcdA (Figura 9), cuyo prototipo es una proteína de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, llamada ScsB (del inglés *suppression of copper sensitivity*), que forma parte del locus *scs*, que codifica para cuatro proteínas que confieren tolerancia a cobre en mutantes de *E. coli* sensibles a dicho metal (Gupta y col. 1997; Cho y col. 2012).

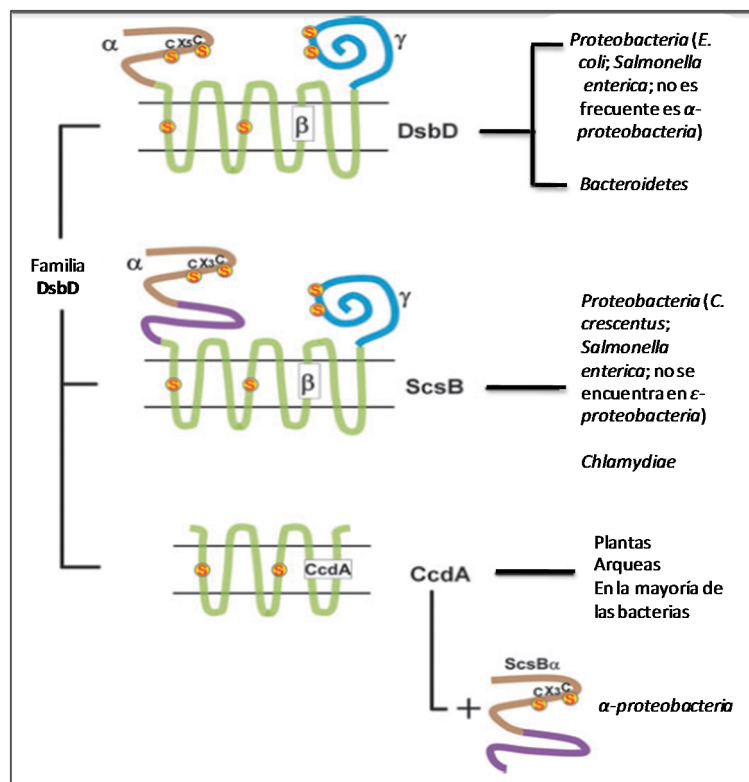


Figura 9. Diversidad de la familia de las proteínas tipo DsbD. Se clasifican en tres grupos: DsbD, ScsB, y CcdA. Adaptado de Cho y Collet, 2012.

8.1. Detoxificadores de EROs que actúan el periplasma bacteriano

Los detoxificadores de peróxidos, tales como catalasas y peroxidases, se encuentran comúnmente en el citoplasma (Hébrard y col. 2009; Aussel y col. 2011), y prácticamente no existen reportes de su presencia en el periplasma bacteriano. Sin embargo, una búsqueda muy reciente de sustratos de la proteína ScsB en la α -proteobacteria *Caulobacter crescentus*, llevó a la identificación del primer sistema

de reducción de peróxidos activo en el periplasma (Cho y col. 2012). En esta bacteria, ScsB entrega electrones a una proteína de tipo tiorredoxina TlpA presente en el periplasma, que a su vez reduce a una peroxirredoxina periplasmática, PprX. La caracterización de PprX reveló que esta enzima es activa contra H_2O_2 e hidroperóxido de cumeno (Cho y col. 2012). Este descubrimiento indica que al menos para ciertas bacterias, es importante detoxificar de manera directa los peróxidos en la envoltura celular antes de que alcancen el citoplasma.

8.2. Reparación de las proteínas de la envoltura dañadas por oxidación

Los residuos de aminoácidos que contienen azufre en su composición, tales como cisteínas y metioninas son particularmente vulnerables a la oxidación por EROs (Stadtman y col. 2003; Arts y col. 2015) y al daño generado por metales activos-redox como el cobre (Hiniker y col. 2005). El primer producto de la oxidación de los residuos de cisteínas expuestos a las EROs es el ácido sulfénico (-SOH). Los ácidos sulfénicos son intermediarios muy reactivos que, a menos que estén estabilizados dentro del microambiente proteico, reaccionan con otra cisteína presente en la vecindad para formar un puente disulfuro o pueden continuar su oxidación a las formas irreversibles de ácido sulfínico (-SO₂H) y ácido sulfónico (-SO₃H) (Arts y col. 2015). Para el caso de los residuos de metionina, la oxidación genera sulfóxidos de metionina (Met-O). Si no se reparan, la formación de Met-O y ácido sulfénico puede llevar a la inactivación proteica, al mal plegamiento e incluso a la degradación (Davies 2005; Arts y col. 2015). Para prevenir estos efectos deletéreos, los organismos están equipados con enzimas que reparan los residuos de metioninas y cisteínas oxidados. Por ejemplo, las proteínas de la superfamilia de las tiorredoxinas, como DsbG y DsbC, pueden reaccionar directamente con ácido sulfénico o reducir el enlace disulfuro resultante de su reacción con otro residuo de cisteína (Denoncin y col. 2014; Chatelle y col. 2015; Arts y col. 2015). En cuanto a los sulfóxidos de metionina, pueden convertirse nuevamente en metioninas por enzimas conocidas como metionina sulfóxido reductasas (Msrs). Los mecanismos de reparación de estas proteínas fueron inicialmente descritos y caracterizados en el citoplasma, aunque recientemente se identificaron en la envoltura celular

bacteriana, lo que destaca nuevamente el rol de los sistemas de reparación de residuos oxidados en el periplasma bacteriano.

8.3. Reparación de residuos de cisteínas oxidados

La mayoría de los residuos de cisteínas presentes en proteínas periplasmáticas están formando puentes disulfuro, que de hecho los protege de la oxidación no deseada. Sin embargo, también existen proteínas que contienen residuos de cisteínas que permanecen en un estado reducido *in vivo* (Dutton y col. 2008). Debido a que estos residuos no están formando enlaces disulfuro, dichas cisteínas son vulnerables a la oxidación y pueden ser dañadas por las EROs presentes en el periplasma mediante la formación de ácido sulfénico. A través del uso de sondas biotiniladas que específicamente reaccionan con ácidos sulfénicos y los modifican covalentemente, se identificaron varias proteínas periplasmáticas de *E. coli* sulfeniladas (Depuydt y col. 2009). Una de estas proteínas es YbiS, una L, D-transpeptidasa que cataliza la unión covalente de la lipoproteína Lpp (la proteína más abundante de *E. coli*) al peptidoglicano. YbiS contiene un único residuo de cisteína requerido para la actividad catalítica de esta enzima (Depuydt y col. 2009). Así, la oxidación de este residuo inactiva a YbiS, perjudicando la unión de Lpp al peptidoglicano. Es por esto que YbiS y otras proteínas periplasmáticas, cuya actividad también depende de sus residuos de cisteínas en estado reducido, requieren de los sistemas reductores que controlan el estado redox de estas proteínas en el ambiente oxidante del periplasma. La proteína clave en este sistema es DsbG (ver Figura 8), que comparte 26 % de identidad con la isomerasa de puentes disulfuro DsbC (Heras y col. 2004). Al igual que DsbC, DsbG es una proteína homodimérica con forma de V con un plegamiento de tiorredoxina y un motivo catalítico CXXC que es mantenido en estado reducido por la proteína de membrana interna DsbD (Heras y col. 2004).

El rol de DsbC como isomerasa de puentes disulfuro está bien establecido (Ren y col. 2014). Las proteínas que contienen disulfuros no consecutivos no se pliegan correctamente en una mutante $\Delta dsbC$, y DsbC cataliza eficazmente la isomerización de puentes disulfuro en proteínas heterólogas con múltiples

disulfuros, tales como el inhibidor de la tripsina pancreática de origen bovino o la RNasa A (Hiniker y Bardwell 2004). Asimismo, una mutante $\Delta dsbC$ en *E. coli* es más sensible a cobre respecto de la cepa silvestre (Hiniker y col. 2005). Por otra parte, teniendo la superficie interna de su hendidura surcada con residuos hidrofóbicos (Metcalf y col. 2000). DsbC parece estar diseñada para interactuar con proteínas mal plegadas que presentan enlaces disulfuro no nativos. Con el fin de identificar nuevos sustratos de DsbC, recientemente se expresó una variante DsbC en la cual el motivo CXXC fue reemplazado por CXXS (DsbC_{CXXS}) (Denoncin y col. 2014). En las isomerasas y reductasas de la superfamilia de tiorredoxinas, la primera cisteína del motivo CXXC ejecuta un ataque nucleofílico sobre el sustrato oxidado; es decir, sobre el disulfuro que se va a reducir. Como resultado, se forma un disulfuro mixto con un residuo de cisteína del sustrato. Posteriormente, el otro residuo de cisteína del sitio activo, la segunda cisteína, ataca este disulfuro mixto en orden de liberar al sustrato y formar el disulfuro en el sitio activo (Los y col. 2003; Arts y col. 2015). Al mutar el segundo residuo de cisteína, como en DsbC_{CXXS}, se estabiliza el disulfuro mixto, permitiendo la captura de la proteína de tipo tiorredoxina con su sustrato. Utilizando este enfoque, se encontró un sustrato particularmente abundante de DsbC, la proteína soluble AraF, cuya función es unir L-arabinosa en el periplasma para suministrarla al complejo de membrana interna AraH-AraG, por el cual se importa la arabinosa al citoplasma (Denoncin y col. 2014). Inesperadamente, para ser un sustrato de DsbC, AraF posee un único residuo de cisteína, altamente conservado entre las bacterias, lo que sugiere que no interactúa con DsbC para su isomerización. Al usar dimedona, un reactivo específico para ácido sulfénico, la única cisteína de AraF fue sensible a la oxidación, formando un ácido sulfénico tanto *in vitro* como *in vivo* (Denoncin y col. 2014). Es más, la exposición de la proteína a condiciones de estrés oxidativo llevó a la formación *in vivo* de un homodímero unido a disulfuro, probablemente resultado de la reacción entre el ácido sulfénico de una proteína AraF y el grupo tiol de una segunda AraF. Este dímero se acumuló en cepas mutantes $\Delta dsbC$, confirmando que DsbC está involucrada en la regulación del estado reducido de AraF (Denoncin y col. 2014). Como la formación del dímero en condiciones de estrés oxidativo previene la unión a arabinosa por parte de AraF, entonces DsbC rescata a AraF de su inactivación. AraF parece ser un sustrato específico de DsbC, ya que al menos *in vitro*, DsbG parece ser ineficiente en reducir

el dímero de AraF unido a disulfuro (Denoncin y col. 2014). Estos resultados indican que DsbC coopera con DsbG en los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo en la envoltura celular bacteriana. El carácter hidrofóbico de la superficie interna de DsbC sugiere que esta proteína está implicada en la protección de proteínas cuya oxidación se correlaciona con cambios conformacionales mayores y/o desplegamiento parcial. Este es probablemente el caso de AraF, una proteína altamente flexible, en la que el residuo de cisteína está inmerso cerca del sitio de unión a L-arabinosa y por lo tanto, poco accesible. Por el contrario, DsbG, cuya hendidura es más grande y más hidrofílica, parece estar mejor diseñada para reaccionar con proteínas globulares que presentan residuos de cisteína catalíticos oxidados más expuestos, como es el caso de YbiS (Arts y col. 2015).

8.4. Reparación de los residuos de metionina oxidados

Al igual que las cisteínas, los residuos de metionina también se oxidan rápidamente cuando están expuestos a EROs, formando sulfóxidos de metionina (Met-O). En los organismos, la generación de Met-O puede ser revertida por la acción de las Msrs.

La oxidación de un residuo de metionina hace que este aminoácido hidrofóbico sea más hidrofílico, lo que puede alterar las propiedades bioquímicas y estructurales de una proteína y potencialmente causar una pérdida de función biológica. Es importante notar que en algunas ocasiones, la oxidación de metioninas no necesariamente lleva a la inactivación proteica. Se ha propuesto que la oxidación de ciertos residuos de metionina expuestos al solvente, serviría como un mecanismo antioxidante endógeno que previene la oxidación de otros residuos que son importantes para la actividad proteica (Arts y col. 2015).

En *E. coli* se describieron tres Msrs citoplasmáticas (MsrA, MsrB y MsrC) (Lin y col. 2007; Boschi-Muller y col. 2008), que reducen las especies de Met-O en el citosol. No comparten ni homología de secuencia ni estructural. Sin embargo, poseen un mecanismo catalítico similar que involucra un residuo de cisteína y en la mayoría de las células, las Msrs son recicladas al estado reducido por el sistema de tiorredoxina (Arts y col. 2015).

Mientras las Msrs citoplasmáticas han sido extensamente estudiadas, sus contrapartes extracitoplasmáticas han sido identificadas y caracterizadas únicamente en algunas bacterias. La primera Msr funcional en la envoltura celular bacteriana es la proteína PilB de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis* (Skaar y col. 2002; Wu y col. 2005). *Streptococcus pneumoniae* expresa la proteína de fusión SpMsrAB2, que está expuesta a la superficie y anclada a la membrana citoplasmática por un segmento transmembrana (Saleh y col. 2013). SpMsrAB2 se expresa desde un operón con una proteína de tipo tiorredoxina (Etrx1) y con CcdA1, proteína que pertenece a la familia de DsbD. Una segunda proteína de tipo tiorredoxina (Etrx2), con homología a Etrx1, se expresa en otro operón junto con un segundo homólogo a DsbD (CcdA2) (Saleh y col. 2013). La delección de *SpmsrAB2* causa hipersensibilidad a H₂O₂ exógeno y atenúa la virulencia y la dispersión del neumococo desde la nasofaringe a los pulmones y la sangre (Saleh y col. 2013).

Recientemente Gennaris y col., reportaron un tercer sistema de reducción de Met-O extracitoplasmático; se trata de las proteínas YedY y YedZ, que fueron renombradas como MsrP (de periplasma) y MsrQ (de quinona), respectivamente (Gennaris y col. 2015). Un sustrato del sistema MsrPQes la chaperona SurA, que ayuda al correcto plegamiento proteico, revelando un aspecto adicional en la compleja vía de control de calidad periplasmático (Gennaris y col. 2015).

I.9. El sistema Scs

Además de las vías de reducción de cisteínas y metioninas oxidadas recién detalladas, en el genoma de *Salmonella enterica* están codificados los genes *scsABCD*. Estos genes se identificaron y caracterizaron por primera vez en el año 1997 por el grupo de Gupta y colaboradores, que aislaron tres clones distintos de una biblioteca genómica de *Salmonella* Typhimurium capaces de revertir el fenotipo de sensibilidad a cobre de una mutante en *cutF* (también llamado *nlpE*) de *E. coli* (Gupta y col. 1997). En este trabajo se presentó la caracterización de un supresor, el locus supresor de la sensibilidad a cobre *scs* (del inglés suppression of copper sensitivity), a partir de uno de los clones aislados. Dicho locus está conformado por cuatro marcos abiertos de lectura que codifican para cuatro proteínas, denominadas ScsA,

ScsB, ScsC y ScsD. Demostraron que la expresión de Scs revierte el fenotipo de sensibilidad a cobre de las mutantes en los genes *cutF*, *cutC*, *cutE* (*Int*) y *cutA* de *E. coli*, y confiere tolerancia a cobre a una mutante de *E. coli* defectiva en la lipoproteína diacilglicerol transferasa (mutante en *lgt*). La lipoproteína Lgt actúa sobre el residuo de cisteína presente en el *lipobox* de las pre-lipoproteínas, adicionando un grupo de diacilglicerol para el anclaje de la proteína madura en la membrana. Se propuso que la restauración de la modificación de las lipoproteínas en la mutante *lgt* de *E. coli* por las proteínas Scs puede ser debido a que participan en la homeostasis de cobre, previniendo así tanto la unión de cobre a las cisteínas de las pre-lipoproteínas como la oxidación de estos residuos (Gupta y col. 1997). En los genomas de *Salmonella* Typhimurium y Typhi, los genes *scsABCD* están entre los genes *cbpA* (codifica para una proteína de unión a ADN curvado) y *agp* (codifica para una fosfatasa de glucosa). En contraste, *E. coli* K-12 y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como así también otros organismos relacionados, carecen de los genes *scs*, o contienen sólo algún homólogo a estos genes (Cho y col. 2012; Anwar y col. 2013).

ScsA es probablemente una proteína integral de la membrana interna y hasta la fecha no se han identificado homólogos. Contiene un motivo putativo de unión a cobre (H-X-X-M-X-X-M) y una secuencia característica de las peroxidasas, T₂₃AQR MAGLHAL₃₃ (Gupta y col. 1997). Cada una de las cuatro proteínas contiene al menos un motivo C-X-X-C característico de la superfamilia de las tiorredoxinas (Gupta y col. 1997). El gen *scsB* está localizado a 48 pb corriente abajo de *scsA*, y codifica para una proteína de 627 aminoácidos, predicha como una proteína integral de membrana con ocho segmentos transmembrana y con un 26 % de identidad con DsbD (o DipZ) de *Salmonella* Typhimurium. Recientemente se ha estudiado en detalle un homólogo a ScsB presente en *Caulobacter crescentus* (*CcScsB*) que comparte un 34% de identidad con ScsB de *Salmonella* Typhimurium (*StScsB*) (Cho y col. 2012). Se reportó que *CcScsB* forma parte de una nueva familia de transportadores de electrones de membrana, es decir, una nueva subclase de proteínas del tipo DsbD, cuyos miembros se encuentran en algunas proteobacterias y *Chlamydia* (Cho y col. 2012). *CcScsB* tiene dominios similares a los de DsbD, pero difiere en el dominio N-terminal periplasmático α (ver Figura 9). En DsbD, este dominio interactúa con sus sustratos para reducirlos, sugiriendo que ScsB presenta

una matriz diferente de sustratos (Cho y col. 2012). Se determinó que CcScsB transfiere electrones a una proteína de tipo tiorredoxina TlpA, que reduce a una peroxidasa (peroxirredoxina tipo Q), PprX, la primera peroxirredoxina identificada en la envoltura celular (Cho y col. 2012). CcScsB también reduce a una proteína de tipo peroxirredoxina 1 (PrxL), cuya función aún no se conoce, y a una nueva proteína, la isomerasa de enlaces disulfuro ScsC de *Caulobacter crescentus* (CcScsC), que posee un 24 % de identidad con ScsC de *Salmonella Typhimurium*. Así, las proteínas CcScsB y CcScsC formarían el par redox similar al sistema DsbD/DsbC. En *C. crescentus*, *scsB* no se encuentra en la vecindad de los demás genes *scs* ni tampoco está flanqueado entre los genes *cbpA-agp*. Además *C. crescentus* carece de los otros miembros de la vía de reducción de la envoltura celular, como DsbD y CcdA; sólo posee a ScsB.

Shepherd y colaboradores, describieron las características bioquímicas y estructurales de ScsC de *Salmonella Typhimurium* y concluyeron que StScsC es una nueva disulfuro oxidoreductasa involucrada en la protección contra la toxicidad del cobre (Shepherd y col. 2013). Sus resultados indican que StScsC es una proteína periplasmática soluble. La estructura cristalina reveló que ScsC tiene un plegamiento similar a la proteína DsbA, formadora de puentes disulfuro en el periplasma, aunque la topología de las hélices α y láminas β difieren en los dominios tiorredoxinas de estas dos proteínas (Shepherd y col. 2013). El potencial de reducción del sitio activo CXXC en StScsC es de -132 mV (Shepherd y col. 2013), similar al exhibido por las disulfuro isomerasas (Tabla 1). Como ya se ha mencionado, la primera de las dos cisteínas en el motivo CXXC de las proteínas de tipo tiorredoxinas es la cisteína nucleofílica reactiva expuesta al solvente. Esta reactividad se debe en parte a un menor pK_a (~3,5-5) en comparación con la mayoría de las cisteínas (~8,5) (Nelson y Creighton 1994). El pK_a de StScsC se midió como 3,4, un valor muy bajo, típico de las cisteínas nucleofílicas encontradas en las proteínas de tipo DsbA [$pK_a = 3,5$ (Nelson y Creighton 1994); Tabla1] (Shepherd y col. 2013). Entonces, StScsC tiene propiedades estructurales intermedias entre las tiol oxidasas de tipo DsbA y las disulfuro isomerasas. Es más, se han identificado dos homólogos estructurales de StScsC, BdbD (oxidoreductasa de tipo DsbA) de *B. subtilis* y a la isomerasa/reductasa DsbG de *E. coli* (Shepherd y col. 2013).

En *C. crescentus* CcScsC cataliza el plegamiento de proteínas con múltiples cisteínas mediante un mecanismo de isomerización. Las diferencias más notables entre StScsC y CcScsC incluyen un motivo catalítico diferente (CPYC vs. CGYC), la ausencia de una región N-terminal extendida en StScsC (que parece mediar la dimerización de CcScsC) y una delección de treinta residuos corriente arriba del residuo *cis*-Prolina¹⁵⁷ conservado en estas proteínas de tipo tiorredoxinas (Shepherd y col. 2013).

StScsC y EcDsbG poseen sitios activos idénticos, CPYC. Sin embargo, StScsC no forma dímeros, a diferencia de EcDsbG, EcDsbG y CcScsC que contienen un dominio N-terminal extendido clave para la dimerización (Metcalf y col. 2000; Heras y col. 2004; Cho y col. 2012). En contraste, StScsC posee un dominio más corto y esta proteína se purificó como monómero (Shepherd y col. 2013), por lo que su estructura no sería homodimérica con forma de V, como la de las isomerasas identificadas hasta el momento.

Debido a las similitudes de StScsC tanto con las oxidasas como con las disulfuro isomerasas, Shepherd y colaboradores evaluaron la capacidad de StScsC de reducir la insulina *in vitro*, una actividad común para las oxidoreductasas de la vía oxidativa como DsbA (Bardwell y col. 1991), observándose que StScsC y EcDsbA reducen la insulina de manera similar. StScsC no mostró tener actividad isomerasa cuando se evaluó su capacidad de isomerización de puentes disulfuro en sustratos como RNasa I, a diferencia de su ortólogo CcScsC que sí fue capaz de catalizar la isomerización de dicho sustrato (Shepherd y col. 2013). Esto sugiere que puede haber diversidad funcional entre los miembros de la familia de proteínas ScsC.

Proteína	Motivo	Potencial redox (mV)	pK _a de la Cys activa
Tiorredoxina 1 <i>E. coli</i>	CGPC	-284	7,1
Tiorredoxina 2 <i>E. coli</i>	CGPC	-221	5,1
Glutarredoxina 1 <i>E. coli</i>	CPYC	-233	N.D
Glutarredoxina 3 <i>E. coli</i>	CPYC	-198	< 5,5
SrgA <i>Salmonella Typhimurim</i>	CPPC	-154	4,7
ScsC <i>S. Typhimurium</i>	CPYC	-132	3,4
DsbG <i>E. coli</i>	CPYC	-129 -126	3,5
DsbA <i>S. Typhimurium</i>	CPHC	-126	3,3
PDI <i>Homo sapiens</i>	CGHC	-110	4,5
DsbA <i>E. coli</i>	CPHC	-124 -125	3,5
DsbL <i>S. Typhimurium</i>	CPFC	-97	3,8
DsbC <i>E. coli</i>	CGYC	-130	4,3
BdbD <i>Bacillus subtilis</i>	CPSC	-75	< 4,5

Tabla 1. Potenciales redox y valores de pK_a de algunas proteínas de tipo tiorredoxinas. Adaptado de (Shepherd y col. 2013).

El Cu(II) puede conducir la oxidación de tioles, formando puentes disulfuro incorrectos (Hiniker y col. 2005). *StScsC* es requerida para la protección contra el estrés por cobre, ya que una mutante $\Delta scsC$ presenta mayor sensibilidad a cobre exógeno (CuSO₄) en comparación a una cepa silvestre de *Salmonella Typhimurium*, lo que sugiere que *StScsC* es parte de un sistema dedicado a proteger a las proteínas periplasmáticas contra la formación de puentes disulfuro no nativos inducidos por el cobre (Shepherd y col. 2013). Si bien el mecanismo de acción no se conoce, debido a que no forma dímeros como el resto de las disulfuro isomerasas, *StScsC* podría actuar como disulfuro reductasa ya que se encuentra presente fundamentalmente en estado reducido en las células bacterianas (Shepherd y col. 2013).

Por su parte, el último gen del locus *scs*, *scsD*, codifica para una proteína de localización periplásmica anclada a la membrana interna, con similitudes a las

proteínas de tipo tiorredoxinas como TlpA de *Bradyrhizobium japonicum* o *Neisseria gonorrhoeae* (Gupta y col. 1997). TlpA participa en la defensa contra el estrés oxidativo en el patógeno *N. gonorrhoeae* (Achard y col. 2009). Esto sugiere una conexión entre el sistema de envoltura Scs y la protección contra el estrés oxidativo en dicho compartimento de *Salmonella Typhimurium*.

Durante el transcurso de esta Tesis, Anwar y colaboradores, evaluaron la contribución de los genes *scs* a la tolerancia de cobre, y su rol en estrés oxidativo y la virulencia de *Salmonella Typhimurium*. Observaron que mientras que la mutante $\Delta scsA$ no mostró sensibilidad incrementada a $CuCl_2$, deleciones en *scsB*, *scsC* o *scsD* provocaron un incremento moderado de la sensibilidad al metal. La mutante cuádruple $\Delta scsABCD$ mostró una sensibilidad similar a las mutantes individuales $\Delta scsB$, $\Delta scsC$ y $\Delta scsD$, sugiriendo que los genes *scsBCD* constituyen un sistema común responsable de la tolerancia de cobre en *S. Typhimurium* (Anwar y col. 2013). Asimismo, no observaron un incremento en la sensibilidad a H_2O_2 en las mutantes individuales $\Delta scsB$, $\Delta scsC$ y $\Delta scsD$ ni tampoco en la mutante del locus completo $\Delta scsABCD$, a diferencia de lo que ocurre con la mutante $\Delta scsA$, que mostró una sensibilidad incrementada a esta especie oxidante (Anwar y col. 2013). Se detectó una mayor acumulación de proteínas periplásmicas carboniladas en la mutante $\Delta scsABCD$ de *S. Typhimurium* expuesta a H_2O_2 , indicando que Scs está involucrado en el balance del estrés oxidativo en el periplasma de *S. Typhimurium* (Anwar y col. 2013). Por otra parte determinaron que *scsABCD* y *trxA* contribuyen a la tolerancia a cobre a través de una vía común. La tiorredoxina citoplasmática TrxA aporta el poder reductor a la proteína de membrana DsbD, y debido a que ScsB y DsbD son homólogas, existiría una conexión entre el sistema ScsABCD y TrxA en relación a la tolerancia de cobre (Anwar y col. 2013).

Rol de los genes *scsABCD* en la invasividad y virulencia de *Salmonella Typhimurium*

Se observó que la invasividad de *S. Typhimurium* en cultivos celulares de mamíferos, depende de *trxA* (Bjur y col. 2006), y debido a que TrxA y ScsABCD contribuyen a la resistencia a cobre, se evaluó cómo se afecta la invasividad en las mutantes $\Delta trxA$ y $\Delta scsABCD$ y si el cobre tiene un efecto sobre la invasión (Anwar y col. 2013). La presencia de cobre inhibió la invasión de la cepa silvestre de *S.*

S. Typhimurium a células epiteliales, mientras que en las mismas condiciones la invasión se vio incrementada en las mutantes $\Delta trxA$, $\Delta scsABCD$ y $\Delta scsABCD \Delta trxA$. Estos resultados mostraron que la invasividad de *S. Typhimurium* está fuertemente inhibida por el cobre, y que esta atenuación química dependería de la oxidoreductasas TrxA y ScsABCD.

Por otro lado, en modelos de infección de *C. elegans* alimentados con *S. Typhimurium* se observó que la vida de estos nematodos se acorta de manera significativa, ya que los mismos manifiestan una respuesta de estrés oxidativo hipodérmico entre las 36-48 horas después de la infección. Los nematodos alimentados con un mutante $\Delta trxA$ de *S. Typhimurium* carecen de esta respuesta oxidativa, por lo que su sobrevivencia se extiende (Sem y col. 2012), a diferencia de los infectados con $\Delta scsABCD$ que se comportaron como nematodos infectados con la cepa silvestre. Sin embargo, la delección de *scsABCD* sobre la mutante $\Delta trxA$ dio como resultado una recuperación en la virulencia (reducción en el tiempo de vida del nematodo), acompañada con una restauración de la respuesta oxidativa, similar a los de la cepa silvestre (Anwar y col. 2013). En este modelo de infección, *scsABCD* nuevamente afectó el fenotipo de $\Delta trxA$, sugiriendo que $\Delta scsABCD$ suprimiría tanto la atenuación de la virulencia que presenta la cepa $\Delta trxA$ como así también la menor invasividad de *trxA* en células epiteliales (Anwar y col. 2013).

Rol de los genes *scs* en la replicación incrementada de *S. Typhimurium* en respuesta a estrés

El ganado porcino es uno de los principales reservorios de *S. Typhimurium* (Boyen y col. 2008). Estas infecciones frecuentemente resultan en el desarrollo de cerdos portadores que excretan *Salmonella* en muy bajo número, de manera intermitente. Durante períodos de estrés, tales como el transporte al matadero o la etapa de retirada del pienso, puede ocurrir la recrudescencia de *Salmonella* lo que resulta en la contaminación de las carcasas porcinas (Verbrugge y col. 2012). Recientemente, se reportó que el cortisol cumple un rol importante en el incremento de la proliferación de *Salmonella* dentro de los macrófagos, resultando en un aumento de la carga del patógeno en los intestinos y facilitando la dispersión del mismo (Verbrugge y col. 2012). Asimismo, se demostró que una inyección intramuscular de dexametasona puede reproducir la dispersión de *Salmonella*

Typhimurium. En el año 2016 se publicó un trabajo en el cual se buscaron los genes responsables de la incrementada sobrevivencia de *Salmonella* inducida por cortisol y en el cual se encontró que *scsA* es clave en la recrudescencia de *Salmonella* inducida por glucocorticoides dentro de los macrófagos del hospedador (Verbrugghe y col. 2016). La delección de *scsA* elimina el incremento de la proliferación inducida por cortisol, tanto en macrófagos murinos como porcinos, y dicho efecto fue restablecido cuando se complementó con *scsA*. Se concluyó que *scsA* media la expresión inducida por cortisol, directa o indirectamente, de varios sistemas que son indispensables para la sobrevivencia intramacrófago (Verbrugghe y col. 2016). Por otra parte, se mostró que *scsA* tienen un impacto en la expresión de genes de *Salmonella* involucrados en la modificación del citoesqueleto del hospedador (*sipC*) y en la formación de filamentos inducidos por *Salmonella* contenida en su vacuola (*pipB*) (Verbrugghe y col. 2016).

En este mismo trabajo se optimizó un modelo de ratón para imitar las condiciones de estrés y así evaluar el rol de *scsA* durante la respuesta a glucocorticoides de *Salmonella in vivo* (Verbrugghe y col. 2016). Usando este modelo, se demostró que *scsA* es requerido para el incremento en la carga de *Salmonella* inducida por glucocorticoide en el ciego de los ratones (Verbrugghe y col. 2016). Este efecto no fue significativo en otros órganos, como bazo e hígado, sugiriendo que la recuperación incrementada de *Salmonella* dependiente de *scsA* es específica de tejido y se limita al tracto intestinal (Verbrugghe y col. 2016).

I.10. Respuesta a estrés de envoltura. Monitoreo de la envoltura celular bacteriana

10.1. Sistemas regulatorios de dos componentes

La vida en el mundo microbiano está caracterizada por una continua interacción entre las células bacterianas y el ambiente (Mascher y col. 2006). Debido a la organización unicelular de los procariotas, los cambios ambientales, sean bióticos o abióticos, son rápidos y dramáticos, mientras que los eucariotas pueden amortiguarlos debido a su organización multicelular (Krell y col. 2010). Sin

embargo, las bacterias son organismos muy adaptables, capaces de crecer en diversas fuentes de carbono y nitrógeno y de ocupar una gran variedad de nichos ecológicos. La clave para la adaptabilidad de estos microorganismos es su capacidad de expresar sólo aquellos genes que codifican para las enzimas y vías que necesitan para un óptimo crecimiento en el nicho en el que se encuentran (Hoch y Varughese 2001).

Los sistemas de transducción de señales funcionan como vías intracelulares de procesamiento de la información, que unen el estímulo externo a una respuesta adaptativa específica. La forma predominante de transducción de la señal utilizada por las bacterias para responder a las condiciones ambientales son los sistemas denominados de dos componentes (TCS) (West y Stock 2001; Casino y col. 2010; Hoch y Varughese 2001; Mascher y col. 2006; Krell y col. 2010). Los TCS son sistemas de reconocimiento y transducción de la señal, que permiten a un microorganismo procesar y responder a cambios metabólicos o ambientales rápidamente (Perego y Hoch 1996). Estos sistemas funcionan utilizando la fosforilación reversible de proteínas como estrategia de señalización.

Los TCS están ampliamente distribuidos, aunque no de manera ubicua, en bacterias Gram(+) y Gram(-) y en arqueas. Estos sistemas están presentes también en hongos, levaduras, plantas y en la ameba *Dictyostelium*, pero hasta el momento no han sido identificadas proteínas pertenecientes a la familia de los TCS en animales, y no están codificadas en los genomas de los humanos, moscas o gusanos (Robinson y col. 2000).

El esquema básico de los TCS se estructura alrededor de dos proteínas conservadas: una proteína histidina quinasa (HQ) y una proteína reguladora de la respuesta (RR). Además de los dominios conservados, las HQ y los RR típicamente contienen dominios variables específicos para el sistema en el que funcionan. Las HQ son generalmente proteínas transmembrana que funcionan como sensores, con dominios extracelulares variables involucrados en reconocerlos diferentes estímulos. Por su parte, los RR son usualmente proteínas multidominio con dominios efectores variables que provocan una respuesta (Mitrophanov y Groisman 2008).

Cuando el estímulo o señal es detectado por el dominio de reconocimiento de la proteína sensora HQ, se cataliza la autofosforilación dependiente de ATP de un residuo de histidina (His) conservado en el dominio de dimerización de la HQ, produciendo un enlace fosforilo de alta energía (His-P). La HQ fosforilada es reconocida por un RR específico, y el dominio regulatorio conservado de éste cataliza la fosfotransferencia desde His-P en la HQ a un residuo aspártico (Asp) conservado en el RR, creando un enlace acil-fosfato de alta energía (Asp-P) (Perego y Hoch 1996). Normalmente, los dominios regulatorios inhiben los dominios efectores del RR, y la fosforilación del residuo Asp-P libera esta inhibición, permitiendo que el dominio efector ejerza su respuesta (J. a Hoch 2000). Entonces, la respuesta del sistema es determinada por los niveles de RR fosforilado (West y Stock 2001; Robinson y col. 2000).

Existen diversos mecanismos que regulan los niveles de RR fosforilado. Los RR pueden poseer una actividad auto-fosfatasa que limita el tiempo de vida de su estado fosforilado. Esta actividad difiere sustancialmente en diferentes RR. En algunos sistemas, existen fosfatasas auxiliares o proteínas que refuerzan la actividad fosfatasa del RR, acelerando su defosforilación. Muchas HQ, además de la actividad de quinasa, también poseen actividad fosfatasa. Ambas actividades pueden ser reguladas directamente por el estímulo (en el caso de las HQ transmembrana) o indirectamente por la interacción con proteínas auxiliares (en el caso de las HQ citoplasmáticas).

10.2. El sistema de dos componentes de respuesta a estrés de envoltura Cpx

El sistema de dos componentes Cpx pertenece al grupo de los llamados sistemas de respuesta a estrés de envoltura, que incluye a σE , Rcs, Psp y Bae que se superponen ligeramente respecto a los estímulos detectados y a la composición del regulón (Bury-Moné y col. 2009). Cpx está compuesto por CpxA, la HQ sensora y CpxR, el RR citoplasmático (Dong y col. 1993). Si bien no se ha identificado la naturaleza de la señal o las señales detectadas por CpxA, sí se conoce una amplia variedad de estímulos que conducen a la activación de la respuesta del regulón Cpx,

tales como el pH neutro a alcalino, alta osmolaridad, la adhesión a superficies, ciertas hormonas, la sobre-expresión de proteínas incorrectamente plegadas, alteraciones en la membrana y/o en la síntesis del antígeno común de enterobacterias, interrupciones en los enlaces disulfuro en el periplasma, cobre, EDTA, n-butanol, indol, entre otros (Raivio 2014). La amplia naturaleza de las señales recién mencionadas hace que sea difícil concluir con respecto a la naturaleza molecular de la señal reconocida por el sistema Cpx. En general, se postula que las proteínas incorrectamente plegadas son el componente de la señal de la respuesta al estrés de envoltura (Jones y col. 1997).

La evidencia acumulada hasta el presente indica que CpxR controla la expresión de más de 50 genes en *E. coli* (Raivio 2014). Los primeros miembros descritos del regulón Cpx codifican para proteínas involucradas en el plegamiento o la degradación de proteínas en la envoltura celular como *degP*, que codifica para una serina endoproteasa periplasmática; *dsbA*, para una oxidoreductasa formadora de puentes disulfuros; y *ppiA*, para una peptidil isomerasa periplasmática (Pogliano y col. 1997; Danese y Silhavy 1997). Posteriormente, otros estudios condujeron a la identificación de otros miembros del regulón que pueden ser activados o reprimidos por el sistema CpxR/CpxA y que están involucrados en una amplia variedad de funciones celulares, incluyendo motilidad y quimiotaxis (*motAB-cheAW*, *tsr*, y *aer*, pilus y flagelo), translocación de proteínas (*secA*), virulencia (*mviM*), adhesión (operón *pap*, *csgBAC* y *csgDEFG*), biosíntesis de aminoácidos (*aroG* y *aroK*) o fosfolípidos (*psd*), metabolismo del ADN (*ung*), metabolismo de la pared celular (*amiA*, *amiC*), almacenamiento y acumulación de Fe (*efeU* y *ftnB*), entre otras (Cao y col. 2007; De Wulf y col. 1999; De Wulf y col. 2002; Yamamoto y Ishihama 2006).

La detección de las señales por parte de este sistema no se restringe únicamente al componente sensor, pudiendo involucrar incluso a diferentes dominios de la HQ, sino también al RR o proteínas accesorias (Buelow y Raivio 2010). En el caso del sistema Cpx de *E. coli*, al menos cuatro proteínas en diferentes compartimentos celulares participan en la detección de las diferentes señales (Figura 10): en la membrana externa, la lipoproteína de membrana externa NlpE; en el periplasma, la proteína CpxP; en la membrana interna, la histidina quinasa CpxA y finalmente en el citoplasma, el regulador de respuesta CpxR (Raivio 2014).

NlpE (*Nueva Lipoproteína E*) se identificó por primera vez como un supresor de la toxicidad de la proteína de fusión de la envoltura LamB-LacZ-PhoA, y su expresión está regulada por CpxR (Snyder y col. 1995; Danese y Silhavy 1997). En el año 2002, se demostró que NlpE activa el sistema Cpx en respuesta a la adhesión a superficies hidrofóbicas (Otto y Silhavy 2002). Además, la sobre-expresión de NlpE estimula la vía Cpx y puede utilizarse como una señal de activación específica del sistema (Snyder y col. 1995; Suntharalingam y col. 2003). El análisis de la estructura cristalina de NlpE reveló que es una lipoproteína con dos dominios, un dominio N-terminal barril- β que tiene similitud con la proteína lipocalina bacteriana Blc, que une lípidos a la cavidad formada por el barril- β (Campanacci y col. 2006), conectado a un dominio C-terminal barril- β con similitudes estructurales a las proteínas que contienen un plegamiento de unión a oligosacárido/oligonucleótico (Hirano y col. 2007). La presencia de estos plegamientos sugiere que cambios en lípidos y oligosacáridos producidos durante la adhesión celular podrían estar involucrados en instigar los cambios estructurales responsables de la detección de dicha adhesión a superficies (Hirano y col. 2007). Estos cambios implicarían una propensión del dominio N-terminal barril β a desplegarse. El desplazamiento de una de las láminas β podría llevar al desplegamiento y a un cambio en la orientación de los dominios N-terminal y C-terminal de NlpE, formando una estructura alargada capaz de interactuar con el dominio sensor de CpxA en la membrana interna (Hirano y col. 2007).

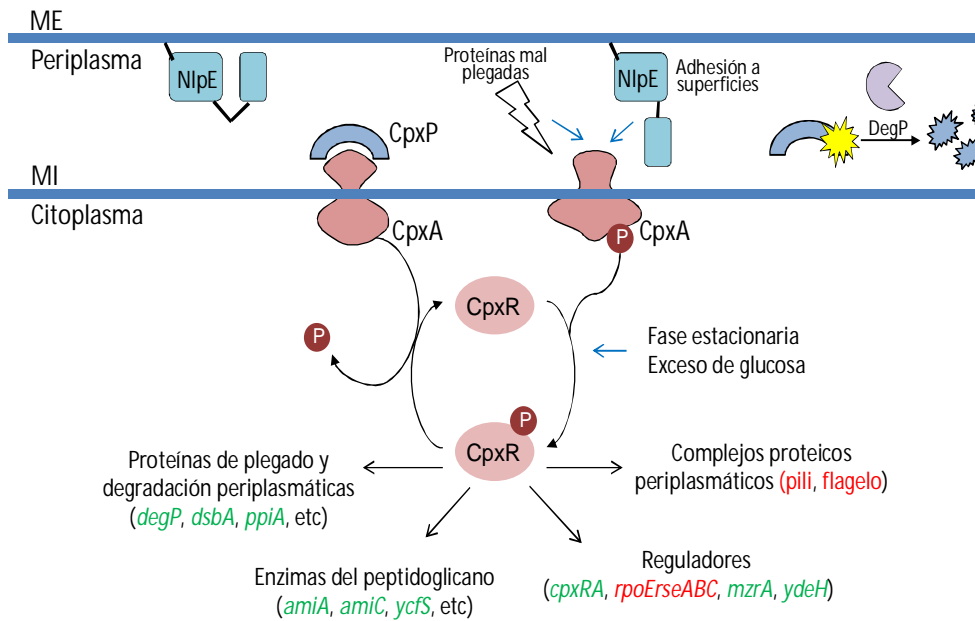


Figura 10. Descripción general de la vía de Cpx en *Escherichia coli*. En condiciones no inductoras (lado izquierdo del diagrama), la histidina quinasa de membrana interna (MI) CpxA actúa como una fosfatasa del regulador de respuesta CpxR, manteniéndolo desfosforilado y por lo tanto inactivo. CpxP inhibe la activación de CpxA, posiblemente a través de una interacción directa. Las señales inductoras entran en la vía en varios puntos (indicados por las flechas azules): la adhesión a la superficie es detectada por la lipoproteína de membrana externa (ME) NlpE; proteínas periplasmáticas mal plegadas pueden ser detectados directamente por CpxP; y señales metabólicas o fases de crecimiento son detectadas por CpxR. Bajo condiciones inductoras (lado derecho del diagrama), CpxP es degradada por DegP, CpxA actúa como un autoquinasa y fosforila a CpxR, que fosforilado se une al ADN para regular la transcripción. Los genes regulados positivamente por CpxR-P (indicado por el texto en verde) son los que codifican para proteínas plegado y degradación periplasmática; enzimas metabólicas de pared celular y algunos reguladores. Los genes reprimidos por CpxR-P (indicadas por el texto en rojo) incluyen los complejos proteicos del periplasma y reguladores. Adaptado de Vogt y Raivio, 2011.

Se demostró que las condiciones redox pueden influir en la formación de un enlace disulfuro en un motivo CXXC en el dominio N-terminal de NlpE, que a su vez se prevé impactaría en la rigidez del *loop* que lleva este motivo (Hirano y col.2007). Dado que la respuesta de regulón Cpx es inducida por el cobre y por las condiciones que afectan los puentes disulfuro de las proteínas de la envoltura, este hallazgo puede ser pertinente para integrar la señalización de ciertos tipos de estrés que alteran el estado redox de la envoltura. El motivo CXXC se encuentra además muy cerca de un motivo inhibidor de serina proteasa en NlpE, por lo que es posible que los eventos redox que implican estos residuos de cisteína también pudieran afectar la actividad del motivo inhibidor de proteasa y alterar los eventos proteolíticos en el periplasma (Hirano y col. 2007). Estos modelos no son concluyentes y esperan más estudios.

La proteína periplasmática CpxP inhibe la actividad de la vía Cpx cuando se sobre-expresa, probablemente por interacción directa con el dominio periplasmático de CpxA. La observación de que la presencia de proteínas mal plegadas en el periplasma activa el sistema Cpx de manera dependiente de CpxP ha llevado a proponer que las proteínas no nativas secuestran CpxP impidiendo su unión a CpxA y en consecuencia la quinasa se activa (DiGiuseppe y Silhavy 2003; Isaac y col. 2005). Sin embargo, el papel de CpxP en la señalización es poco conocido. De hecho, mutantes en *cpxP* conservan su capacidad de detectar señales tales como la sobre-expresión de NlpE, el pH alcalino y otros tipos de estrés (DiGiuseppe y Silhavy 2003; Raivio y col. 1999).

En los últimos años ha incrementado el énfasis en desentrañar la función de las proteínas accesorias en la señalización de los sistemas de dos componentes. Se demostró que una alta osmolaridad (NaCl) y las subunidades PapE del pilus mal plegadas, desplazan a CpxP de la quinasa sensora CpxA *in vivo* (Tschauner y col. 2014). En general, este estudio proporcionó evidencia de que CpxP modula la actividad del sistema Cpx mediante la interacción dinámica con CpxA en respuesta a ciertos tipos de estrés específicos (Tschauner y col. 2014).

Si bien el dominio periplasmático de la histidina quinasa CpxA actúa como sensor de algunas señales, es también el punto de integración de señales detectadas a través de NlpE y de CpxP (Raivio y col. 1999; Raivio y Silhavy 1997; DiGiuseppe y Silhavy 2003). El regulador CpxR también puede activarse independientemente de CpxA en respuesta a señales relacionadas con el crecimiento y el metabolismo central. Por ejemplo, en *E. coli* se ha reportado que la expresión de *cpxR* se induce al inicio de la fase estacionaria (De Wulf y col. 1999), y que esta activación depende de CpxR pero no de CpxA (DiGiuseppe y Silhavy 2003). CpxR también se puede activar de forma independiente de CpxA cuando las células se cultivan en presencia de un exceso de fuentes de carbono, tales como glucosa y piruvato (Wolfe y col. 2008). Se postula que esta inducción está mediada por la vía Pta-AckA, que genera acetil fosfato (AcPi) a partir de acetil-CoA (Wolfey col. 2008). De hecho, el acetil fosfato puede fosforilar CpxR *in vitro* y, bajo determinadas condiciones de crecimiento, *in vivo* (Pogliano y col. 1997; Raivio y Silhavy 1997; Wolfe y col. 2008; Lima y col. 2011).

In vivo, la fosforilación de CpxR de *E. coli* dependiente de AcPi se correlaciona, en parte, con la transcripción de *cpxP* (Danese y Silhavy 1997; Wolfe y col. 2008). Sin embargo, esta fosforilación dependiente de AcPi no es el único factor que contribuye a la transcripción *cpxP*; la eliminación de *ackA*, que conduce a un aumento de las concentraciones intracelulares de AcPi (Klein y col. 2007), bloquea la transcripción de *cpxP*, en lugar de incrementarla (Wolfe y col. 2008). Se propone que CpxR es fosforilado en un entorno silvestre durante el crecimiento en un medio rico en glucosa, lo que resulta en la activación de la transcripción de *cpxP*. Por el contrario, la acumulación de AcPi en una mutante *ackA* conduce a la acetilación de la Lys291 de la ARNP y a la inhibición de la transcripción de *cpxP* por parte de CpxR activado (CpxR~P) (Lima y col. 2016).

En resumen, la vía Cpx integra las señales mediante tres niveles distintos: (i) en el periplasma, CpxP integra el estímulo generado por las proteínas mal plegadas de la envoltura, (ii) a nivel de la membrana interna, el dominio periplasmático de CpxA integra la información en relación al estado de la chaperona periplasmática CpxP, a las señales de la lipoproteína NlpE, y a los estímulos que son independientes tanto de CpxP como de NlpE, (iii) finalmente, en el citoplasma, CpxR integra las señales dependiente de CpxA, con aquellas que son independientes de CpxA (como por ejemplo la transición a fase estacionaria y la exposición a un exceso de fuentes de carbono).

Caracterización de la región promotora de los genes del regulón Cpx

Dependiendo del gen blanco, CpxR puede actuar como activador o represor (Price y Raivio 2009). En un estudio comparativo se demostró que la orientación con respecto al sitio de inicio de la transcripción y el grado de consenso del sitio de unión para CpxR, previamente determinado como GTAAA-N₄₋₈-GTAAA (Yamamoto y Ishihama 2006), no influyen en la regulación (Price y Raivio 2009). Sin embargo, la ubicación del sitio de unión de CpxR, sí es importante (Price y Raivio 2009). La presencia de al menos un sitio de unión a CpxR dentro de 100 pb del sitio de inicio de la transcripción independientemente de la orientación se correlaciona positivamente con una fuerte regulación dependiente de CpxR/CpxA (Price y Raivio 2009). Los promotores de los genes que forman parte del regulón Cpx tienen sitios de unión a CpxR en ambas orientaciones por lo que no parece haber relación entre

la orientación y el modo en que CpxR ejerce su regulación. El grado de coincidencia con el sitio de unión consenso CpxR tampoco parece ser predictivo (Price y Raivio 2009).

En la mayoría de los casos, CpxR actúa en conjunto con otros reguladores para controlar la expresión de los genes. Se ha demostrado que para la expresión de los transportadores del tipo CBA, MdtA y AcrD, y para la porina OmpC, CpxR actúa como co-regulador (Batchelor y col. 2005; Hirakawa y col. 2005). En ausencia del regulador principal de *acrD* y *mdtA*, BaeR, o de *ompC*, OmpR, CpxR es incapaz de activar la transcripción de estos genes. Estos resultados indican que CpxR actúa en conjunto con el activador principal para intensificar la transcripción (Hirakawa y col. 2005).

Cpx y su vínculo con los metales

La respuesta del regulón Cpx al estrés de envoltura está relacionada a los metales (Guest y Raivio 2016). Los genes regulados por CpxR exhiben cambios en la transcripción en presencia de hierro, cobre y zinc y muchos de ellos tienen funciones demostradas, o se sospecha que están implicados en la adquisición, eflujo y/o almacenamiento de metales (Guest y Raivio 2016). En *E. coli*, se demostró que una mutante en el operón *cpxRA* ($\Delta cpxRA$) es más sensible a Cu y a Zn que la cepa silvestre (Yamamoto y Ishihama 2006). Además, estudios de transcriptómica en *E. coli* revelaron la activación de al menos 14 genes dependiente de CpxRA en presencia de Cu, *aroG*, *cpxP*, *ftnB*, *htrA*, *ppiA*, *spy*, *ybaJ*, *yccA*, *ycdN*, *ycfS*, *ydeH*, *yebE*, *yihE* e *yqjA*, la mayoría de función desconocida (Pogliano y col. 1997; Yamamoto y col. 2005; Yamamoto y Ishihama 2006). La observación de que en *E. coli* una mutante deficiente en NlpE es más sensible a Cu que la cepa silvestre y que el dominio N-terminal de NlpE contiene un motivo CXXC, característico de proteínas de unión a Cu, sugiere que esta proteína podría estar implicada en la activación del sistema Cpx en presencia de Cu (Gupta y col. 1995; Hirano y col. 2007; Robinson 2010). En relación a otros metales distintos al cobre, mediante análisis de transcriptómica global de *E. coli* en presencia de Zn se ha demostrado la inducción de *cpxP* como así también del sistema de eflujo *mdtABC*, que se encuentra modulado por el sistema CpxRA (Lee y col. 2005).

Finalmente, el efecto de los metales sobre la respuesta Cpx no se limita a *E. coli*, sino que impacta también a otras gama-proteobacterias. En *V. cholerae*, se mostró que el cobre induce la expresión del reportero *cpxP* (Slamti y Waldor 2009). Asimismo, en este patógeno, Cpx reconoce y media la adaptación a la disminución de hierro (Acosta y col. 2015). En *Salmonella* Typhimurim, genes pertenecientes al regulón Cpx, como *cpxP* y *ppiA*, se inducen en presencia de cobre tanto en medio mínimo como en medio rico (Pontel y col. 2014).

Cpx y su vínculo con la virulencia

El sistema de dos componentes CpxRA tiene efectos contrastantes en la patogénesis de diferentes especies bacterianas. Por ejemplo, la activación de CpxRA en *Shigella sonnei* resulta en una expresión incrementada de los genes de virulencia. Los patógenos de humanos, *Yersinia pestis* y *E. coli* uropatógena, requieren al sistema Cpx para su virulencia. Por el contrario, en *Haemophilus ducreyi* la activación del sistema CpxRA lleva a la regulación negativa de genes de virulencia conocidos en este patógeno. Asimismo, la activación constitutiva de la respuesta Cpx resulta en defectos en la virulencia *in vivo* y la delección de este sistema no tiene efectos sobre la infección. Estos estudios son consistentes con lo observado durante la infección con *Salmonella* Typhimurium y *Vibrio cholerae*. Así, la contribución del sistema Cpx *in vivo* sobre la virulencia parece variar entre los distintos géneros de enterobacterias (Thomassin y col. 2015).

Para evaluar la participación del sistema Cpx de *Salmonella* Typhimurium en la entrada y replicación dentro de células eucariotas, se hicieron ensayos de invasión y persistencia en macrófagos y en células epiteliales con mutantes $\Delta cpxR$, $\Delta cpxA$ y *cpxA*^{*}; esta última mantiene la activación del sistema de forma constitutiva (De Wulf y Lin 2000). Las mutantes $\Delta cpxR$ y $\Delta cpxA$ invadieron los macrófagos de igual forma que la cepa silvestre mientras que la cepa mutante *cpxA*^{*} fue significativamente menos invasiva. A las 24 horas post-infección, el número de bacterias intracelulares se incrementó, indicando que en ninguna de las mutaciones en el sistema Cpx se vio afectada la sobrevivencia o replicación intracelular (Humphreys y col. 2004). Los mismos estudios llevados a cabo con moléculas que previenen la internalización celular sugieren que es la adhesión a las células eucariotas y el ingreso a las mismas lo que está afectado principalmente en la mutante *cpxA*^{*}. Alternativamente,

mediante ensayos de competencia se evaluó la capacidad de las mutantes $\Delta cpxR$, $\Delta cpxA$ y $cpxA^*$ para competir con la cepa silvestre en el crecimiento en tejidos murinos. Nuevamente, la cepa $\Delta cpxR$ no se vio afectada respecto a la parental silvestre mientras que se evidenció una disminución significativa en el recuento para las mutantes $\Delta cpxA$ y $cpxA^*$, siendo esta última la más afectada (Humphreys y col. 2004).

Para investigar si las mutaciones en Cpx afectan la habilidad de *S. Typhimurium* de infectar ratones oralmente (vía natural de infección), se determinó el número de unidades formadoras de colonias (CFU), en diferentes tejidos post-infección. Nuevamente, no hubo diferencias significativas entre la cepa $\Delta cpxR$ y la parental silvestre pero ambas fueron más virulentas que la mutante $\Delta cpxA$ que a su vez fue más virulenta que la cepa $cpxA^*$ (Humphreys y col. 2004). Es esperable que la mutante $cpxA^*$ tenga un exceso de CpxR fosforilado (CpxR~P); por lo tanto, la virulencia pareciera correlacionarse inversamente con los niveles de CpxR~P. Si este es el caso, entonces CpxR~P estaría reduciendo la expresión de determinantes de la virulencia, consistente con el hecho que una de las funciones principales del sistema Cpx es reducir el flujo de proteínas al periplasma. O bien, CpxR~P podría regular positivamente genes que interfieren con los procesos de infección (Humphreys y col. 2004; van Rensburg y col. 2015).



OBJETIVOS

II.1. Objetivos generales

El presente trabajo de tesis se enmarca en un proyecto de investigación que involucra el estudio de los mecanismos de señalización ambiental y de regulación transcripcional que modulan la capacidad de *Salmonella enterica* de adaptarse y sobrevivir en diferentes ambientes, tanto dentro como fuera del hospedador. Nuestro grupo de trabajo se ha centrado en el estudio del cobre como señal ambiental, dada su vinculación con la virulencia, y ha iniciado la caracterización de un sistema de reconocimiento a cobre que controla la expresión de factores involucrados en la resistencia al metal en esta bacteria patógena. Particularmente, en este trabajo se planteó caracterizar otros mecanismos que utiliza este patógeno para sobrevivir en presencia de concentraciones elevadas de Cu y de estrés oxidativo, con especial atención en proteínas de la envoltura bacteriana, CueP y el sistema Scs, codificadas en loci específicos de *Salmonella*. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

II.2. Objetivos específicos

Dilucidar el rol fisiológico de la regulación coordinada de *cueP* por parte de CueR y de CpxR/CpxA y profundizar en el estudio de esta regulación, analizando aspectos mecanísticos del proceso de inicio de la transcripción.

Estudiar el rol de los genes *scs* en la homeostasis de cobre en *Salmonella* y dilucidar el o los factores responsables de su activación.

Caracterizar el rol de los productos génicos de *Salmonella enterica* que codifican para proteínas tipo tiorredoxinas extracitoplasmáticas ScsA, ScsB, ScsC, ScsD, DsbC, DsbG y DsbD, en la resistencia a cobre, y en la respuesta a estrés oxidativo



MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas y plásmidos empleados en esta tesis se detallan en las Tablas 2 y 3, respectivamente. Los oligonucleótidos que fueron utilizados para la generación de mutantes, el clonado de las regiones especificadas, los ensayos de RT-PCR y RT-qPCR, ensayos de retardo de la movilidad electroforética y de protección a la ADNasa I se detallan en la Tabla 4. En todos los casos estos oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma, se disolvieron en agua destilada estéril hasta una concentración 1 µg/µl y se guardaron a -20°C hasta su utilización. Para las reacciones de PCR se realizaron diluciones de los oligonucleótidos hasta alcanzar stocks de 10 µM, y para las reacciones de qRT-PCR los stocks se diluyeron hasta una concentración de 5 µM.

Tabla 2. Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5α	F-Z-(tp80 <i>lacZ</i> AM15) <i>endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 hsdR17 relA1 (lacZYA-argF)</i> U169	(Sambrook y col. 1989)
XL1-blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F', proAB+, lacIq, lacZ, Δ::Tn10(Tet^R)]</i>	Stratagene
M15 [pREP4]	F-, Φ80Δ <i>lacM15, thi, lac-, mtI-, recA+, Km^R</i>	Qiagen
<i>Salmonella Typhimurium</i>		
14028	Silvestre	ATCC
7065 (LB5010)	<i>metA22 metE551 trpD2 ilv-452 leu- pro- hsdSA29 hsdB- strA120 galE-</i>	(Bullas y Ryu 1983)
PB5449	Δ <i>cueR</i>	(Espariz y col. 2007)
PB9662	Δ <i>cpxRA</i>	(Pezza y col. 2016)
PB5948	<i>PcueP::lacZ-Cm^R</i>	(Pontel y Soncini 2009)
PB5949	Δ <i>cueR PcueP::lacZ-Cm^R</i>	(Pontel y Soncini 2009)
PB6028	<i>cueP::3xFLAG-Km^R</i>	(Pontel y Soncini 2009)
PB6127	Δ <i>cueP::Cm^R</i>	(Pontel y Soncini 2009)
PB8214	<i>PcueP::lacZ</i>	Cepario laboratorio
PB9833	<i>PcueP::lacZ PcueP::Cm</i>	(Pezza y col. 2016)
PB9958	<i>PcueP::lacZ caja cpxR*-Cm^R</i>	(Pezza y col. 2016)
PB10009	<i>PcueP::lacZ-Cm^R constitutivo independiente</i>	(CueR (Pezza y col. 2016)

Continuación Tabla 2

PB10029	$\Delta cueR::Km^R \Delta cpxR PcueP::lacZ-Cm^R$	(Pezza y col. 2016)
PB10326	$\Delta cpxR::Cm^R cueP::3xFLAG- Km^R$	(Pezza y col. 2016)
PB10424	$\Delta cueR::Km^R PcueP::lacZ-Cm^R$ constitutivo	(Pezza y col. 2016)
PB10864	$PcpxP-lacZ$	(Pezza y col. 2016)
PB11450	$\Delta cpxR::Cm^R PcpxP::lacZ$	(Pezza y col. 2016)
PB11609	$PcopAcueP$	(Pezza y col. 2016)
PB11893	$PcopAcuePcueP::3xFLAG- Km^R$	(Pezza y col. 2016)
PB12531	$\Delta cpxR PcopAcuePcueP::3xFLAG- Km^R$	(Pezza y col. 2016)
PB12519	$cpxR-box^*- Cm^R$	(Pezza y col. 2016)
PB10122	$\Delta cpxR$	(Pezza y col. 2016)
PB12526	$\Delta cpxA::Cm^R$	(Pezza y col. 2016)
PB12527	$\Delta cpxA::Cm^R PcueP::lacZ$	(Pezza y col. 2016)
PB9618	$\Delta scsA$	Ceparario laboratorio
PB9409	$\Delta scsBCD::Cm^R$	Ceparario laboratorio
PB10431	$\Delta scsABCD::Cm^R$	Este trabajo
PB10807	$\Delta scsABCD$	Este trabajo
PB10673	$\Delta scsB$	Este trabajo
PB11084	$\Delta scsC$	Este trabajo
PB11020	$\Delta scsD$	Este trabajo
PB9410	$\Delta dsbC::Cm^R$	Ceparario laboratorio
PB10688	$\Delta dsbC$	Este trabajo
PB12111	$\Delta dsbG$	Este trabajo
PB12071	$\Delta dsbD (\Delta dipZ)$	Este trabajo
PB12073	$\Delta scsC \Delta dsbC$	Este trabajo
PB12813	$\Delta scsC \Delta dsbG$	Este trabajo
PB12131	$\Delta scsC \Delta dsbC \Delta dsbG$	Este trabajo
PB12132	$\Delta scsB \Delta dsbD$	Este trabajo
PB12810	$\Delta scsB \Delta scsC$	Este trabajo
PB12811	$\Delta scsB \Delta dsbC$	Este trabajo
PB12812	$\Delta scsB \Delta scsC \Delta dsbC$	Este trabajo
PB12110	$\Delta tpx::Cm^R$	Este trabajo
PB10668	$scsA::cat$	Este trabajo
PB12345	$Pscs::lacZ$	Este trabajo
PB12397	$\Delta cpxR::Cm^R Pscs::lacZ$	Este trabajo
PB12814	$\Delta cpxA::Cm^R Pscs::lacZ$	Este trabajo
PB12398	$\Delta cueR::Cm^R Pscs::lacZ$	Este trabajo
PB12399	$\Delta golS::Cm^R Pscs::lacZ$	Este trabajo
PB12815	$\Delta rpoE::Cm^R Pscs::lacZ$	Este trabajo
PB12400	$\Delta rcsB::Cm^R Pscs::lacZ$	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos utilizados

Plásmido	Propiedades relevantes	Referencia
pCP20	<i>flp</i> , Amp ^R	(Cherepanov and Wackernagel 1995)

pJB20	<i>lacZ</i> clonado en <i>Bst</i> BI del plásmido pKD3	(Beaber, Hochhut, and Waldor 2002)
pKD3	Ori R6K, Cm ^R , Amp ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD4	Ori R6K, Km ^R , Amp ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD46	P _{araB-γ-β-exo} , Amp ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pMC1871	pBR322. Tet ^R , <i>lacI</i>	Amersham Pharmacia
pQE32	Ori ColE1, Amp ^R , P _{T5-lac} , N-His	Qiagen
pSUB11	Ori R6K, 3xFLAG, Km ^R	(Uzzau y col.2001)
pUHE21-2 <i>lacI</i> ^q	reppMB1 Amp ^R <i>lacI</i> ^q	(Soncini, Vescovi, and Groisman 1995)
pPB1209	pUH:: <i>cueR</i> (pCUER)	(Espariz y col.2007)
pPB1257	pUH:: <i>cueP</i>	(Pontel y Soncini 2009)
pPB1466	pUH:: <i>cpxR</i> (pCPXR)	(Pezza y col. 2016)
pPB1467	pQE32:: <i>cpxR</i>	(Pezza y col. 2016)
pPB1468	pUH:: <i>cpxRA</i> (pCPXRA)	(Pezza y col. 2016)
pPB1474	pUH:: <i>nlpE</i> (pNLPE)	(Pezza y col. 2016)
pPB1351	pUH:: <i>cueR</i> _{C120S}	(Ibáñez, Checa, and Soncini 2015)
pPB1334	pMC1871::Pscs	Este trabajo
PPB1477	pMC1871::Pscsbox ⁽⁻⁾	Este trabajo
pPB1478	pMC1871::Pscsbox ^Δ	Este trabajo

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo de Tesis

Nombre	Secuencia (5'-3')	Función
scsA Fw	ATGGCGAAACAACAACG	RT-PCR y qPCR
scsA Rv-250	GTAGACAAAGCGCAAGG	RT-PCR y qPCR
scsB Fw	ATGATGATTTTGTTCAG	RT-PCR y qPCR
scsB Rv-263	CTTACCTCAGGCATGTC	RT-PCR y qPCR
scsB Fw-165	CTGTTGCTGGATGTCAAACCTGG	RT-PCR
scsB Rv-165	TCCCTGGGTGGTGATATTCG	RT-PCR
scsA _{79pb} Rv	GTTGCGCGGTACAAACC	RT-PCR
rnpB Fw2	TCATCTAGGCCAGCAATCG	RT-PCR y qPCR
rnpB Rv	GTGAAAGGGTGC GGTAAGAG	RT-PCR y qPCR
scsA-prom Fw	GTTTCTCCACTAAGTGTAGG	Chequeo de mutante
scsA-P1	GATAACTCGCGTTAAACAGTGAGGGCGCAGTGTAGGC TGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>scsA</i> y de <i>scsABCD</i> . Construcción de <i>Pscs::lacZ-Cm</i>
scsA-P2	GTGCCCTCTCTACTGCCGCCGTTTTCCGTTCCAGGCA TATGAATATCCTCCTTA	Delección de <i>scsA</i> . Construcción de <i>Pscs::lacZ-Cm</i>
scsBCD-P1	GGTTAATTACTCATTACGGAGAAAAAATGTGTAGGC TGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>scsBCD</i> y de <i>scsB</i>
scsBCD-P2	GGTTAATTACTCATTACGGAGAAAAAATGTGTAGGC TGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>scsBCD</i> , de <i>scsABCD</i> y de <i>scsD</i>
scsB-P2	GCTTTTTTCAACGTTTGTAAATACCGCATCCATATGAA TATCCTCCTTA	Delección de <i>scsB</i>
scsC-P1	AATACATGATTGTTTTACTGCTGGCGCTGGTGTAGGC TGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>scsC</i>
scsC-P2	CTGCGCCCGGAATCAGCTCGTCGCCAATGCATATGAA TATCCTCCTTA	Delección de <i>scsC</i>
scsD-P1	ACTGCGGCGTTGGCTGCGTGAAGCCGCGGGTGTAGGC TGGAGCTGCTTCG	Delección de <i>scsD</i>
scsA-cat P1	TTGTACCGCGCAACGCATGGCGGGCTGCACGCCTTG CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Inserción Cm a 79 pb del ORF <i>scsA</i>
scsA-cat P2	GGAGCGCTGACCACCGCAGCAGAGGCCGTCGCCTGCA TTCATATGAATATCCTCCTTA	Inserción Cm
PscsA-Fw- (XmaI)	GACCCGGGCATAATGGCGTAATAATC	Clonado pMC1871 /EMSA/ ADNasa I

PscsA-Rv- (XmaI)	GACCCGGGGCAAAGAAACCACCAG	Clonado pMC1871 /EMSA/ ADNasa I
Pscs box ^A Fw	GCGCGAGCTCATAACTAATGAGGGGAAAGG	Mutagénesis <i>box</i> CpxR en Pscs.
Pscs box ⁽⁻⁾ Fw	GCCGACATAACTTCAGAGGGGAAAGGTTGC	Mutagénesis <i>box</i> CpxR en Pscs.
P1-Rev	CGAAGCAGCTCCAGCCTACAC	Chequeo mutantes
LacZ-Rv	ATCAAGCTTCGACGGCCAGTGAATC	Chequeo mutantes
cpxP-prom cheq	TGTTTACGTACCTCCGAGGC	Chequeo mutante
cpxP P1	TGAAATTATTGAGTAGTAGCAACTCACGTTCCAGTA AGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Construcción de <i>PcpxP::lacZ-</i> Cm
cpxP P2	GAAGACAGGGATGGTGTCTATGGCAAGGAAAACAGG GTTGCATATGAATATCCTCCTTA	Construcción de <i>PcpxP::lacZ-</i> Cm
nlpE-BamHI Fw	CGGGATCCATGGTGAAAAAAGCG	Clonado <i>nlpE</i>
nlpE-HindIII Rv	CCCAAGCTTTCTCAAGACGGGTAC	Clonado <i>nlpE</i>
dsbC P1	CATCCGCGGGCATGAGTGCTGACAGGAAAGGATAGTT TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>dsbC</i>
dsbC P2	CTCGCGCCGACGAAGTTGTCTCTGTTGTTTCACGCGT ACATATGAATATCCTCCTTA	Delección <i>dsbC</i>
dsbC-prom cheq	GTAAGGCTGGAATCGATAG	Chequeo de mutante
dsbG P1	GGCGTGGTACGGTTAAGCTCCAGCTTTGCTAATTTCT GCGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>dsbG</i>
dsbG P2	ATACTCTTTTCGCTTTGATATTAAGGAAAAAATAT GCATATGAATATCCTCCTTA	Delección <i>dsbG</i>
dsbG-prom cheq	TAAGGTCGTAAAGGTTAGCC	Chequeo de mutante
dsbD (dipZ) P1	GGTTTTACCTGTTACTCACGGAGATACTGATTACCTC TCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>dsbD</i>
dsbD (dipZ) P2	CACGGTATTCTCCTCCGTCTTTGCTTTTGCAAGTGTC GCCATATGAATATCCTCCTTA	Delección <i>dsbD</i>
dsbD-prom cheq	CGTCGTTCTGGCTGTCTGC	Chequeo mutante
tpx P1	GGATTTTCGACGTTAACTATAAGTAAATAGGAACATAA TTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>tpx</i>
tpx P2	CCTGTAGCACTGACAAACGTAGCGCCAGCAGGCGCTG GCCATATGAATATCCTCCTTA	Delección <i>tpx</i>
tpx-prom cheq	CAGTTTCTGCAATGCTTCGC	Chequeo mutante
cpxA-int P1	TAGGAAGTTTAACCGCGCATCTTCGCCATCTTCTG GGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Delección <i>cpxA</i>
cpxA-int P2	GAGATAAAAAATCGGCTGCATTTCGAGGCCGATGGT TTCATATGAATATCCTCCTATA	Delección <i>cpxA</i>
cueP-prext-Rv	TCTGAGGATGCCGCAAGCGCGGAGCC	EMSA

cueP-fwd-ftprin	GCATTTTGAATCCCTGCCTGATGG	EMSA
P1-site-cpxR	CTGATGGCGGGGATTTTTTTTATTCCAATCCCCCT CGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Mutagénesis <i>box</i> CpxR en <i>PcueP</i>
P2-cpxR-mut	GGACGCAGGCACTAGTAATCCACAGTTATGCTGGGGG ACATATGAATATCCTCCTTA	Mutagénesis <i>box</i> CpxR en <i>PcueP</i>
Cpx-Mut-Kpn-Fwd	TCCCCCAGCATAACCATGGATTACTAGTGCCTGCGTC C	Mutagénesis <i>box</i> CpxR en <i>PcueP</i>
P-int-cueP-Rv	ACTTCAATTCCTTGTGAACAATC	Mutagénesis <i>box</i> CpxR en <i>PcueP</i>
cueP-prom-copA-Fwd	GTAATGGCGGCGTCACCAGC	Construcción <i>PcopA-cueP</i>
P2-rv-cueP-prom-CopA	CGGTTTTATGAAGAGAAAGGGCTGGTGACGCCGCAT TACCATATGAATATCCTCCTTA	Construcción <i>PcopA-cueP</i>
P1-Fwd-cueP-prom-copA	CCAGCATAACTTTGCATTACTTTACCCTGCGTCCCTTT GAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Construcción <i>PcopA-cueP</i>

III.2. Medios de cultivo, antibióticos y condiciones de crecimiento

Las células fueron crecidas en el medio de cultivo Luria-Bertani (LB), compuesto por 10 g/l de peptona de carne, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl (Difco). En los casos indicados, se utilizó el medio 1X SLB, el cual no contiene NaCl. Para los lisados en medio líquido se utilizó el medio rico Nutrient Broth (NB), compuesto por 3 g/l de extracto de carne bovina y 5 g/l de peptona. Como medio de crecimiento definido se utilizó el medio mínimo M9 (Difco) compuesto por 6,78 g/l de Na_2HPO_4 , 3 g/l de KH_2PO_4 , 0,5 g/l de NaCl, 1 g/l de NH_4Cl , 0,4% de glucosa como fuente de carbono, 2 mM de MgSO_4 y 0,1 mM de CaCl_2 . Cuando se indica, se ajustó el pH del LB a 5,5 o 7,0 mediante el agregado de 100 mM MES

Para preparar medios sólidos se agregó agar en concentración final de 15 g/l. Para preparar medios semisólidos (soft agar) se agregó agar en concentración final de 6 g/l.

Los antibióticos empleados fueron: ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), cloranfenicol (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tetraciclina (12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En los casos donde fuese necesario se agregó CuSO_4 , ZnSO_4 , ZnCl_2 , citrato férrico, CdCl_2 , CoSO_4 , H_2O_2 y 2,2'-dipiridilo en las concentraciones indicadas.

III.3. Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total se realizó la dilución 1/100 de cultivos saturados de la cepa de interés en 25 ml de medio LB a 37°C con agitación. Una vez alcanzada la densidad óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$), a una fracción del cultivo se le agregó sulfato de cobre a una concentración final de 1 mM, dejando otra fracción sin agregado de metal. En ese instante, se tomó una alícuota de 5 mL, tiempo 0 minutos, se le agregó una solución fría de etanol absoluto 95%/fenol pH 5,5 5% (solución "stop") y se incubó en hielo durante 20 minutos. Lo mismo se hizo para las alícuotas a los distintos tiempos: 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. Posteriormente, las células fueron cosechadas por centrifugación a 6500 rpm durante 5min, resuspendidas en buffer TE pH 7 (Tris-HCl 10mM pH7; EDTA 1mM) y nuevamente centrifugadas a 6500 rpm durante 5 minutos. Los siguientes pasos de extracción se realizaron utilizando el reactivo RNazol (RNazol® RT Molecular Research Center), siguiendo las

instrucciones del fabricante. Luego de la extracción del ARN, las muestras fueron sometidas a tratamiento con DNAsa RQ1 (Promega) para mejorar su calidad. Se determinó la concentración de ARN midiendo la absorbancia de una alícuota a 260 nm, según la fórmula:

1 unidad de $Abs_{260nm} = 40 \mu\text{g}$ de ARN / ml de solución

Todas las preparaciones de ARN que fueron utilizadas en los ensayos de qRT-PCR presentaron un valor del cociente (Abs_{260nm}/Abs_{280nm}) entre 1,7 y 2,0, lo que indica que se hallaban libres de proteínas y fenol (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). Además se analizó el ARN total obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (p/v), como se indica en la sección III.6.

III.4. Extracción de ADN

4.1. Extracción de ADN genómico

El ADN cromosomal se preparó a partir de células de *S. Typhimurium* 14028s, o de mutantes derivadas de esta, según se indique. Se centrifugaron 5 ml de un cultivo saturado de células crecidas en medio LB a 37 °C con agitación constante. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 2,5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8, 2,5 mM EDTA, y 150 mM NaCl y luego se repitió la centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en 2,5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8 y 25 mM EDTA. Luego se agregaron 275 μl de lisozima 2 mg/ml (Sigma), y se incubó 20 minutos a 37 °C. Se agregaron 300 μl de una solución de 10 % (p/v) de Sarkosyl y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteasa K (Invitrogen), y se incubó a 55 °C durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas con volúmenes iguales de fenol equilibrado con 100 mM Tris-HCl pH 8,0 y con cloroformo:fenol en proporción 1:1 (v/v), conservando siempre la fase acuosa. Se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 5 minutos, se recuperó la fase acuosa que contiene al ADN cromosomal y se le agregaron 1/9 partes en volumen de 3 M acetato de amonio y 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol 80 % (v/v), se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en 300 μl de agua destilada estéril. La concentración de ADN fue

determinada midiendo la absorbancia de una alícuota a 260 nm (Abs 260 nm), según la siguiente fórmula:

1 unidad de Abs 260nm = 50 µg de ADN/ml de solución (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989).

La calidad de la preparación se evaluó a través del cociente Abs 260nm/Abs 280nm. Un valor entre 1,7 y 2,0 indica que se halla libre de proteínas y fenol (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). También se analizó el ADN genómico mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, como se indica en la sección III.6.

4.2. Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se preparó a partir de células de *E. coli* previamente transformadas. Las células se crecieron a 37 °C con agitación constante durante toda la noche en 3 ml de medio LB con el agregado del antibiótico adecuado. Se centrifugó el cultivo, y se resuspendió el sedimento celular en 350 µl de solución STET (8 % (p/v) sacarosa, 5 % (p/v) Tritón X-100, 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8,0). Se agregaron 10 µl de una solución de 10 mg/ml lisozima (Sigma) y 1 mg/ml ARNasa A libre de ADNasa (Sigma), 50 mM Tris-HCl pH 8 y 50 % de glicerol. La mezcla se hirvió 1 minuto a 100 °C y luego se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se sometió a extracciones sucesivas con volúmenes iguales de cloroformo y fenol equilibrado con 0,1 M Tris-HCl pH 8, conservándose la fase acuosa. Para precipitar el ADN se agregaron 60 µl de acetato de amonio 3 M y 1 volumen de isopropanol, se incubó durante 30 minutos a -20 °C y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con 500 µl de una solución de 80 % (v/v) etanol. Se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó a temperatura ambiente. Finalmente el precipitado se resuspendió en 30 µl de H₂O destilada estéril. La solución de ADN obtenida se mantuvo a -20 °C hasta su utilización. Alternativamente, para obtener un ADN plasmídico de mejor calidad y con mejores rendimientos, se utilizó un *kit* comercial (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos por PCR se siguió un protocolo básico que consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C, un anillado entre 50 °C y 60 °C (dependiendo del oligonucleótido utilizado) y una elongación a 72 °C (o 68°C según la polimerasa utilizada). Los tiempos de desnaturalización y anillado fueron de 30 segundos y los de elongación dependieron de la longitud de los productos a amplificar (no más de 1 minuto por cada 1 kpb). Por último se incluyó una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. El volumen final fue de 20- 50 µl conteniendo: *buffer* comercial 1X, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (Invitrogen), 1 µg de ADN molde (cantidad variable), 5 pmoles de oligonucleótido directo o reverso y 2,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) o *Pfx* polimerasa (Invitrogen). Como molde se utilizó 0,025 µg de ADN plasmídico, 0,125 µg de ADN cromosomal o 3 µl provenientes de la suspensión de 1 colonia en 50 µl de H₂O estéril, previamente hervida durante 5 min (PCR de colonia).

Los productos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, como se indica en la III.6.

5.1. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias

Esta técnica se empleó para verificar en las cepas transformadas la presencia de los distintos fragmentos de interés, ya sea como fusiones cromosomales o clonados en plásmidos. La técnica consistió en disolver una colonia de las bacterias a analizar en 50 µl de agua destilada. Cada reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, compuesto por *buffer* comercial 1 X, 1 µl de la suspensión de bacterias en agua destilada, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, 5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos (directo y reverso) y 1 U de *Taq* polimerasa. El programa de amplificación fue similar al descrito en el punto anterior.

5.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR).

La síntesis de ADN copia (ADNc) se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios, 2 g de ARN total y 1 U de la retrotranscriptasa Superscript II Rnase H2 (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el ADNc, se utilizaron cebadores para amplificar *scsA* (250 pb), *scsB* (263 pb) y el gen de referencia *rnpB* (169 pb), que fue utilizado como control interno para la normalización (ver Tabla 4) y se procedió a determinar los niveles de estos transcriptos mediante PCR y qPCR. Las reacciones de qRT-PCR (5 μ l de una dilución 1/10 de cada ADN copia se utilizó como molde) se llevaron a cabo en presencia del colorante SYBR *green* que se intercala en fragmentos de ADN de doble cadena (Molecular Probes), y se monitorizaron en tiempo real con el termociclador Mastercycler® ep realplex Real-time PCR System (Eppendorf). La expresión relativa se calculó utilizando los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos a partir de cada muestra de la siguiente manera: expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo $\Delta Ct = Ct_{muestra} - Ct_{control\ interno}$ y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{muestra\ de\ referencia}$ (en donde la muestra es el transcripto en la condición en estudio (agregado de metal), el control interno es un fragmento del gen *rnpB* y la muestra de referencia corresponde a los transcriptos en la condición sin agregado de metal).

En los gráficos de barra se muestran los valores en veces de inducción respecto al cultivo no tratado para cada tiempo.

III.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN cromosomal, plasmídico y los fragmentos obtenidos por la restricción de los mismos y por la reacción en cadena de la polimerasa fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración, según el tamaño del fragmento a resolver. Para la corrida electroforética se utilizó el sistema de tipo submarino (Sambrook, Fritsch, and Maniatis 1989). Se utilizó la solución tampón TBE 0,5 X (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA) como

solución de electroforesis y para la preparación de geles. A estos últimos se les agregó bromuro de etidio en una concentración final de 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antes de su gelificación. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 0,25 % (p/v) xilencianol y 30 % (v/v) glicerol, en una proporción 5:1 en volumen de muestra:solución de siembra. Como marcador de peso molecular se utilizó 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen). Los geles de agarosa se corrieron a una intensidad de corriente constante de 75 mA y, una vez finalizada la electroforesis, los fragmentos de ADN se detectaron empleando un transiluminador de luz UV (FBTIV-88. Fisher Biotech).

6.1. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o luego de la digestión con enzimas de restricción fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante la tecnología de adsorción provista por el *kit* comercial GFX (General Electric Healthcare) siguiendo las indicaciones del proveedor.

III.7. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las condiciones de digestión usadas en cada caso fueron las recomendadas por los proveedores de las endonucleasas de restricción. Se utilizó aproximadamente 1 U de enzima por μg de ADN y se incubó la mezcla de digestión durante 3-16 horas a la temperatura recomendada. Los cortes con enzimas de restricción se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa como se describe en el punto III.6.

III.8. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μl , conteniendo 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Fermentas), la solución de ligación comercial 1X y los fragmentos de ADN a ligar (vector e inserto en una proporción 1:4, respectivamente). Las reacciones se incubaron toda la noche a 16 °C. Transcurrido este período, la mezcla de ligación fue sometida a diálisis en gota

contra agua previamente esterilizada, utilizando discos de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,025 μm , MILLIPORE) durante 30 minutos.

III.9. Construcción de plásmidos reporteros

Para generar la fusiones reporteras plasmídicas pMC1871::Pscs box⁽⁻⁾ (en el cual se reemplazaron dos bases en el sitio de reconocimiento de CpxR) y pMC1871::Pscs box^A (se deletaron y/o reemplazaron bases dentro y fuera del sitio de reconocimiento de CpxR) (Tabla 4) que contienen un fragmento de 303 pb del promotor de *scs* en fase con el gen que codifica para la enzima β -Galactosidasa (*lacZ*) carente de su propio codón de inicio de la traducción (codificado en el plásmido). Brevemente, se realizaron dos PCR utilizando la técnica de *megaprimer* (apartado III.13) para las construcciones Pscs box⁽⁻⁾ y Pscs box^A. En la primera PCR se generó un fragmento que contiene el sitio de unión a CpxR mutado utilizando los primers Pscs box^A Fw o Pscs box⁽⁻⁾ Fw con PscsA-Rv-(XmaI) (Tabla 4), y el plásmido pMC1871::Pscs (construcción ya disponible en el laboratorio) como molde (PCR I). Los productos de estas reacciones se utilizaron en las reacciones de extensión del megaprimer (PCR II) junto con el oligonucleótido PscsA-Fw-(XmaI) y utilizando como molde el mismo plásmido que anteriormente. Los oligonucleótidos PscsA-Fw-(XmaI) y PscsA-Rv-(XmaI) llevan en sus extremos 5' un sitio de reconocimiento para la enzima XmaI, con la que el producto de la PCR II fue tratado para ligarlo en el plásmido pMC1871 tratado de la misma manera.

III.10. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *E. coli* o *S. Typhimurium* se inocularon 300 ml de medio LB fresco con 3 ml de un cultivo saturado de la bacteria y se incubó con agitación permanente a 37 °C hasta una $DO_{600\text{nm}}$ entre 0,5 y 0,8. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 7000 rpm a 4 °C. El sedimento celular obtenido se lavó dos veces con 500 ml de H₂O destilada estéril fría y una vez con 10 ml de 10 % (v/v) glicerol. Finalmente, se resuspendió en 0,6 ml de 10 % (v/v) glicerol, y se fraccionó en tubos estériles, que se guardaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

III.11. Transformación y selección

Para la transformación celular se colocaron 40 μ l de la suspensión de células competentes preparadas como se indicó en la sección anterior en una celda de electroporación y se agregaron de 1 a 5 μ l del plásmido, mezcla de ligación o fragmento de ADN lineal. Se electroporó la mezcla utilizando un electroporador Bio-Rad a un voltaje de 2,5 kV. Luego, se agregó 1 ml de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación constante. Las células fueron concentradas por centrifugación y se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB agar suplementado con el antibiótico adecuado para la selección de las bacterias transformantes.

III.12. Manipulación genética

12.1. Construcción de mutantes polares y no polares en *Salmonella*

En la figura 11 se esquematiza el método empleado para la obtención de mutantes polares y no polares en *Salmonella* desarrollado por Datsenko y colaboradores y denominada "mutagénesis en un solo paso" (Datsenko y Wanner 2000). Este método se basa en la recombinación de fragmentos de ADN lineales mediada por el sistema *red* del fago λ , luego de la transformación de las células con ADN lineal. Los fragmentos de ADN lineal se obtuvieron amplificando por PCR un *cassette* de resistencia para un antibiótico, cloranfenicol o kanamicina (Cm^R o Km^R) flanqueado por los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica FLP (denominados FRT). Los oligonucleótidos utilizados para esta amplificación son diseñados con los extremos 5' homólogos al gen a mutar/delecionar y extremos 3' que hibriden con los sitios FRT de los plásmidos que se utilizan como molde: pKD3 (Cm^R) o pKD4 (Km^R) (Tabla 3). Con estos fragmentos se transformaron células electrocompetentes de *Salmonella* 7065/pKD46. El plásmido pKD46 es termosensible y expresa los genes *gam*, *bet* y *exo* del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa, cuyos productos génicos evitan la degradación

del ADN lineal por la nucleasa RecBCD de la bacteria y facilitan la recombinación de éste con el cromosoma (Datsenko y Wanner 2000) (Figura 11).

La preparación de las células electrocompetentes que transportan el plásmido pKD46 se llevó a cabo de acuerdo a la sección III.10 excepto que los cultivos fueron crecidos a 30°C y con el agregado de 20 mM de arabinosa (concentración final).

La electroporación se realizó con 5 µl del producto de PCR concentrado (20X) y desalado. Previo a la selección, se incubó 4 horas a 37 °C con agitación en LB conteniendo 1 % (p/v) glucosa. Se seleccionaron colonias Cm^R o Km^R a 37 °C y luego se repicaron a 42 °C para evitar la replicación del plásmido (pKD46) que, de esta manera, se pierde. Así se obtuvieron las cepas mutantes conteniendo la delección deseada y una pequeña "cicatriz" de 75 pb que contiene un único sitio FRT (Figura 11)

12.2. Construcción de fusiones transcripcionales a *lacZY*

La técnica es similar a la utilizada para la inserción de *cassette* de antibióticos. La diferencia con el caso anterior se encuentra en el plásmido a partir del cual se amplifica el segmento lineal que va a ser utilizado para transformar las bacterias competentes. El plásmido pJB20 tiene los sitios FRT flanqueando una copia del gen *lacZ* sin su promotor y un *cassette* de resistencia a cloranfenicol (Beaber, Hochhut, y Waldor 2002). La amplificación con los oligonucleótidos largos genera un producto de aproximadamente 4 kpb.

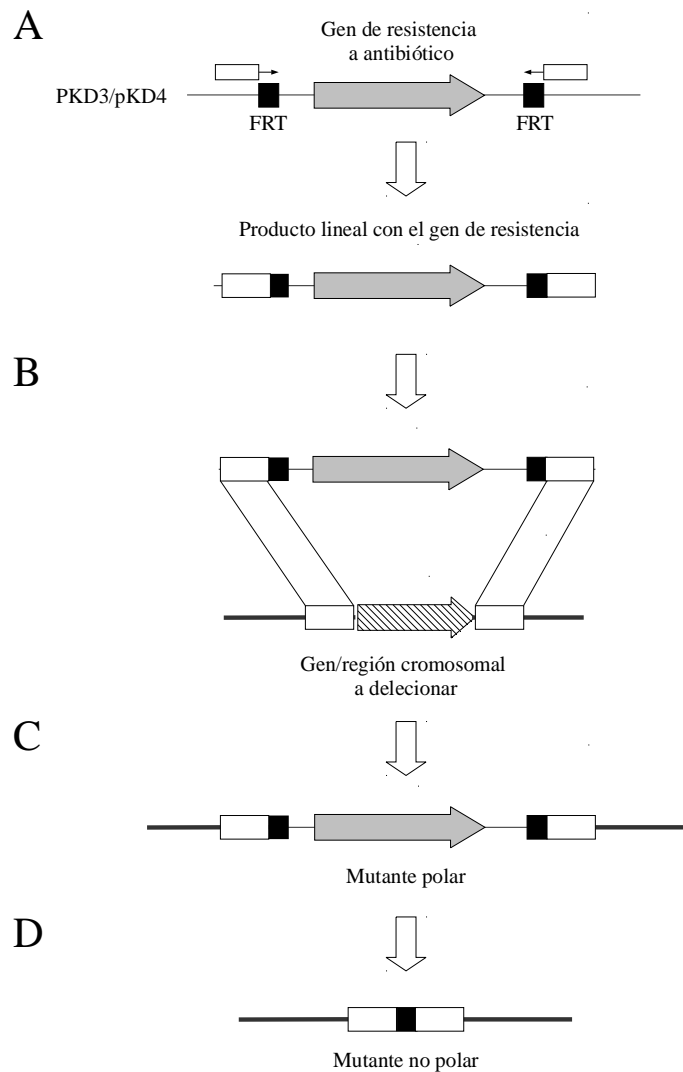


Figura 11. Obtención de mutantes polares y no polares en *Salmonella*. El esquema muestra la estrategia descrita por Datsenko y Wanner para la obtención de mutantes cromosomales (Datsenko y Wanner 2000). **A.** Se genera por PCR un fragmento de ADN lineal que contiene el gen de resistencia a Cmo Km (gris) utilizando como molde al plásmido pKD3 o pKD4, respectivamente. Los oligonucleótidos utilizados hibridan con regiones idénticas entre estos vectores que flanquean al gen de resistencia y a los sitios FRT (negro). Además, estos cebadores presentan secuencias homólogas a los extremos 5' o 3' del gen o región que se quiere deletar (blanco). **B.** Se transforma la cepa de *Salmonella* que transporta el plásmido pKD46 con el fragmento de ADN lineal obtenido. Estas cepas expresan los genes del sistema de recombinación λ Red presentes en el plásmido pKD46. **C.** Se seleccionan aquellas cepas que han intercambiado el gen a deletar por el gen de resistencia y se confirma la mutación mediante PCR de colonia. **D.** Para obtener la mutante no polar se transforma la cepa con el plásmido pCP20 que expresa el gen de la recombinasa FLP. Ésta va a reconocer específicamente los FRT y escindir el *cassette* de antibiótico flanqueado por estos sitios (Cherepanov y Wackernagel 1995). Para confirmar la mutación no polar se contra seleccionan las colonias sensibles al antibiótico cuya resistencia está codificada en el lugar del gen escindido.

12.3. Construcción de fusiones FLAG

Las fusiones cromosomales a FLAG se realizaron según la técnica descrita por Uzzau y colaboradores (Uzzau y col. 2001). Utilizando como molde el plásmido pSUB11, se amplificó la secuencia codificante para el epítipo FLAG seguida del *cassette* de resistencia a Km. De la misma forma como se describió en la sección 12.1 los oligonucleótidos poseen una región 5' compuesta por 40 nucleótidos homólogos al sitio donde se pretende insertar el epítipo y un extremo 3' adecuado para amplificar desde el plásmido pSUB11. Con el producto de PCR se transformaron células 7065/pKD46. Los oligonucleótidos se diseñaron de tal manera que el epítipo FLAG quede en fase con el marco abierto de lectura a etiquetar, generando una proteína de fusión en el extremo C-terminal.

III.13. Mutagénesis dirigida mediante la técnica de *megaprimer*-PCR

Este método se utilizó para la construcción de las cepas reporteras plasmídicas a pMC1871 (sección III.9). Este método de mutagénesis requiere dos reacciones de PCR (PCR I y PCR II) para obtener las distintas versiones mutantes. Para estas reacciones se emplearon tres cebadores, dos que son los "flanqueantes" del fragmento a modificar y un cebador interno "mutador" que es el que contiene la mutación que se desea introducir. En la reacción de PCR I (obtención del *megaprimer*), uno de los primers externos y el primer interno se usan para generar el *megaprimer*. Este *megaprimer* es purificado en gel de agarosa y utilizado junto al otro primer "flanqueante" en la reacción de PCR II (extensión del *megaprimer*) para generar el fragmento de ADN completo con la mutación deseada (Kammann y col. 1989). En las tablas presentadas a continuación, se detallan los componentes y programas empleados para realizar las reacciones de PCR I y II (tabla 5).

Tabla 5. Componentes y programas utilizados para la obtención y extensión del *megaprimer*

Componentes	PCR I	PCR II
Buffer comercial 10X	10 µl	10 µl
50 mM MgSO ₄	2 µl (1 mM)	2 µl (1 mM)
100 mM dNTPs	1,2µl (300µM c/u)	1,2µl (300µM c/u)
Oligonucleótido Fw	2 µl (25 pmol)	10 µl <i>megaprimer</i>
Oligonucleótido Rv	2 µl (25 pmol)	2 µl (25 pmol)
<i>Pfx</i> (2,5 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl
Molde ADN genómico	1 µl	1 µl

H ₂ O csp.	100 µl	100 µl
Programa de PCR	PCR I	PCR II
1. Desnaturalización	4' a 94°C	4' a 94°C
2. Desnaturalización	30'' a 94°C	1' 30'' a 94°C
3. Hibridación	30'' a 55°C	2' a 55°C
4. Elongación	1' a 68°C	1' a 68°C
5. Repetir pasos 2 a 4	30 veces	30 veces
6. Elongación final	5' a 68°C	10' a 68°C

III.14. Transducción generalizada con el bacteriófago P22

14.1. Obtención de lisado en medio semisólido

Las mutantes en los diferentes genes de *Salmonella* descritas durante esta Tesis, así como los plásmidos utilizados durante el transcurso de la misma fueron movilizados mediante transducción generalizada con el bacteriófago P22 cuando fue necesario. Para ello, se realizó un lisado de la cepa dadora, para lo cual se tomaron 100 µl de un cultivo saturado de esta cepa y se lo incubó con 100 µl de una dilución 10⁻⁴ de la suspensión de fagos P22 HT crecidos en la cepa silvestre 14028s. Luego se agregaron 3 ml de medio LB semisólido fundido a 42 °C, se agitó vigorosamente y se distribuyó la mezcla sobre placas de Petri con medio de cultivo LB sólido. Las placas fueron incubadas 5-7 horas a 37 °C hasta observar placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro. Para recolectar el lisado se agregó 5 ml de medio LB líquido a cada placa de Petri y, con la ayuda de una espátula de Drigalski, se recogió la mezcla de LB semisólido, bacterias y fagos. A esta mezcla se la trató con 200 µl de cloroformo para completar la lisis celular y se la centrifugó 10 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4 °C hasta el momento de su uso (Bullas y Ryu 1983).

Debido a que la cepa 7065 posee una mutación en el gen *galE* que le impide sintetizar galactosa, su LPS es distinto al de la cepa silvestre y no es reconocido por el bacteriófago P22 (Bullas y Ryu 1983). Por lo tanto, para obtener lisados P22 HT de mutantes derivadas de 7065 se suplementó el medio LB (líquido o semisólido) con 0,5 % (p/v) glucosa y 0,25 % (p/v) galactosa.

14.2. Obtención de lisado en medio líquido

Alternativamente a la obtención de lisados en medio semisólido, la aplicación de esta técnica en medio líquido también permitió la transferencia por transducción de plásmidos y mutaciones cromosomales entre cepas de *Salmonella*, pero con un mayor título final de fagos que el obtenido a través de la técnica descrita en el punto 14.1. Para ello se centrifugó 1 ml de cultivo ON (crecido durante toda la noche) de la cepa dadora correspondiente durante 5 minutos a 5.000 rpm y se resuspendió el pellet en 5 ml de medio Nutrient Broth (NB), compuesto por 3 g/l de extracto de carne bovina y 5 g/l de peptona, suplementado con 0,05 ml de Sales E 50 X (10 g/l MgSO₄.7H₂O; 100 g/l Acido cítrico.H₂O; 655 g/l K₂HPO₄.3H₂O; 175 g/l NaNH₄HPO₄.4H₂O y 3 mg/l CHCl₃), 0,05 ml de glucosa 20 % (p/v) y 5.107 ufp/ml de fago P22 HT. Tras una incubación de 6 hs a 37 °C sin agitación, se agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugó durante 10 min a 8.000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4 °C hasta el momento de su uso.

14.3. Transducción generalizada

Una alícuota de 100 µl de un cultivo saturado de la cepa receptora se incubó durante 45 minutos a 37 °C sin agitación con igual volumen de un lisado de P22 HT proveniente de la cepa dadora. Para la transducción del plásmido termosensible pCP20 se incubó la mezcla durante 45 minutos a 30°C. Se utilizaron como controles mezclas en las cuales se reemplazaron bacterias o fagos por LB estéril, según corresponda. La selección de transductantes se realizó sembrando el volumen de la transducción en placas de Petri con medio LB sólido, suplementado con el antibiótico correspondiente para su selección y 1 mM EGTA para evitar la reinfección de los transductantes por fagos.

III.15. Ensayos de actividad β-galactosidasa

Para las medidas de actividad β-galactosidasa de cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales a los genes *lacZ*, se utilizó una modificación del protocolo propuesto por Miller (Miller 1972). Se determinó la densidad celular de

los cultivos midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Para el ensayo de actividad se utilizaron 30 μ l del cultivo, los cuales fueron agregados a un tubo de ensayo que contenía 275 μ l de solución reguladora Z (16,1 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 5,5 g/l $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,27 % (v/v) β -mercaptoetanol), 24 μ l de cloroformo y 14 μ l de 0,1 % (p/v) SDS. La mezcla se agitó vigorosamente por 10 segundos. La reacción se llevó a cabo a 30 °C y se inició por el agregado de 60 μ l del reactivo o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml a cada tubo, se mezclaron los reactivos y se dejó a 30°C hasta observar coloración amarilla. La reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de 150 μ l de 1 M Na_2CO_3 . Se registró el tiempo de reacción en minutos y se determinó la absorbancia de las muestras a 405 nm utilizando un lector de microplacas Biotek modelo ELX808. Cada reacción se procesó por duplicado y como blanco de reacción se utilizó un tubo al que se le agregaron 30 μ l de LB en lugar de cultivo bacteriano. La actividad enzimática se calculó según la fórmula que se describe a continuación,

$$Actividad\beta - galactosidasa(U. Miller) = \frac{DO_{405}^1 + DO_{405}^2}{2 \times DO_{600} \times \Delta t} \times 1000$$

donde DO_{405}^1 y DO_{405}^2 corresponden a la absorbancia registrada para cada reacción y su duplicado a la longitud de onda 405 nm; Δt es el tiempo de reacción en minutos y DO_{600} la densidad óptica a 600 nm del cultivo líquido.

III.16. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Las determinaciones de CIM de las diferentes cepas a analizar se realizaron sembrando 20 μ l de una dilución 5×10^{-7} en PBS 1X de un cultivo crecido hasta saturación en placas de LB agar conteniendo concentraciones crecientes de $CuSO_4$. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas en condiciones aeróbicas o alternativamente durante 72 horas en condiciones anaeróbicas. El ambiente anaeróbico fue generado utilizando el sistema Gaspak en jarra con bolsas AnaeroGen de OXOID e indicadores de anaerobiosis de la misma marca para verificar el consumo total de oxígeno generada. Se consideró como CIM a la concentración de metal en la placa de LB agar en la que no se observó crecimiento de colonias.

III.17. Halos de inhibición

17.1. Técnica con espátula de Drigalsky

Se sembraron con espátula de Drigalsky en una placa de Petri conteniendo 20 ml LB-agar [1,5 % agar (p/v)], 100 μ l de un cultivo saturado, también crecido en LB. Luego, discos de papel Whatman estériles, de 5 mm de diámetro, fueron embebidos con 5 μ l de soluciones de los metales ensayados ($ZnCl_2$, $CoSO_4$ y $CdCl_2$), de concentraciones conocidas, y colocados sobre la placa. Las placas se incubaron 16 hs a 37 °C.

El grado de sensibilidad de cada cepa a los diferentes metales se determinó en función del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento en torno a los discos. Mayor sensibilidad implica mayor diámetro en el halo de inhibición.

17.2 Técnica con LB-agar

100 μ l de un cultivo saturado se mezclaron con 3 ml de LB-agar [0,7 % agar (p/v)] fundido a 42 °C, el que luego se esparció homogéneamente sobre una placa de Petri con 20 ml LB-agar [1,5 % agar (p/v)]. Una vez solidificado, se colocaron los discos de papel Whatman como se describe en la sección 17.1.

III.18. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio rico LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 en un equipo Biotek modelo Synergy con agitación constante a 37 °C determinando la DO de los cultivos ensayados. Los ensayos se realizaron en microplacas de 96 pocillos estériles en un volumen final de 100 μ l conteniendo una dilución 1/100 de un cultivo saturado de la cepa a ensayar y distintas concentraciones finales de $CuSO_4$, $ZnCl_2$, citrato férrico, 2,2-dipiridilo (quelante de hierro) o H_2O_2 según se indica. Se registraron los valores de DO cada una hora durante 12-16 horas.

III. 19. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína

19.1. Fosforilación de oligonucleótidos

La reacción de fosforilación de los oligonucleótidos se llevó a cabo en un volumen de 15 μ l, conteniendo solución de fosforilación comercial suplementada con 45 μ Ci de [γ - 32 P] ATP (3000 mCi/ μ mol, 10 μ Ci/ μ l, New England Nuclear), 15 pmoles del oligonucleótido, y 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Promega). Se incubó 30 minutos a 37 °C, y luego se detuvo la reacción por inactivación de la enzima, calentando la mezcla a 65 °C durante 10 minutos. Se separaron 3 μ l del oligonucleótido marcado para las reacciones de secuenciación y el resto se utilizó para amplificar mediante PCR los fragmentos utilizados como sondas: promotores de *cueP* y de *scsABCD*, silvestres o mutantes según se indique.

19.2. Cuantificación de ADN marcado radiactivamente

Para cuantificar los fragmentos de ADN utilizados en los ensayos de retardo de la movilidad electroforética, la secuencia promotora en estudio fue amplificada con un oligonucleótido marcado radiactivamente y uno no marcado. A su vez, se realizó la misma reacción de PCR no radiactiva. Este fragmento no radiactivo (de ahora en adelante, sonda fría) fue cuantificado midiendo absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta la relación: 1 UAbs₂₆₀ = 50 μ g/ml. Luego, se sembraron en un gel de agarosa cantidades conocidas de la sonda fría cuantificada y distintos volúmenes del fragmento marcado (de ahora en adelante, sonda marcada). A partir de estos geles se estimó la concentración de la sonda marcada.

19.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida

La interacción de las proteínas CueR, CpxR y ARN Polimerasa con la región promotora de *cueP* fue analizada mediante la técnica de retardo de la movilidad electroforética de Lane y colaboradores (Lane, Prentki, y Chandler 1992). Esta técnica también se utilizó para analizar la interacción de CpxR con el promotor del locus *scs*.

El fragmento de ADN correspondiente a la región promotora fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos Prom *cueP* Long y *cueP* prext Rv para amplificar el promotor silvestre de *cueP* (utilizando como molde ADN silvestre) y Prom *cueP* Long y P1 Rv para amplificar el promotor "constitutivo" de *cueP* (utilizando ADN de la cepa *cueP::lacZ-Cm^R* constitutivo-PB10009-). El fragmento de ADN correspondiente al promotor de los genes *scsABCD* fue amplificado por PCR utilizando los cebadores PscsA-Fw-(XmaI) y PscsA-Rv-(XmaI). Previamente se fosforiló el extremo 5' de uno de los oligonucleótidos con ³²P por medio de la oligonucleótido quinasa T4 (Invitrogen), como se describe en el punto 19.1.

Aproximadamente 6 fmoles (15 ng) de las sondas marcadas *PcueP*, *PcueP* CueR-independiente fueron incubados por 20 minutos a temperatura ambiente con diferentes cantidades de CueR, CueR_{C120S}, CpxR purificadas y/o ARN Polimerasa (Epicentre), según corresponda. Para la sonda *Pscs* se procedió de la misma manera, pero la incubación fue con CpxR purificada. Estas mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 20 µl, conteniendo además *buffer* comercial React³ (Invitrogen) 1X, 5 mM DTT, 10 % glicerol, 2,5 µg/ml ADN de esperma de salmón (Sigma), 25 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) y 20 mM de acetilfosfato (ACP, Sigma), utilizado para fosforilar al regulador CpxR (durante 60 minutos a 30°C previo al agregado de la sonda).

Para el tratamiento con cianuro de potasio (KCN), CueR fue incubada con este quelante de cobre a una concentración final de 100 o 300 µM la mezcla de unión. El competidor heparina y los nucleótidos trifosfato (NTPs) se usaron a las concentraciones finales de 200 µg/ml y 250 µM, respectivamente (Boulangier y col.2015).

Luego se agregó solución de siembra (0,25 % (p/v) azul de bromofenol, 0,25 % (p/v) xilencianol, 30 % (v/v) glicerol) en una proporción 20:1 v/v de muestra:solución y se sembró en geles no desnaturizantes. Se utilizó un gel en gradiente de sacarosa entre 3-8% (p/v) de acrilamida:bisacrilamida 29:1 para resolver los complejos sobre el promotor de *cueP*. Para la sonda *Pscs*, se utilizaron geles al 7% (p/v) de acrilamida:bisacrilamida 29:1. Los geles en gradiente se prepararon utilizando vasos comunicantes en los que se colocaron soluciones al 3% y 8% de acrilamida:bisacrilamida. Para generar el gradiente, la solución de

acrilamida al 8% contiene 10% de sacarosa. Para la preparación de los geles y como solución de corrida se utilizó 25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina pH 8,3 y 1 mM EDTA.

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una intensidad de corriente de 10 mA por gel. Los geles fueron secados a 80 °C durante 60 minutos en un desecador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT). Los experimentos llevados a cabo con el promotor de *cueP* fueron luego incubados 24 horas en un cartucho específico con una pantalla que capta las emisiones de fósforo que posteriormente fue escaneada en el analizador Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare Life Sciences). Para los ensayos con la región promotora del locus *scs*, luego del secado fueron incubados con una placa radiográfica de alta sensibilidad (Kodak) durante 24 horas a -80°C en un cartucho específico y posteriormente se realizó el revelado de las placas radiográficas usando soluciones reveladoras y fijadoras comerciales (Kodak).

19.4. Ensayos de protección a la digestión por ADNasa I o ADN "footprinting"

La técnica de ADN "footprinting" con ADNasa I está basada en la protección que brindan las proteínas de unión al ADN contra la digestión por la ADNasa I (Galas y Schmitz 1978). Esta enzima interacciona con el ADN doble hebra, principalmente a través de contactos con el surco menor, e introduce un corte en el esqueleto azúcar-fosfato de una de las hebras.

Se realizaron reacciones de unión como se detalla en el punto 19.3 utilizando CpxR y 6 fmoles de las sondas marcadas Pscs y Pscs box^A, según se indica. Luego de 30 minutos de incubación a 37 °C, se adicionaron 60 µl de H₂O destilada, 10 µl de solución 10 X de ADNasa I compuesta por 400 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgSO₄ y 10 mM CaCl₂ y 1 U de ADNasa I (RQ1 DNase, Promega), y se incubó a 25°C durante 90 segundos. La reacción se detuvo por el agregado de 90 µl de solución de corte conteniendo 20 mM EDTA pH 8,0 y 200 µl de fenol-cloroformo en una proporción 1:1 en volumen. Se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos, se separó la fase acuosa, y se precipitó con 200 µl de isopropanol y 22 µl de acetato de amonio 3 M. Se incubó a -20 °C durante 16 horas minutos, se centrifugó a 13000 rpm durante 15

minutos, se lavó con 70 % (v/v) etanol, y se secó a 37 °C. El precipitado se resuspendió en 7 µl de solución de siembra desnaturizante (10 mM NaOH, 95 % formamida, 0,05 % azul de bromofenol y 0,05 % de xilencianol) y se sembró en un gel de secuenciación como se describe en el punto siguiente.

19.5 Secuenciación del ADN

La secuenciación de ADN se realizó utilizando el equipo comercial *fmol* (Promega). Este utiliza una modificación del método enzimático (Sanger y col., 1977), en el que la enzima *Taq* polimerasa sintetiza una hebra complementaria del ADN que se desea secuenciar a partir del oligonucleótido marcado. El método se basa en la capacidad de la ADN polimerasa de incorporar 2',3'-didesoxinucleótidos trifosfato, los cuales, al carecer de hidroxilo 3', impiden que continúe la síntesis. Por lo tanto se realizan cuatro reacciones, cada una en presencia de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato y de un didesoxinucleótido trifosfato. Al finalizar la reacción, cada tubo contiene una población de cadenas extendidas, todas con el mismo extremo 5' determinado por el cebador, y con extremos 3' variables, que terminan en un didesoxinucleótido específico.

Se utilizó como molde 0,05 pmoles del fragmento de ADN a secuenciar y 1.5 pmoles del oligonucleótido marcado con ³²P como oligonucleótido y, se siguieron las instrucciones del fabricante del *kit* de secuenciación (Promega). Al finalizar, las reacciones se mezclaron con solución de siembra desnaturizante de composición final: 32 % (v/v) formamida, 3 mM NaOH, 0,025 % (p/v) azul de bromofenol y 0,025 % (p/v) xilencianol.

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida de concentración final 6 % (p/v) (acrilamida:bisacrilamida 29:1), en presencia de 6 M urea. Antes de la siembra, las muestras fueron calentadas a 70 °C durante 3 minutos. Se utilizó TBE 1X como solución de electroforesis. La corrida electroforética se llevó a cabo a una potencia constante de 60 vatios durante dos horas, para luego ser incubados con una placa radiográfica de alta sensibilidad (Kodak) durante 48 horas a -80°C en un cartucho específico. Posteriormente se realizó el revelado de las placas radiográficas usando soluciones reveladoras y fijadoras comerciales (Kodak).

III.20. Expresión y purificación de CpxR, de CueR nativa y de CueR mutante (CueR_{C120S})

20.1. Purificación de CueR y de CueRC120S

Las cepas de *E. coli* XL1-blue pCueR (PB4853) o CueR_{C120S} (PB10014) fueron crecidas en LB suplementado con ampicilina, con agitación constante a 37 °C hasta saturación del cultivo. Luego se diluyó 1/50 en 300 ml de medio fresco y se incubó a 30 °C hasta DO₆₀₀ de 0,6, momento en que se adicionó IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y CuSO₄ a una concentración final de 1 mM. Las células se cosecharon por centrifugación a 5.000 g a 4 °C durante 10 minutos. Luego se resuspendieron en 10 ml de solución de sonicación (50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, y 5 mM DTT), y se sometieron a 3 pulsos de 30 segundos cada uno al 35 % de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600 (Sonics y Materials). El procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 20 minutos a 20.000 g y luego se realizó un corte con sulfato de amonio 45 %, conservando la fracción insoluble que fue colectada por centrifugación a 20.000 rpm durante 30 minutos. Se resuspendió el pellet obtenido en la solución de sonicación y se desaló mediante una columna de Sephadex G50 (HiTrap™ Desalting, Amersham Pharmacia Biotech) empleando para la corrida la misma solución. Posteriormente, se sembró en una columna de heparina (HiTrap™ Heparin HP 5 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de composición: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 y 5 mM DTT. La elución se realizó con la misma solución empleada para equilibrar la columna con un gradiente creciente de NaCl (0-1 M). La fracción de interés, colectada entre 0,8-0,85 M NaCl, se sembró en una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences). La corrida se realizó con una solución compuesta por 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, y 5 mM DTT. En todos los casos las corridas cromatográficas fueron realizadas en el equipo ÄKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech). Las fracciones colectadas de la columna que contenían a CueR y a CueR_{C120S} se

identificaron por análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie. Se adicionó un equivalente de CuSO_4 por monómero de CueR purificada.

20.2. Purificación de CpxR

Las cepa de *E. coli* M15 pRep4 pQE32::CpxR-6xHis (PB9721) fue crecida en LB suplementado con Amp y Km, con agitación constante a 37 °C hasta saturación del cultivo. Luego se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 300 ml de medio fresco. Se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6, momento en que se adicionó ITPG hasta una concentración final de 50 μM . El cultivo se cosechó por centrifugación a 6500 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Luego se resuspendió en 15 ml de solución de sonicación (20 mM Tris pH 7,4; 0,5 M NaCl y 5 mM imidazol), y se sometió a 10 pulsos de sonicación de 10 segundos cada uno al 15 % de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600 (Sonics y Materials). El procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. La suspensión obtenida se centrifugó durante 20 minutos a 20000 rpm. La fracción soluble se sembró en una columna de Ni-NTA (HisTrap™ 5 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de sonicación: 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 5 mM imidazol. Luego de la unión de la proteína se realizó un lavado de la columna con solución de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 40 mM imidazol). Finalmente, se eluyó la proteína con solución de elución (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 100 mM imidazol). Se seleccionaron las fracciones de interés mediante análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie y se procedió al desalado de las fracciones deseadas mediante una columna de Sephadex G50 (HiTrap™ Desalting, Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con buffer de desalado (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 50 mM NaCl).

Todas las corridas cromatográficas fueron realizadas en el equipo ÄKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech).

III.21. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de las proteínas purificadas según los procedimientos descritos anteriormente fue determinada midiendo absorbancia a 280 nm en un

espectrofotómetro modelo Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). La fórmula utilizada para el cálculo de la concentración fue la siguiente:

Concentración = $Ab_{S_{280nm}}$ /paso óptico de la cubeta x coeficiente de extinción molar (ϵ)

El coeficiente de extinción molar de una proteína (ϵ) está relacionado con la composición aminoacídica de la misma, particularmente con la cantidad de residuos de cisteína (C), triptófano (W) y tirosina (Y). Los coeficientes de extinción molar para CueR y CpxR fueron calculados según la siguiente fórmula:

$$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)} = nW \times 5500 + nY \times 1490 + nC \times 125$$

Donde "n" es el número de cada residuo W, Y y C, y los valores establecidos para las absorptividades molares a 280 nm de triptófano, tirosina y cisteína, respectivamente (Gill y von Hippel, 1989).

III.22. Electroforesis de proteínas

Los lisados celulares de las distintas cepas de *Salmonella* crecidas en presencia o ausencia de metales, así como las fracciones eluidas durante la purificación de CueR o CpxR nativas y de CueR mutante, se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Antes de la siembra, las muestras se calentaron 3 minutos a 100 °C en solución de siembra de proteínas, compuesta por 120 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,5 % (v/v) β -mercaptoetanol, 2 % (v/v) glicerol, 2 % (p/v) SDS y 0,002 % (p/v) azul de bromofenol. Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución reguladora 25 mM Tris base, 192 mM glicina pH 8,3 y 0,1 % (p/v) SDS, a una intensidad de corriente constante de 18 mA. La concentración de acrilamida utilizada en los geles de separación fue de 18 % (p/v) de una solución de acrilamida/bisacrilamida preparada en una relación 30:0,8. Luego de la corrida, los geles se tiñeron en una solución de 0,25 % (p/v) azul brillante de Coomassie R 250, 30 % (v/v) isopropanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 2 horas, y se destiñeron en una solución de 25 % (v/v) etanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 1 hora.

III.23. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (Western blot)

La detección de la expresión de CueP3xFLAG, *PcopACueP3xFLAG*, Δ *cpxR* *PcopACueP* y GroEL (control de carga) a partir de extractos celulares de *Salmonella* separados por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en el punto 21 fueron electro-transferidos a membranas de nitrocelulosa (General Electric Healthcare) en una cuba de transferencia semi-seca (Trans-blot SD, Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo con una solución conteniendo 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8,3 y 10 % (v/v) metanol, durante 30 minutos con una intensidad constante de 300 mA. Una vez terminada la transferencia, la membrana fue bloqueada con una solución de TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 137 mM NaCl) conteniendo 5 % (p/v) de leche en polvo descremada, durante 60 minutos con agitación. Luego se incubó la membrana con una dilución 1/500 de anticuerpos policlonales de conejo anti-GroEL o con una dilución 1/250 de anticuerpos monoclonales anti-FLAG (Sigma). Una vez finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS. Posteriormente, la membrana se incubó durante una hora con anticuerpo secundario anti-conejo (cuando se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-GroEL) o anti-ratón (en el caso de utilizar como anticuerpo primario el anticuerpo anti-FLAG) conjugada a fosfatasa alcalina, diluido 1/3000 en la misma solución TBS. Para el revelado, se realizó un lavado de 10 minutos con TBS y un lavado con una solución conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂. Luego, se colocó la membrana en una solución de la misma composición a la cual se le agregó 0,15 mg/ml BCIP y 0,3 mg/ml NBT disuelto en 70 % N-N-dimetilformamida y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente hasta desarrollo de color.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO I

La expresión de cueP está estrictamente controlada por la acción coordinada de CueR-Cu y de CpxR~P

IV. CAPÍTULO I

CueP es la principal cupro-proteína periplasmática que protege la envoltura de *Salmonella* del estrés por cobre y además es requerida para la sobrevivencia intracelular de este patógeno dentro de los macrófagos (Pontel y Soncini 2009; Osman y col. 2010; Yoon y col. 2014). El gen *cueP* es específico de *Salmonella* y fue originalmente identificado como parte del regulón Cue, bajo el control del sensor de cobre citoplasmático CueR (Pontel y Soncini 2009).

Durante el desarrollo de su tesis doctoral, el Dr. Lucas Pontel determinó que la expresión transcripcional de *cueP* se diferencia del resto de los genes del regulón CueR. Cuando se analizó el perfil de activación por Cu en función del tiempo de los distintos componentes del regulón Cue, como lo son *cueP*, *cueO* y *copA*, se observó un retraso temporal en la inducción de la transcripción de *cueP* por el metal respecto a los otros componentes. La expresión de *cueP* mostró un descenso en los primeros 120 minutos, y se observó un aumento paulatino durante todo el tiempo en que se ensayó el cultivo, llegando al máximo de expresión en el cultivo en fase estacionaria (Tesis Pontel, 2009). Este comportamiento se asemeja a la expresión del locus *cus* de *E. coli* en condiciones de aerobiosis (Thieme y col. 2008), que también alcanza un máximo de expresión de manera más tardía en comparación de *copA* y *cueO* (Thieme y col. 2008). Asimismo, y a diferencia de los otros genes del regulón Cue, se demostró que la inducción por cobre de *cueP* se observa en condiciones neutras (pH 7,0), y no en condiciones ácidas (pH 5,5) (Tesis Pezza, 2016). Esta regulación diferencial que controla o modula la expresión de *cueP*, condujo al grupo de trabajo al planteo de nuevos interrogantes en relación a la posible existencia de más de un modulador transcripcional de *cueP* y al rol fisiológico de este control.

La primera incógnita planteada, fue respondida por Alejandro Pezza durante su trabajo de tesis doctoral, demostrando que la expresión de *cueP* inducida por cobre, depende tanto de CueR como del regulador de respuesta CpxR. Este regulador de respuesta, perteneciente a uno de los principales sistemas de dos componentes CpxR/CpxA que monitorea la envoltura celular, activa la transcripción de *cueP* y

determina, junto con CueR, los niveles proteicos de CueP, los cuales están incrementados a pH neutro (pH 7) y en presencia de cobre (Tesis Pezza, 2016).

En mi trabajo de Tesis de Doctorado, nos planteamos dilucidar el rol fisiológico de esta regulación coordinada de *cueP* por parte de CueR y de CpxR/CpxA. Asimismo, nos propusimos profundizar en el estudio de los mecanismos regulatorios de la expresión de *cueP*, analizando aspectos mecanísticos del proceso de inicio de la transcripción.

IV.1. La expresión de *cueP* depende tanto del regulador de respuesta CpxR como de la quinasa sensora CpxA

En primer lugar evaluamos la contribución individual de cada regulador sobre la transcripción y la inducción mediada por Cu de *cueP*. En la Figura 12 A se evidencia que tanto la ausencia de *cpxRA* como de *cueR* ($\Delta cpxRA \Delta cueR$) impidió la inducción de *cueP* por cobre a pH 7 y que la sobreexpresión de CpxR o CueR de manera individual en este entorno, no promovió la expresión de *cueP* a los niveles observados en la cepa silvestre, por lo que, tanto el sistema Cpx como así también el regulador CueR son requeridos de manera simultánea para la expresión de esta proteína periplasmática en respuesta a cobre y a pH neutro, corroborando los resultados obtenidos por A. Pezza durante su trabajo de tesis.

Como se ha mencionado en la introducción, CpxR puede afectar la expresión génica, integrando la señal de la vía Cpx a nivel del citoplasma bacteriano, de manera independiente de las señales de la envoltura celular detectadas por la quinasa sensora CpxA (De Wulf y col. 1999; DiGiuseppe y Silhavy 2003). Por ejemplo, CpxR se puede activar de forma independiente de CpxA cuando las células se cultivan en presencia de un exceso de fuentes de carbono, como glucosa y piruvato (Wolfe y col. 2008); se postula que esta activación está mediada por la vía Pta-AckA, que genera acetil fosfato (AcPi) a partir de acetil-CoA (Wolfey col. 2008). Es por esto que nos propusimos analizar si la inducción de la expresión de *cueP* por el metal a pH 7, depende también de la proteína sensora CpxA. En primer lugar, mediante ensayos de actividad del reportero *lacZ* fusionado al promotor de *cueP* (*PcueP*), observamos que la delección de *cpxA* disminuye de manera significativa la inducción

transcripcional de *cueP* respecto a la cepa silvestre (Figura 12 A). Los niveles de expresión de *cueP* en un entorno $\Delta cpxA$ son similares a los observados tanto en un entorno $\Delta cpxR$ como en un fondo $\Delta cueR$, indicando que el sistema CpxR/CpxA intacto es necesario para que, simultáneamente con CueR, se module la activación de *cueP*. Se ha reportado que la sobreexpresión de la lipoproteína NlpE (proteína accesoria del sistema Cpx) estimula la vía Cpx mediante la integración de la señal por parte del dominio periplasmático de CpxA (Snyder y col. 1995; Suntharalingam y col. 2003). Para comprobar el requerimiento de CpxA para la activación transcripcional de *cueP*, realizamos medidas de actividad β -galactosidasa, sobreexpresando NlpE en la cepa que tiene el promotor de *cueP* CueR-independiente fusionado al gen *lacZ* (*cueP::lacZ* constitutivo/pNLPE). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB, a pH 5.5 con el agregado de IPTG para producir niveles elevados de NlpE y se utilizó como control positivo la cepa reportera *PcpxP::lacZ*, ya que *cpxP* forma parte del regulón Cpx (Price y Raivio 2009). Como se observa en la en la Figura 12 B, la sobreexpresión de NlpE mostró un incremento significativo en los niveles transcripcionales de *cueP* respecto a la cepa reportera con el vector vacío.

Estos resultados nos permiten concluir que la expresión de *cueP* depende también de la histidina quinasa CpxA, es decir, de un sistema Cpx intacto. La proteína sensora es necesaria para coordinar la señal del estrés de envoltura con la señal citoplasmática detectada por CueR. Asimismo, el descenso de los niveles transcripcionales de *cueP* en ausencia CpxA, aún en presencia del regulador de respuesta CpxR, sugiere que al menos en las condiciones ensayadas, la fosforilación y como consecuencia el control génico de *cueP* por parte de CpxR activo depende de CpxA y no de otras condiciones que también pueden activar a CpxR (Wolfe y col. 2008).

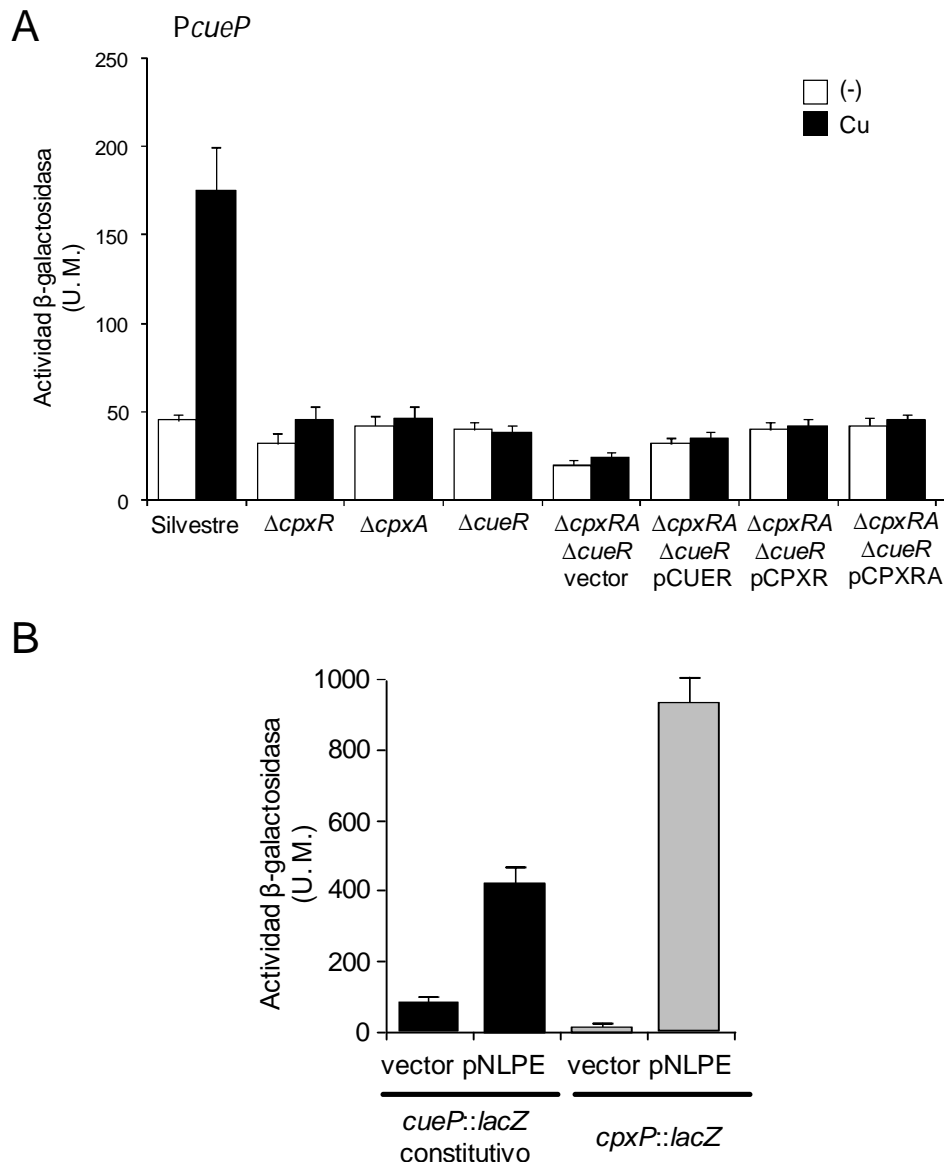


Figura 12. La expresión transcripcional de *cueP* inducida por Cu depende de la activación de CpxR por parte de CpxA. (A) Medidas de actividad β -Galactosidasa, Unidades Millers (U. M.), de la fusión transcripcional reportera *PcueP::lacZ* (*PcueP*) en un entorno silvestre como en la cepas mutantes $\Delta cpxR$, $\Delta cpxA$, $\Delta cueR$ y $\Delta cpxRA \Delta cueR$ transformadas con el plásmido pUHE-21-2 (vector), pCUER, pCPXR o pCPXRA según se indique. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 con o sin el agregado de 1 mM $CuSO_4$. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **(B)** La sobreexpresión de NlpE induce la transcripción de *cueP* desde el promotor CueR-independiente/CpxR-dependiente. Actividad β -Galactosidasa (U. M.) de la fusión transcripcional reportera *PcueP::lacZ* bajo el promotor independiente de CueR (*cueP::lacZ* constitutivo) expresada en una cepa transformada con el plásmido pUHE-21-2 (vector) o pNLPE. Los cultivos fueron crecidos a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 5,5 con el agregado de 100 μM de IPTG. La fusión transcripcional *cpxP::lacZ* fue utilizada como control positivo. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Colectivamente, todas estas observaciones demuestran que la transcripción de *cueP* depende de la activación simultánea del sistema de dos componentes CpxR/CpxA y de CueR. Esto es, la expresión de *cueP* requiere tanto de la presencia del ión metálico en el citoplasma, que es detectado por CueR, como así también del estrés de envoltura causado por el exceso de cobre, el cual es monitoreado por el sistema CpxR/CpxA.

Conociendo esto, nos preguntamos cuál es el rol fisiológico de esta co-regulación que restringe la expresión de CueP a bacterias que experimentan un exceso de cobre que genera estrés en sus envolturas celulares.

IV.2. Rol fisiológico de la regulación coordinada de *cueP*

2.1. La regulación coordinada de *cueP* es requerida para su rol en la resistencia a cobre

Como se menciona en la Introducción, el fenotipo en la resistencia al Cu por parte de CueP se observa principalmente en ausencia de oxígeno (Pontel y Soncini 2009). Para examinar el impacto de la regulación de CpxR sobre la expresión de *cueP* y en consecuencia, sobre el papel fisiológico de esta proteína periplasmática, se evaluó en primer lugar, la resistencia al cobre de una mutante que carece del sitio de reconocimiento de CpxR en el promotor de *cueP* (*cpxR-box**). Esta mutante presenta una expresión reducida de *cueP* de manera similar a las mutante en *cueR* y en *cpxR*, y es CpxR-independiente (Tesis Pezza, 2016). La mutante mostró una resistencia disminuida al cobre en condiciones anaeróbicas, presentando una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 250 μ M a cobre en comparación de la CIM de la cepa silvestre que fue de 400 mM (Figura 13). La resistencia a cobre de la mutante en la caja de reconocimiento de CpxR fue similar a la observada para la cepa mutante Δ *cueP* (200 μ M), lo que indica que la activación de *cueP* por CpxR es esencial para la resistencia al cobre en anaerobiosis mediada por CueP. La mutante Δ *cpxR* que carece del regulador de respuesta, mostró una marcada sensibilidad al ión metálico

en condiciones de anaerobiosis (100 μM) (Figura 13). Esto sugiere que otros factores que están bajo el control de CpxR estarían involucrados en la resistencia al cobre de *Salmonella Typhimurium*, además de CueP. Esto es similar a lo previamente reportado En *E. coli*, donde una mutante ΔcpxRA presenta una mayor sensibilidad a cobre respecto a la cepa silvestre en condiciones de aerobiosis (Yamamoto y Ishihama 2006). Todo esto indica que, tanto en *E. coli* como en *Salmonella Typhimurium*, el regulón Cpx juega un rol primordial en la tolerancia a cobre.

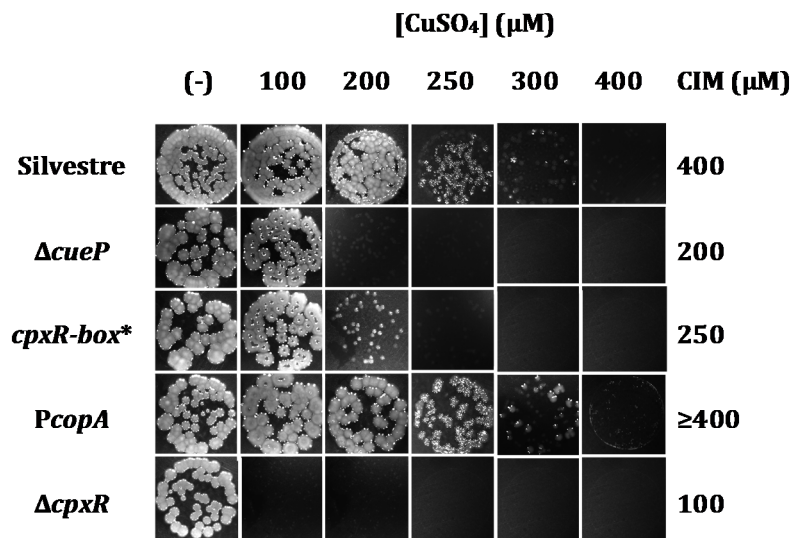


Figura 13. La regulación coordinada de *cueP* es requerida para su rol en la resistencia a cobre en anaerobios. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de Cu en anaerobiosis. Se muestran imágenes representativas de colonias de las cepas silvestre y mutantes ΔcueP , *cpxR-box**, *PcopA* y ΔcpxR . Las células fueron crecidas en placas de LB agar con el agregado de cantidades crecientes de CuSO₄ durante 72 horas a 37°C en una jarra de anaerobiosis.

2.2. La co-regulación de la expresión de CueP garantiza el crecimiento óptimo de *Salmonella Typhimurim* en aerobiosis y en condiciones de estrés oxidativo

Como ya hemos mencionado anteriormente, *cueP* forma parte de los regulones Cue y Cpx y codifica para una proteína que le brinda a *Salmonella* resistencia a Cu (Pontel y Soncini 2009). CueR promueve la transcripción de *cueP* en presencia del ion metálico en el citoplasma. Es probable que las señales detectadas en ambos compartimentos, en el citoplasma y en la envoltura bacteriana, por CueR y por CpxR/CpxA, respectivamente, se integren para garantizar el suministro de CueP al periplasma sólo en presencia del estrés por el metal en este compartimento.

Por lo que, una de las hipótesis planteadas es que la regulación coordinada de *cueP*, además de permitir su expresión en la condición recién mencionada, evita que *cueP* se exprese en situaciones no requeridas, particularmente en aquellas en las que la presencia de esta proteína puede ser desventajosa. En este sentido, como CueP es la principal cuproproteína periplasmática, su expresión descontrolada o desregulada podría impedir el suministro de cobre como cofactor de otras proteínas de la envoltura, afectando el crecimiento, particularmente en condiciones en las cuales el contenido del metal es bajo.

Se evaluó el efecto de la falta de control por parte del sistema Cpx sobre los niveles proteicos de CueP y sobre el crecimiento bacteriano. Para esto se construyó una cepa mutante en la que se reemplazó el promotor nativo de *cueP* por el de *copA* (*PcopA*) (Tesis Pezza, 2016). En esta cepa, la expresión de *cueP* depende de CueR pero es independiente de CpxR. Como se observa en la Figura 14 (A y B), la producción de CueP a partir del promotor de *copA* comienza más tempranamente y alcanza niveles más altos respecto a síntesis de CueP en la cepa silvestre. Niveles de expresión similares de CueP se observaron tanto en la cepa *PcopA* como en la $\Delta cpxR$ *PcopA* (Figura 14 A y 14 B), corroborando que la producción de CueP desde el promotor de *copA* no depende de CpxR.

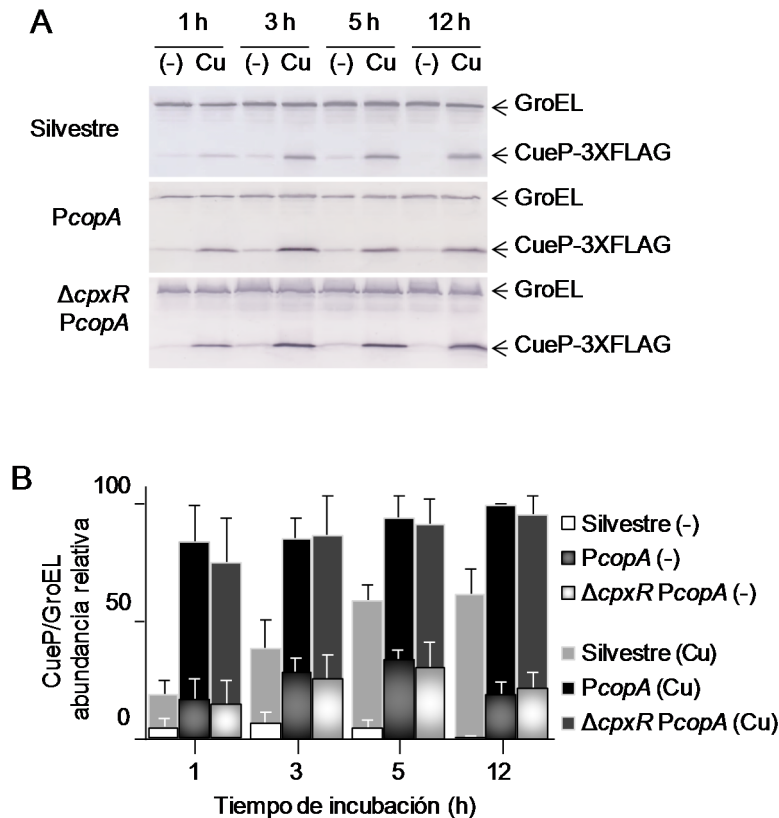


Figura 14. Detección y cuantificación de la expresión de la proteína CueP controlada por el promotor de *copA* (*PcopA*). (A) Análisis de la expresión de CueP por *Western blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Se sembraron 20 μ g de extractos proteicos totalescrudos obtenidos de las cepas *cueP-3XFLAG* (silvestre), mutante *PcopA-cueP-3XFLAG* (*PcopA*) y de la cepa *PcopA-cueP-3XFLAG* en un entorno $\Delta cpxR$ ($\Delta cpxR PcopA$). Las células fueron crecidas a 37°C durante los tiempos indicados, en medio LB con (Cu) o sin (-) el agregado de 1 mM CuSO₄. (B) La intensidad de las bandas en las membranas fue cuantificada con un software y relativizada a GroEL como control de carga. El gráfico de barras muestra el promedio de tres réplicas y las barras de error corresponden al desvío estándar. GroEL fue detectada utilizando anticuerpos policlonales anti-GroEL.

A diferencia de lo que ocurre desde el promotor de *copA*, la expresión de CueP desde su promotor nativo se induce por Cu a partir de las tres horas de exposición al metal, alcanzando un máximo entre las cinco y doce horas, es decir, durante la fase exponencial tardía y estacionaria de la curva de crecimiento. En esas fases de crecimiento se observa una diferencia marcada entre la ausencia y presencia de cobre exógeno (Fig. 14). Partiendo de que CueP es importante para la resistencia a cobre bajo anaerobiosis pero dispensable en presencia de oxígeno (Pontel y Soncini 2009) y que su expresión es más baja en fase de crecimiento exponencial temprana

(Fig. 14), se examinó si su expresión desregulada podría afectar el crecimiento en diferentes condiciones ambientales. Analizamos y comparamos el crecimiento de la cepa que expresa *cueP* bajo su promotor nativo (silvestre) con el de la cepa que expresa *cueP* bajo control del promotor de *copA* (*PcopA*) en condiciones de microaerobiosis; en aerobiosis y bajo estrés oxidativo, como por ejemplo el agregado de H₂O₂ exógeno. Estos experimentos se hicieron en presencia de una concentración subletal de 1 mM CuSO₄ para inducir la expresión de *cueP* bajo el promotor de *copA*. Analizamos también la curva de crecimiento en aerobiosis y en presencia de H₂O₂ de una cepa transformada con un plásmido que expresa niveles elevados de CueP, mayores aún que los producidos por la cepa *PcopA*. A su vez, durante el crecimiento en microaerobiosis y en presencia de 2,5 mM de H₂O₂, también evaluamos el crecimiento en ausencia de cobre exógeno.

En un ambiente microaerofílico, esto es, condiciones de crecimiento estático, en medio rico LB (sin y con 1 mM CuSO₄), no se detectaron diferencias en el crecimiento entre las cepas silvestre y *PcopA* (Figura 15), por lo que la falta de control de *cueP* por parte de CpxR no afecta el crecimiento cuando el oxígeno es limitado. Respecto a la ausencia total de oxígeno, se intentó comparar el crecimiento de la cepa silvestre y de la cepa *PcopA*, mediante el seguimiento de la densidad óptica de cultivos líquidos en función del tiempo haciendo uso de una cabina de anaerobiosis, pero los valores obtenidos de manera manual no nos permitieron realizar una curva de crecimiento; se alcanzó una DO_{600 nm} de 0,6 a las 4 horas de iniciado el cultivo, y esta DO se mantuvo estable y no varió durante los siguientes tres días. Sin embargo, evaluamos el efecto de la cepa que expresa a CueP de manera independiente de CpxR (*PcopA*) en la resistencia a cobre en anaerobiosis en medio sólido (Figura 13). Como era de esperar debido al papel ya demostrado de CueP en la tolerancia al metal, la cepa *PcopA* mostró una resistencia a cobre ligeramente mayor que la cepa silvestre en estas condiciones (CIM de 450 μM versus 400 μM).

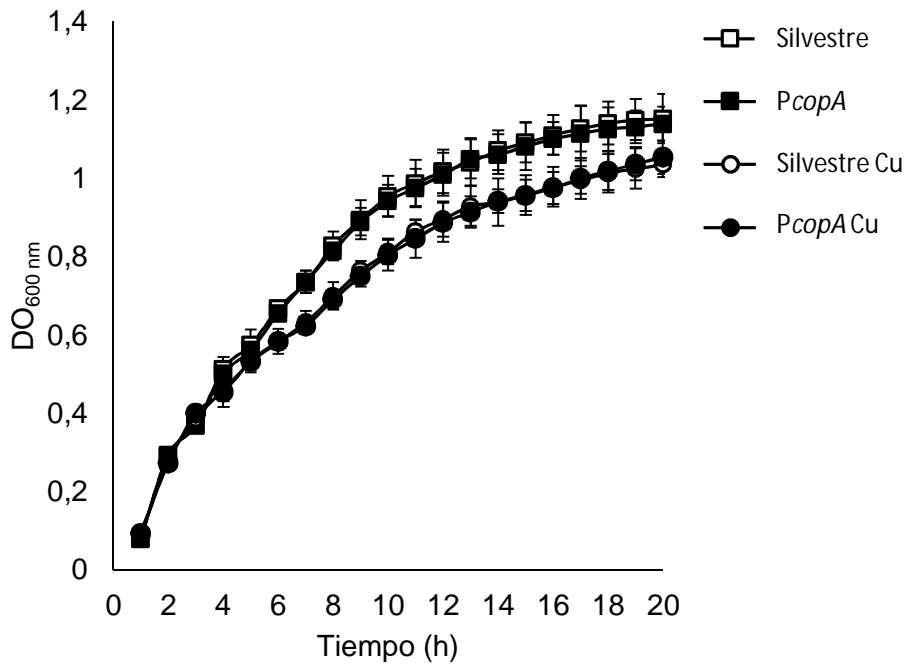
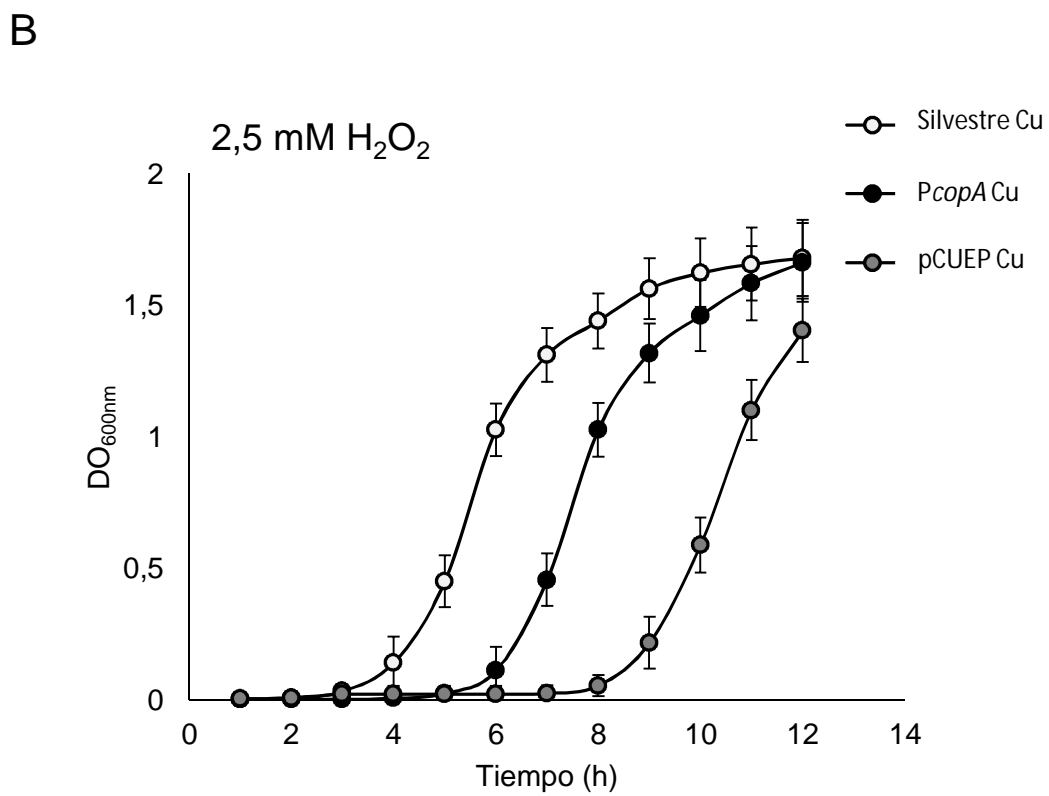
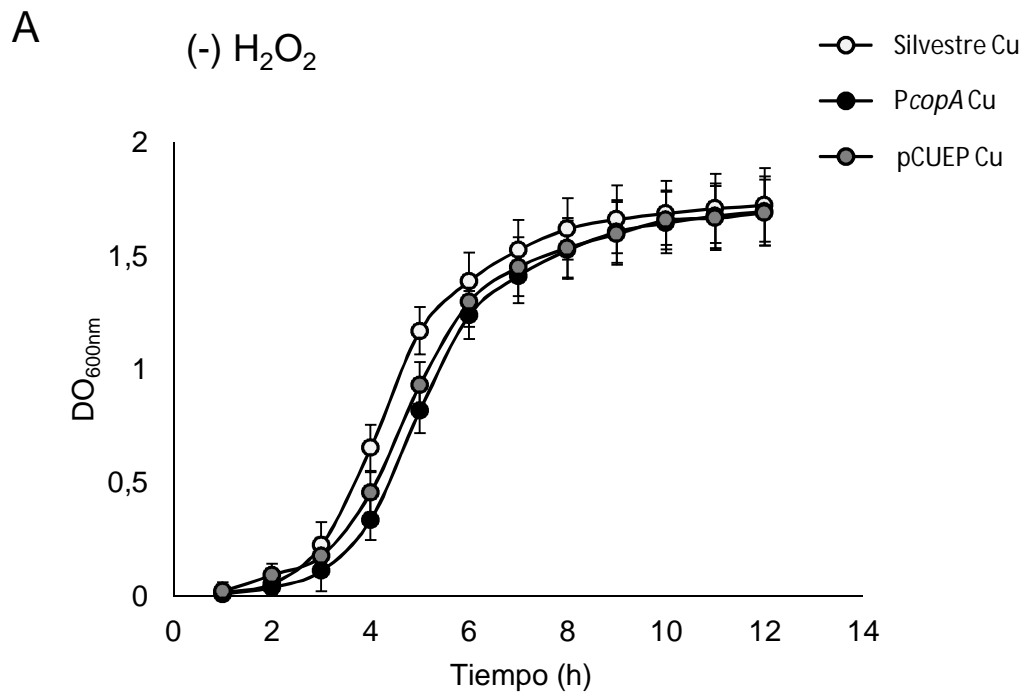


Figura 15. La desregulación de la expresión de *cueP* respecto a *CpxR* no afecta el crecimiento en condiciones de microaerobiosis. Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600nm} de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre como para una cepa mutante que expresa *cueP* bajo el promotor de *copA* (*PcopA*). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en condiciones estáticas sin o con el agregado de una concentración subletal de 1 mM de $CuSO_4$. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Por el contrario, en aerobiosis y con una concentración subletal de cobre (1 mM $CuSO_4$) la cepa *PcopA*, que expresa CueP sin el control de *CpxR*, presentó un retardo en el inicio de la fase exponencial a diferencia de la cepa silvestre (Figura 16 A). De manera similar, la cepa que expresa CueP desde un plásmido de alto número de copia (pCUEP), mostró el mismo retraso en el comienzo del crecimiento que la cepa *PcopA* (Figura 16 A). Es más, bajo condiciones de estrés oxidativo generadas por el agregado de peróxido de hidrógeno exógeno, la extensión de la fase *lag* de crecimiento presentado por la cepa *PcopA* fue más marcado, y de hecho no se observó crecimiento en presencia de 5 mM H_2O_2 , a diferencia de la cepa silvestre (Figura 16 B y C). La cepa que expresa a CueP desde el plásmido pCUEP, no fue capaz de crecer en presencia de 5 mM de H_2O_2 (Figura 16 B y C), y con 2,5 mM de H_2O_2 presentó un defecto mayor que la cepa *PcopA* (Figura 16 B), lo que sugiere una asociación directa entre los niveles incrementados de CueP y los defectos en el crecimiento de las bacterias en ciertas condiciones ambientales.



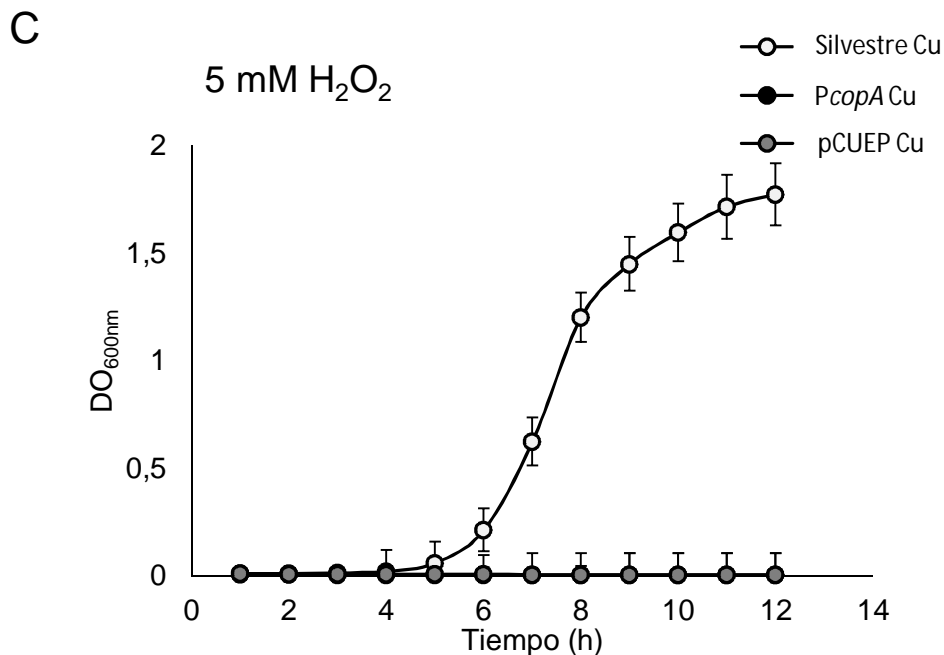


Figura 16. La coregulación de la expresión de CueP garantiza el crecimiento óptimo de *Salmonella Typhimurim* en aerobiosis y en condiciones de estrés oxidativo. (A-C) Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600nm} de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre que contiene el plásmido de expresión pUH vacío (Silvestre Cu), como para una cepa mutante que expresa *cueP* bajo el promotor de *copA* (*PcopA* Cu) que lleva también el mismo plásmido vacío y para una cepa que expresa CueP desde el pUH (pCUEP Cu). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en condiciones de agitación y en aerobiosis, con el agregado de una concentración subletal de 1 mM de CuSO₄. Asimismo fueron expuestos a 0 (A), 2,5 (B) y 5 mM (C) de H₂O₂ exógeno. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Durante el desarrollo de su tesis doctoral, Alejandro Pezza evaluó el crecimiento a distintas concentraciones de Cu entre las cepas silvestre y *PcopA* y no observó diferencias significativas en las curvas de crecimiento al aumentar la concentración del metal. Una de las hipótesis era que quizás las diferencias en los niveles de CueP podrían generar desbalances en el metalado de diversos componentes periplasmáticos, como por ejemplo en las enzimas Cu-Zn superóxido dismutasas SodCII (Osman y col. 2013). En adición a esto, se ha demostrado que CueP puede unir Cu y que una mutante $\Delta cueP$ acumula cobre en el periplasma, siendo CueP la principal cupro-proteína de este compartimento (Osman y col. 2010). Asimismo, se ha reportado en *E. coli* que el cobre puede proteger a las células que acumulan el metal y que se enfrentan a un estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno exógeno (Macomber y col. 2007), ya que bloquearía el daño oxidativo

generado por el hierro y el H_2O_2 , aunque no se ha demostrado el mecanismo de esa protección.

Todo esto sumado a nuestras observaciones que en condiciones de estrés oxidativo, niveles descontrolados de CueP afectan el crecimiento óptimo de las células, sobre todo en etapas tempranas donde naturalmente no se induce la expresión de CueP, nos permite postular que el daño se debe al secuestro del cobre, necesario como cofactor para ciertas enzimas o factores que participen en la defensa anti oxidativa que es requerido también para bloquear el daño oxidativo generado por el hierro y el peróxido de hidrógeno. En este sentido, observamos que el crecimiento de la cepa que expresa *cueP* bajo el control del promotor de *copA*, frente a 2,5 mM H_2O_2 , mostró una fase *lag* más prolongada que la observada durante el crecimiento en presencia simultánea de peróxido de hidrógeno y de 1 mM $CuSO_4$ (Figura 17, comparar símbolo cuadrado de color negro con círculo negro). Así, el agregado de concentraciones subletales de cobre exógeno podría restablecer el balance que se pierde al estar CueP expresada de manera descontrolada en condiciones no requeridas que pueden convertirse en desfavorables para el crecimiento de la bacteria.

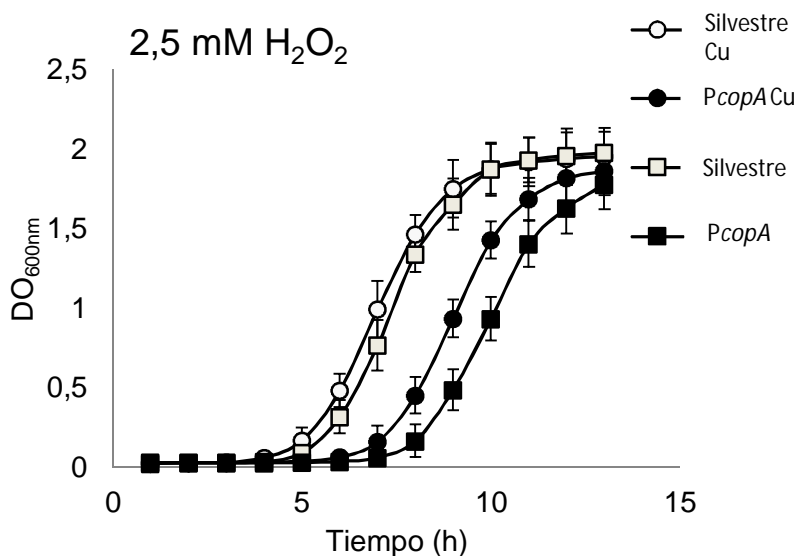


Figura 17. El cobre restablece el balance que se pierde al estar CueP expresada de manera descontrolada en condiciones de estrés oxidativo. Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600nm} (DO) de los cultivos a los tiempos indicados para la cepa silvestre (cuadrado vacío) y para la mutante que expresa *cueP* desde el promotor de *copA* (*PcopA*) (cuadrado color negro) en presencia de 2,5 mM de H_2O_2 . Según se indica para la cepa silvestre y para *PcopA*, círculo vacío y círculo negro, respectivamente, también se evaluó el crecimiento en presencia de 2,5 mM H_2O_2 y de una concentración de 1 mM $CuSO_4$. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Nuestros resultados indican que es necesario un control transcripcional estricto de *cueP* tanto para permitir su expresión bajo estrés por cobre en la envoltura celular como así también para evitar su presencia en situaciones donde no se la requiere. Por lo que la desregulación de *cueP* direccionada a una incrementada presencia de CueP en todo momento del crecimiento de la bacteria, sobre todo en fases tempranas, no es favorable para el *fitness* de la bacteria, definido como la capacidad bacteriana de sobrevivir y replicarse, principalmente durante el crecimiento bajo estrés oxidativo. Así, toma relevancia el control estricto de la expresión de CueP que se logra gracias a la acción coordinada de dos reguladores, CueR y CpxR/CpxA que detectan diferentes estímulos en compartimentos distintos.

IV.3. Regulación del inicio de la transcripción de *cueP*

3.1. La interacción productiva de la ARN Polimerasa con el promotor de *cueP* requiere tanto de CpxR fosforilado como de CueR activado por cobre

Se corroboró que ambos reguladores son necesarios para la interacción de la ARN polimerasa (ARNP) con el promotor de *cueP* mediante ensayos de protección frente a la ADNasa I, ya que cuando se incubó únicamente la ARNP con la región promotora de *cueP* no se observó ninguna protección contra la digestión con ADNasa I, y la adición de la ARNP con CueR-Cu o CpxR fosforilado (CpxR~P) no extendió la región protegida ya generada por ellos mismos. Sólo la incubación simultánea de los tres factores produjo una extensión de la región protegida hacia el sitio de inicio de la transcripción (Tesis Pezza, 2016).

Los reguladores de tipo MerR actúan como homodímeros, interaccionando con operadores en regiones promotoras blanco de la subunidad σ^{70} de la ARNP en bacterias Gram negativas (Newberry y Brennan 2004). Pueden ejercer una función dual, actuando como activadores o represores, mientras permanecen unidos al mismo sitio del ADN (Outten y col. 1999; Brown y col. 2003). En ausencia del inductor, el regulador (apo-MerR) permanece unido a la región promotora secuestrando la ARNP en un complejo cerrado. Como la unión del dímero de MerR curva el ADN, la subunidad α de la polimerasa unida al elemento -35, no

Se utilizó cianuro de potasio (KCN) para eliminar el cobre unido a CueR-Cu (Changela y col. 2003), y de esta manera dilucidar si es requerida la forma holo de CueR (CueR-Cu) para, conjuntamente con CpxR~P, promover la formación de complejos transcripcionalmente activos para modular la expresión de *cueP*. Asimismo, se empleó la proteína mutante CueR_{C120S}, construida en nuestro laboratorio, incapaz de unir cationes monovalentes (Ibáñez y col. 2015). Estos dos abordajes nos permitieron analizar cómo el metaloregulador CueR, en sus dos estados apo- y holo-CueR, afecta junto con CpxR~P la transcripción de *cueP*.

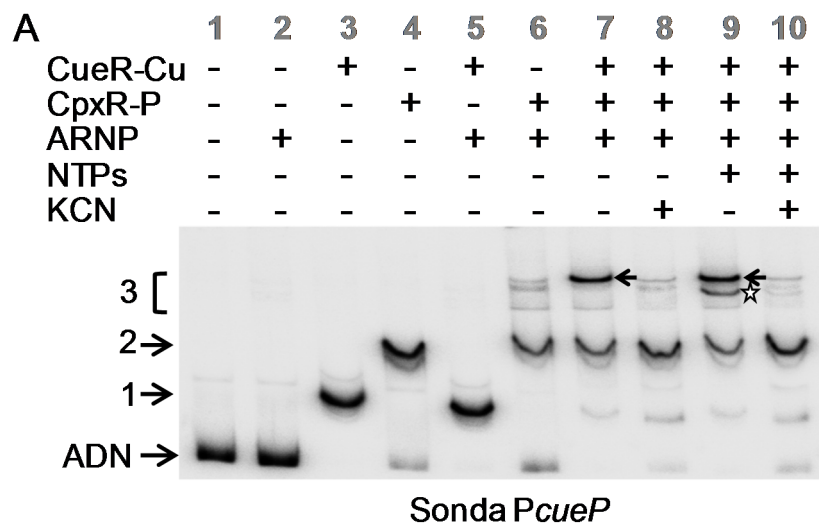
Además, los experimentos se realizaron en ausencia y en presencia de una mezcla de nucleótidos trifosfato (NTPs), de manera de evaluar la formación de complejos de iniciación y así estudiar otro punto clave de la regulación transcripcional. Al suministrar NTPs a los complejos formados entre la ARNP, CueR (en sus dos formas, -apo y -holo) y CpxR (en sus dos estados, fosforilada y no fosforilada) sobre el promotor de *cueP*, analizamos la competencia de los complejos formados a transitar o no a especies productivas para iniciar la transcripción.

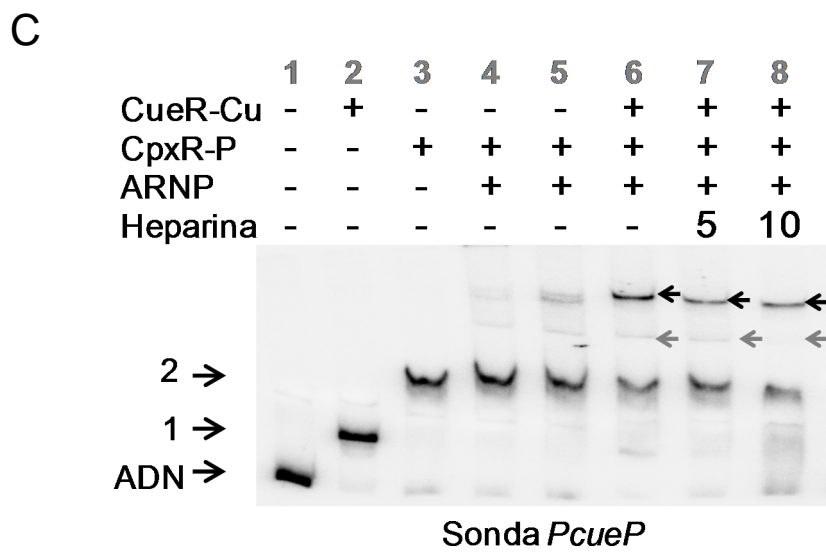
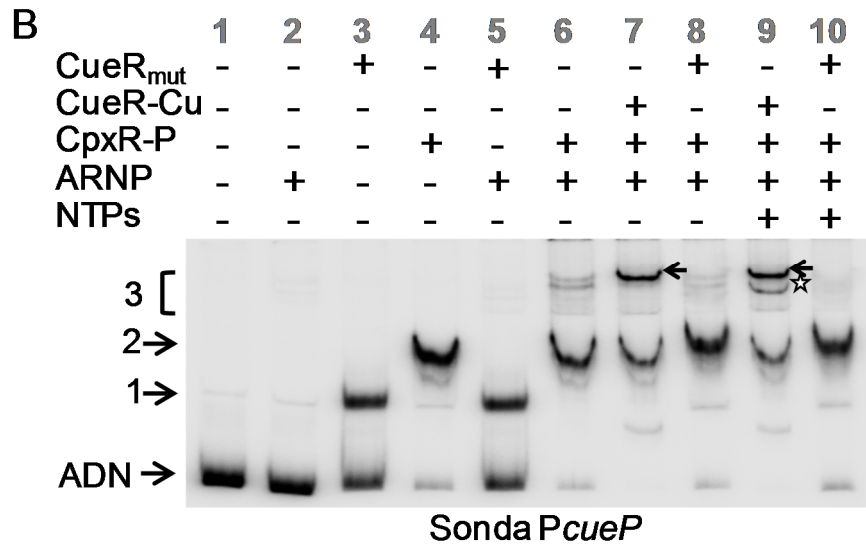
También se utilizó el competidor polianiónico heparina, de manera tal de evaluar la naturaleza de las especies observadas. Los complejos cerrados son inestables y se disocian cuando se los incubaba con heparina; en cambio, los complejos en su forma activa (abiertos) son estables al tratamiento con este competidor (Ross y Gourse 2009; Boulanger y col. 2015).

3.2. La formación de complejos estables y productivos requiere de la interacción ARNP/CueR-Cu/ CpxR~P con el promotor de *cueP*

Como se observa en la segunda calle de la Figura 19 A y B, y en la primera calle de la Figura 21, la incubación de la ARNP con el fragmento de ADN conteniendo el promotor de *cueP* produjo bandas muy leves de retardo en la migración electroforética (zona 3 de la figuras), indicando que, en ausencia de CueR y/o CpxR, la ARNP interacciona débilmente con la sonda de *cueP*. Este complejo formado es probablemente inactivo e inestable, ya que como se demostró en los ensayos de protección a la ADNasaI (Tesis Pezza, 2016), no se observa ninguna protección cuando únicamente está presente la ARNP con *PcueP*. El agregado conjunto de

CpxR~P y ARNP con la sonda de ADN (Figura 19 A, calle 6), incrementó la intensidad de estas bandas retardadas; esto no ocurrió con el agregado conjunto de CueR-Cu y ARNP (Fig. 19 A, calle 5). Estos resultados sugieren que CpxR es responsable del reclutamiento de la ARNP a la región promotora de *cueP*, mientras que CueR no estaría involucrado en este proceso. La adición simultánea de los tres factores (CueR-Cu, CpxR~P y ARNP) aumentó la intensidad de una banda de baja movilidad (Fig. 19 A, flecha en calle 7), con la desaparición de la sonda libre. Esta banda bien definida, apenas más retardada que los complejos que le dan origen, corresponde a un complejo transcripcionalmente activo ya que la adición de NTPs generó un complejo de iniciación de mayor migración electroforética (Fig. 19, estrella en calle 9). Este complejo es además estable frente al agregado de heparina (Figura 19 C), indicando que se trata del complejo abierto, a diferencia de los complejos formados entre CpxR~P y el ADN que se disocian por el tratamiento con heparina, y en consecuencia conforman complejos cerrados (Figura 19 C).





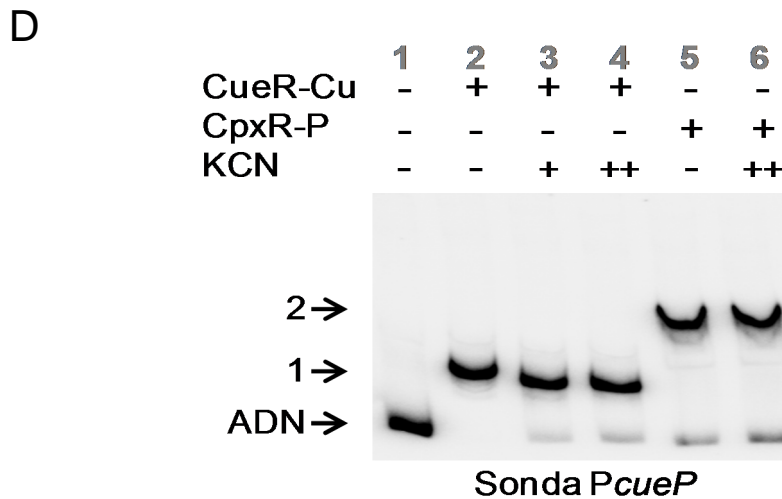


Figura 19. La interacción productiva de la ARNP con el promotor de *cueP* requiere de CpxR-P y del regulador CueR en su forma activada por Cu (CueR-Cu). (A-D) Análisis de retardo de la movilidad electroforética llevado a cabo utilizando 6 fmol del fragmento amplificado por PCR de la región promotora de *cueP* silvestre marcado en el extremo 3' con ^{32}P con el agregado de 0,5 μM de CueR-Cu purificada (pre-tratada con KCN o no, según se indique) o 0,5 μM CueR_{C120S}, 1 μM de CpxR-P (pre-incubada con acetil fosfato), 0,2 μM de ARNP y con 250 μM de una mezcla de NTPs (GTP, ATP y UTP), según se indica. **(A y B)** ADN representa el fragmento de PCR sin retardo, 1 y 2 son los fragmentos retardados por CueR-Cu o CueR_{C120S} y por CpxR-P, respectivamente. 3 muestra los complejos de baja intensidad más retardados que 1 y 2. La flecha negra indica los super-retardos (complejos abiertos) de mayor intensidad, observados por la presencia de CpxR-P, CueR-Cu y la ARNP. La estrella indica los complejos de iniciación, observados únicamente por la interacción CpxR-P/CueR-Cu/ARNP y los NTPs. **(C)** Los complejos CueR-Cu/CpxR-P/ARNP con el promotor de *cueP* son resistentes al tratamiento con el competidor heparina. El complejo abierto formado por los tres factores sobre el promotor de *cueP* fue enfrentado a una concentración final de heparina 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 5 y 10 minutos, según se indica, antes de sembrar las muestras para su corrida electroforética. Estos complejos abiertos son resistentes al tratamiento con heparina, indicados con una flecha negra. En cambio, los complejos inestables se disrumen, sobre todo a los 10 minutos de tratamiento, flecha gris que se evidencia también con una mayor intensidad en la sonda libre (calle 8). **(D)** Control de que el KCN no afecta los complejos formados entre CueR-Cu /ADN y CpxR-P/ADN. Estos complejos se trataron con 100 (+) y 300 μM (++) de KCN durante 30 minutos, según se indica. 1 y 2 indica los fragmentos retardados por CueR-Cu y por CpxR-P, respectivamente.

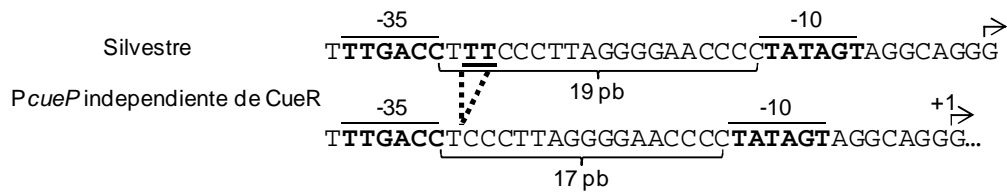
Como se observa al comparar entre las calles 7 y 8, 9 y 10 de la Figura 19 A, CueR activado por cobre (CueR-Cu) es requerido para la interacción productiva de la ARN polimerasa con *PcueP*, ya que la presencia de cianuro de potasio (KCN) disminuyó la formación de los complejos abiertos (comparar las calles 7 y 8 de la figura 19 A) y de iniciación (comparar las calles 9 y 10 de la figura 19 A) mientras que no afectó la interacción de CueR o CpxR al fragmento de ADN (Figura 19 D). Asimismo, al utilizar la proteína mutante, CueR_{C120S}, que no une Cu (Ibáñez y col. 2015), se produjo un retardo de la sonda similar al del regulador CueR de tipo silvestre. Sin embargo fue incapaz de generar los complejos abierto o de iniciación (Figura 19 B, calles 8 y 10). Los resultados anteriores sugieren fuertemente que CpxR-P es necesario para la formación de complejos estables activos transcripcionalmente con la ARNP, mientras que CueR-Cu, como un típico regulador

de tipo MerR, facilita la orientación apropiada de los elementos -35 y -10. En un promotor dependiente de CueR, estos elementos se separan por 19 pb, una distancia mayor que la de 17 ± 1 pb presente en un promotor σ^{70} típico. La distorsión del ADN por CueR activado por cobre es necesaria para el reconocimiento del promotor por parte de la ARN polimerasa (Philips y col. 2015). En el promotor de *cueP*, la distorsión del ADN puede ser necesaria pero no suficiente para su transcripción.

3.3. Las interacciones activas y productivas de la ARNP con el promotor óptimo de *cueP* requieren únicamente de CpxR-P

Para que se forme el complejo de inicio de la transcripción, es necesario que CueR-Cu acomode las cajas -35 y -10, que en estos promotores están separadas por 19 pb, permitiendo la interacción productiva de la ARNP con el promotor de *cueP*.

A



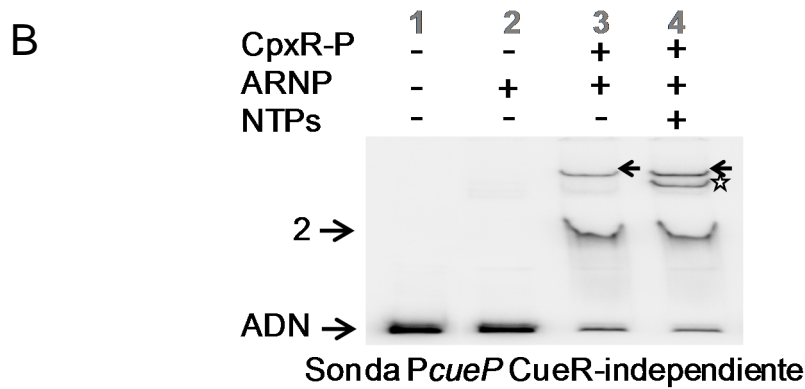


Figura 20. CueR facilita la orientación espacial de los elementos del promotor de *cueP*, condición necesaria pero no suficiente para la formación de un complejo de iniciación de la transcripción. **(A)** Secuencia de ADN de la región promotora de *cueP* silvestre e “independiente de CueR”. Las dos bases (TT) delecionadas dentro del espaciamiento entre los elementos -10 y -35 están marcadas en negrita y subrayadas. Se indican las cajas -10 y -35 (con líneas sólidas y en negrita) y el sitio de inicio de la transcripción (+1 y flecha). **(B)** Análisis de retardo de la movilidad electroforética llevado a cabo utilizando 6 fmol del fragmento amplificado por PCR de la región promotora de *cueP* «independiente de CueR» marcado en el extremo 3' con ³²P con el agregado de 0,5 μM de CpxR purificada y preincubada con acetil fosfato, y con 0,2 μM de ARNP, según se indica. ADN indica el fragmento de PCR sin retardo, 2 es el fragmento retardado por CpxR. La flecha negra indica los super-retardos (complejos abiertos) observados por la presencia de únicamente CpxR~P y la ARNP sobre el promotor de *cueP* CueR-independiente. La estrella indica el complejo de iniciación, observado únicamente por la interacción CpxR~P y la ARNP más el agregado de los NTPs, con la sonda *P_{cueP}* CueR-independiente.

La deleción de 2 pb entre las cajas -35 y -10 genera un promotor con un distanciamiento óptimo de 17 pb (Figura 20 A) que no requiere de CueR para su transcripción. De hecho, la expresión de *cueP* desde este promotor mutado es máxima e independiente de CueR. Sin embargo, este promotor requiere de la activación por CpxR (Tesis Pezza, 2016).

Mediante análisis de retardo de la movilidad electroforética usando como sonda de ADN la región del promotor independiente de CueR observamos que los complejos activos que transitan a complejos de iniciación requieren únicamente de la interacción ARNP y CpxR~P sobre este promotor (última calle Figura 20 B), demostrando que CpxR~P es esencial para el reclutamiento de la RNAP sobre el promotor de *cueP* para iniciar su transcripción.

De los resultados de estas dos últimas secciones podemos postular que la activación de la vía de señalización Cpx causada por un estrés de la envoltura, promueve el reclutamiento de la ARNP en la región promotora de *cueP*. Sin embargo, estos complejos cerrados sobre el promotor de *cueP* no transitan a complejos abiertos y de iniciación debido a la conformación espacial desfavorable de los

elementos del promotor -10 y -35. La activación de CueR por presencia de Cu en el citoplasma, re orienta estos elementos pero la transcripción no se inicia debido a que la ARNP no es reclutada por este activador transcripcional tipo MerR. Únicamente la activación simultánea de CpxR y CueR promueve la interacción productiva de la ARNP con el promotor de *cueP*, permitiendo la formación de complejos activos y de inicio de la transcripción.

Esto puede explicarse por la naturaleza (o identidad) de CueR, metaloregulador de la familia MerR que responde a cobre. Como se ha mencionado en la Introducción, CueR regula tanto a *cueO* como a *copA*, cuyos productos ayudan a eliminar el cobre de la célula bacteriana. Recientemente, se ha demostrado que la ARNP puede formar dos tipos de complejos sobre el promotor subóptimo de *copA*: un complejo cerrado "sin salida" y un complejo abierto (Martell y col. 2015), constituyendo una vía mecánica ramificada para la iniciación de la transcripción, a diferencia de la prevalente vía lineal para las interacciones de la ARNP con los promotores óptimos. Capitalizando esta vía ramificada, en la forma apo-CueR (represor) se refuerza el dominio del complejo cerrado "sin salida" para reprimir la transcripción. En cambio, en su estado holo-CueR (activador), las interacciones se desplazan a la formación del complejo abierto para promover la transcripción. Así, un promotor regulado por CueR, activador transcripcional que trabaja por mecanismos conformacionales y no por reclutamiento de la ARNP, sólo requiere al metaloregulador ya que sus cajas -35 y -10 no presentan la separación óptima. Si se anula esta distancia subóptima, la transcripción de los genes regulados únicamente por CueR sería activa sin necesidad de que participe este regulador. En la Figura 20 se demuestra que CueR no es esencial para el reclutamiento de la ARNP sobre el promotor óptimo de *cueP*. Sobre este promotor sólo se requiere la presencia de CpxR para la interacción completa y productiva de la ARNP (Fig. 20) que promueve el inicio de la transcripción de *cueP*.

3.4. El complejo de iniciación es estable al tratamiento con heparina

En el promotor de *cueP*, la adición de GTP, ATP y UTP permite la síntesis de un transcrito de 9 nucleótidos antes de que se requiera la adición del cuarto

nucleótido CTP. Como ya se ha mencionado, la interacción de la ARNP con CpxR~P y con CueR-Cu, no así con apo-CueR o CueR_{C120S}, más la adición de la mezcla de NTPs, resultó en la formación de una especie discreta e intensa, cuya naturaleza es la de un complejo de iniciación. Para evaluar su estabilidad, se enfrentó este complejo al competidor heparina que disocia las especies inestables y/o inespecíficas (Ross y Gourse 2009; Boulanger y col. 2015). Como se observa en la Figura 21, al comparar las calles 6 (sin tratamiento con heparina) y 8 (+ heparina), recuadradas con una línea discontinua, el complejo de iniciación (estrella) permanece estable al tratamiento con este competidor, lo que es consistente con la naturaleza estable y específica de este complejo. Asimismo, se observa, que los complejos inestables son desarmados aumentando la intensidad de la sonda libre, sin retardo, cuando está presente la heparina (flechas grises de las calles 6 y 8, sonda libre).

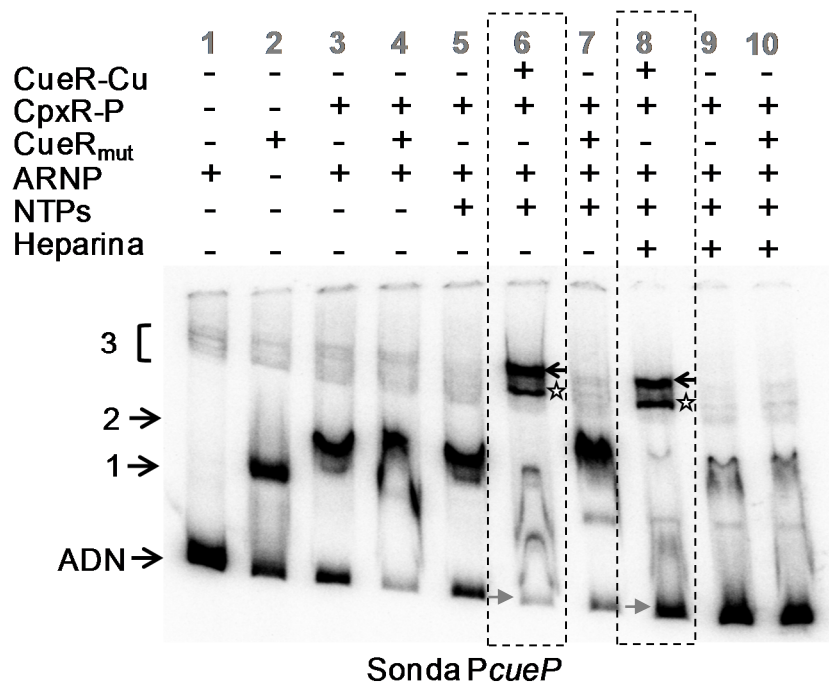


Figura 21. CpxR~P es requerido para la formación de complejos activos que promueven el inicio de la transcripción de *cueP*. Análisis de retardo de la movilidad electroforética llevado a cabo utilizando 6 fmol del fragmento amplificado por PCR de la región promotora de *cueP* silvestre marcado en el extremo 3' con ³²P con el agregado de 0,5 μM de CueR-Cu purificada o 0,5 μM de CueR_{C120S}, 0,5 μM de CpxR~P (pre-incubada con acetil fosfato, + ACP), 0,2 μM de ARNP, y con 250 μM de una mezcla de NTPs (ATP, GTP y UTP) según se indica. ADN representa el fragmento de PCR sin retardo, 1 y 2 son los fragmentos retardados por CueR_{C120S} y por CpxR~P, respectivamente. 3 muestra los complejos de baja intensidad más retardados que 1 y 2, y que serían complejos inestables. La flecha negra indica los super-retardos (complejos abiertos) observados por la presencia de CpxR~P, CueR-Cu y la ARNP. La estrella indica los complejos de iniciación, observados únicamente por la interacción CpxR~P/CueR-Cu/ARNP y los NTPs. Las muestras sembradas en las tres últimas calles fueron previamente tratadas durante 10 minutos con el competidor heparina.

3.5. La fosforilación de CpxR controla la formación de complejos abiertos activos transcripcionalmente

Las señales que activan a los sistemas de dos componentes promueven la fosforilación de los reguladores de respuesta (RR) y es este estado fosforilado el que generalmente lleva a cabo las funciones específicas como la unión al ADN y el control transcripcional (Mitrophanov y Groisman 2008). En general, el estado fosforilado del RR presenta mayor afinidad a sus genes blanco que la forma no fosforilada. Muchos RR caracterizados, como los de la subfamilia OmpR/PhoB a la cual pertenece CpxR, exhibieron cambios después de la fosforilación, entre ellos la oligomerización (Fiedler y Weiss 1995; Leoni y col. 2003; Lejona y col. 2004). La fosforilación puede mediar la dimerización de los RR y se hipotetiza que esto promueve la unión al ADN y a su vez, puede favorecer la activación de la transcripción (Gao y Stock 2010). La mayoría de los RR son activos sólo cuando están fosforilados (Mitrophanov y Groisman 2008). Los experimentos presentados previamente fueron realizados con CpxR~P. Nos propusimos caracterizar los complejos de transcripción formados por la ARNP, CueR-Cu y el RR CpxR de *Salmonella Typhimurium* tanto en un estado mayormente fosforilado por el agregado de acetil fosfato (+ ACP) como no fosforilado (- ACP).

En primer lugar, se observó que únicamente CpxR~P (+ ACP) provocó un retardo de la movilidad electroforética del ADN *PcueP*, formándose un complejo de gran intensidad (calle 2, Figura 22). Este complejo no se observó cuando se incubó la sonda *PcueP* con CpxR no fosforilado, sin tratamiento con ACP (calle 6). Esto indica que la fosforilación de CpxR permite la unión de este regulador de respuesta al ADN. En este experimento no se ensayó la ARNP sola, pero sí se analizó la interacción entre ARNP/CpxR~P y ARNP/CpxR, observándose en ambos casos (calles 3 y 7) la formación de complejos retardados, de baja intensidad, que podrían ser de naturaleza de tipo complejo cerrado, ya que al incubarse con el otro activador, CueR-Cu, se forma un complejo sutilmente más retardado de mayor intensidad (calle 4 y 8). Esto sugiere que los complejos cerrados se estabilizan y transitan a complejos abiertos. La estabilidad de estos complejos no fue evaluada por enfrentamiento con heparina.

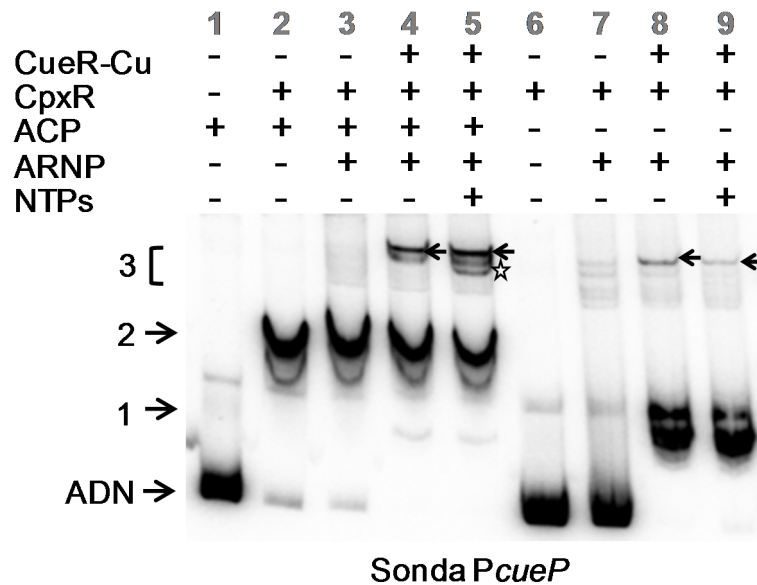


Figura 22. CpxR~P es requerido para la formación de complejos activos que promueven el inicio de la transcripción de *cueP*. Análisis de retardo de la movilidad electroforética llevado a cabo utilizando 6 fmol del fragmento amplificado por PCR de la región promotora de *cueP* silvestre marcado en el extremo 3' con ^{32}P con el agregado de 0,5 μM de CueR-Cu purificada, 0,5 μM de CpxR~P (pre-incubada con acetil fosfato,+ ACP) o 0,5 μM de CpxR (no tratada con ACP), con 0,2 μM de ARNP y con 250 μM de una mezcla de NTPs (GTP, ATP y UTP), según se indica. ADN representa el fragmento de PCR sin retardo, 1 y 2 son los fragmentos retardados por CueR-Cu y por CpxR~P, respectivamente. 3 muestra los complejos de baja intensidad más retardados que 1 y 2, y que son producto de la interacción CpxR~P/ARNP y CpxR/ARNP y que serían complejos cerrados. La flecha negra indica los super-retardos (complejos abiertos) observados por la presencia de CpxR~P, CueR-Cu y la ARNP o por la presencia de CpxR no fosforilado, CueR-Cu y la ARNP. La estrella indica los complejos de iniciación, observados únicamente por la interacción CpxR~P/CueR-Cu/ARNP y los NTPs.

CpxR no fosforilado permite la formación de un complejo abierto con CueR-Cu y la ARNP de manera similar a CpxR~P (calle 8 de la Figura 22), pero claramente en menor proporción, ya que la intensidad de la banda es mucho menor respecto a la que forma cuando se encuentra en su estado fosforilado (calle 4). Esta intensidad más tenue se correlaciona con una menor afinidad por el promotor de *cueP*. Asimismo, al agregar una mezcla de NTPs, no se evidencia el complejo de iniciación (calle 9, Figura 22), formado cuando CpxR fue pre-incubada con ACP (calle 5, estrella), lo que sugiere que el complejo entre los tres factores (CpxR/CueR/ARNP) y el promotor de *cueP* es inactivo y es incapaz de transitar a una especie competente para iniciar la transcripción si CpxR no se encuentra fosforilado. La intensidad tenue de los complejos formados entre CpxR no fosforilada /CueR y la ARNP (calle 8), sumado a que no transitan a complejos de iniciación (calle 9), sugiere que son de naturaleza no productiva e inestables, por lo que no se activaría la transcripción de *cueP*. Es claro que la fosforilación de CpxR por ACP, promueve de manera

significativa la unión al promotor de *cueP* y la formación de complejos activos para inducir el inicio de la transcripción *in vitro*. El uso de la variante CpxR_{D51A} incapaz de fosforilarse, ya que carece del residuo conservado de aspartato fosforilable, nos permitiría concluir de manera inequívoca.

La fosforilación de CpxR estabiliza su conformación activa, lo que promueve que junto con CueR-Cu y la ARNP, se formen complejos activos capaces de iniciar la transcripción del promotor de *cueP*. En contraste, la generación de complejos abiertos, pero no productivos entre la RNAP, CueR-Cu y CpxR no fosforilado indica que no se activa la transcripción de *cueP* cuando CpxR no se encuentra fosforilado. Si suponemos que *in vivo* se producen estos complejos abiertos, que transitan a complejos activos, para el caso de CpxR~P, o a complejos no productivos, para CpxR sin fosforilar, se puede plantear, por un lado, que estas especies no productivas formadas con CpxR no fosforilado podrían estar en un estado de espera, que puede cambiar rápidamente, cuando se produce la fosforilación frente a condiciones inductoras y así, transitar hacia formas activas y productivas. Sin embargo, no se realizó un experimento *in vitro* con el agregado de ACP o CpxR~P para evaluar la posibilidad de conversión de estas especies inactivas a complejos de iniciación en presencia de NTPs. Asimismo, estas condiciones de fosforilación pueden ser diferentes a las encontradas *in vivo* por parte de CpxA. Por otro lado, frente al escenario de que tanto CpxR como también CpxR~P forman complejos abiertos, aunque luego direccionados a un final distinto, se podría pensar que esto le otorgaría una ventaja al patógeno *Salmonella* para eliminar rápidamente la activación transcripcional de *cueP* una vez que la señal que fosforila a CpxR es removida. De esta manera, se podría desactivar la expresión de *cueP* cuando las condiciones no son las apropiadas para su producción, como aquellas que pueden afectar el *fitness* bacteriano, como ha sido demostrado y discutido en la sección 2.2 de este Capítulo.

IV.4. Conclusiones Capítulo I

Se demostró que a pH neutro, la expresión de *cueP* requiere de la proteína sensora histidina quinasa CpxA que activa mediante fosforilación a la proteína reguladora de la respuesta CpxR. De esta manera, la activación de CpxR depende de la señal de la envoltura sensada por CpxA, coordinándose esta señal con la detectada en el citoplasma por CueR. La necesidad de un sistema Cpx intacto para la activación de *cueP* se demostró también al estimular esta vía por sobreexpresión de la lipoproteína de membrana NlpE.

Evaluamos el rol de la regulación de *cueP* por parte de CpxR en la homeostasis de Cu en anaerobiosis. Ensayos de resistencia al Cu independizando la expresión de CueP por parte de CpxR en detrimento de sus niveles, mediante la mutación del sitio de reconocimiento de CpxR, indican que la función de CueP frente al estrés por cobre en anaerobiosis depende de la regulación coordinada por parte de CpxR y de CueR. Cuando los niveles de CueP son menores se ve afectada la sobrevivencia de *Salmonella* frente al estrés por cobre en anaerobiosis, prácticamente de la misma manera que en ausencia de CueP.

Teniendo en cuenta que CueP participa en la resistencia a cobre, sobre todo en anaerobiosis, se evaluó si la regulación de *cueP* por CpxR tiene implicancias fisiológicas en condiciones de crecimiento donde no se ha observado un rol significativo de esta proteína. Se logró independizar la expresión de CueP por parte de CpxR, esta vez direccionada a una expresión descontrolada del producto de *cueP*, haciendo que dependa únicamente de CueR. Se demostró que esta desregulación produce niveles elevados de CueP en todas las etapas de la curva del crecimiento bacteriano, sobre todo, durante la fase exponencial temprana, situación contraria a los niveles silvestres de CueP. La incapacidad de controlar estrictamente los niveles de CueP, afecta sutilmente el crecimiento de *Salmonella* en aerobiosis, pero de manera muy notoria bajo estrés oxidativo generado por H₂O₂ exógeno. Esto sugiere la posibilidad de que la concentración de CueP en la envoltura puede afectar el metalado de componentes que intervienen en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno.

Mediante retardo de la movilidad electroforética se demostró que CueR en su forma desmetalada apo-CueR, ya sea por el uso de KCN o de la mutante CueR_{C120S}, es capaz de reconocer y unirse a la región promotora de *cueP*; sin embargo es incapaz de formar complejos abiertos transcripcionalmente activos. De esta manera, sólo la unión del efector al metaloregulador CueR (CueR-Cu) provoca el cambio conformacional necesario para que junto con CpxR~P se produzca una interacción productiva con la ARN polimerasa para formar complejos de iniciación. Asimismo se determinó que la forma activada de CueR, CueR-Cu, sólo es necesaria para el reacomodamiento adecuado de los elementos -35 y -10 del promotor de *cueP* y CueR-Cu no participa en el reclutamiento de la ARNP. En este sentido, CpxR~P es esencial para este proceso.

La fosforilación de CpxR con acetil fosfato, *in vitro*, es esencial para determinar la naturaleza de los complejos de transcripción sobre el promotor de *cueP*. La ARN polimerasa únicamente establece complejos abiertos competentes para la transcripción productiva de *cueP* cuando existe una interacción con CueR y con CpxR en su estado fosforilado. De esta manera CpxR~P promueve la formación de complejos abiertos y de iniciación.



CAPÍTULO II

Caracterización funcional y transcripcional de scsABCD. Análisis de los sistemas tipo tiorredoxinas que protegen la envoltura celular de S. Typhimurium

V. CAPÍTULO II

El cobre es un micronutriente esencial tanto para los microorganismos patógenos como para sus hospedadores. Sin embargo, su elevada reactividad hace que sea tóxico. Esto lo convierte en un efectivo agente antimicrobiano y recientemente se lo ha asociado con la capacidad del hospedador de restringir el crecimiento de microorganismos invasores (Hood y Skaar 2012; Porcheron y col. 2013; Chaturvedi y Henderson 2014). De esta manera, el cobre se encuentra entre las señales, tanto dentro como fuera del hospedador, más ampliamente reconocidas por bacterias patógenas (Wolschendorf y col. 2011; Becker y Skaar 2015; Palmer y Skaar 2016). Como se ha mencionado en la Introducción, los mecanismos utilizados por *Salmonella* para resistir la toxicidad causada por el exceso de Cu presentan algunas diferencias con lo reportado previamente en *E. coli*, sobre todo en lo que respecta a la protección de la envoltura bacteriana (Pontel and Soncini 2009; Pontel, Checa, y Soncini 2015). En este sentido, se hacen relevantes otros sistemas de respuesta a estrés periplasmático que pueden activarse para contrarrestar la presencia del metal o aliviar el estrés debido al daño ocasionado.

V.1. Los genes *scsABCD* se inducen por cobre

Con el objeto de caracterizar globalmente los mecanismos que gatilla *Salmonella enterica* ante el exceso de Cu, en el grupo de trabajo se realizó un análisis transcripcional de la respuesta de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediante el uso de microarreglos de tipo *tiling*, luego de 10 minutos de exposición a concentraciones subletales de cobre y zinc (Pontel y col. 2014). Los resultados de estos ensayos mostraron que los genes *scsA*, *scsB*, *scsC* y *scsD* se encontraban entre aquellos fuertemente inducidos por Cu, tanto en medio rico (SLB) como en medio mínimo (M9) (Figura 23), pero no se observó su inducción en presencia de Zn (Fig. 23). Esto sugiere que la transcripción de los genes *scsABCD* se estimula específicamente por CuSO₄.

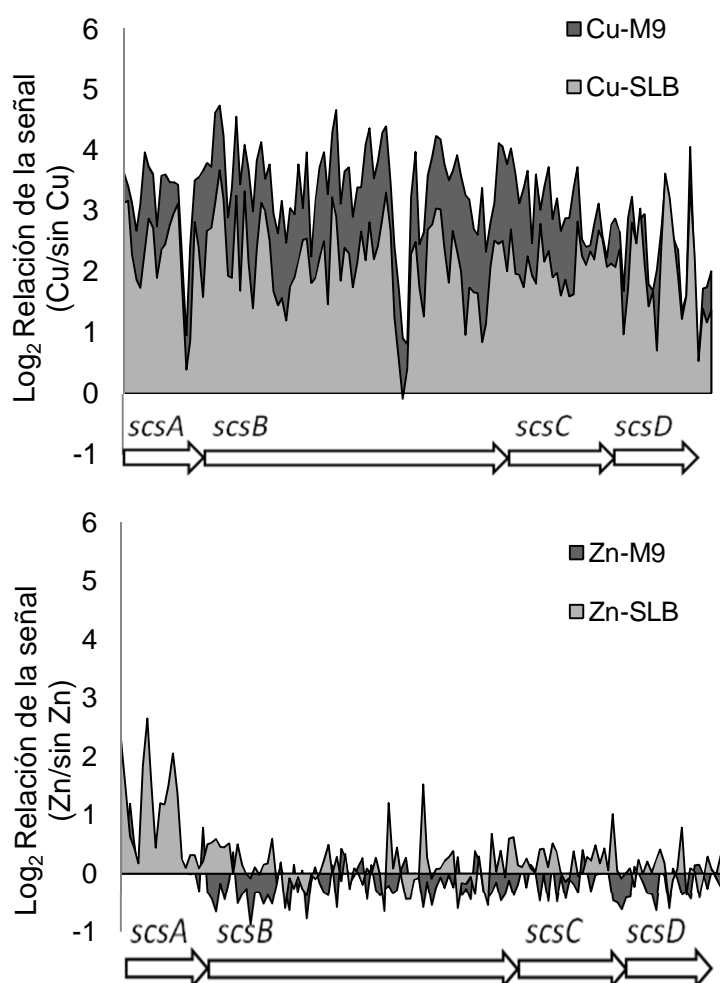
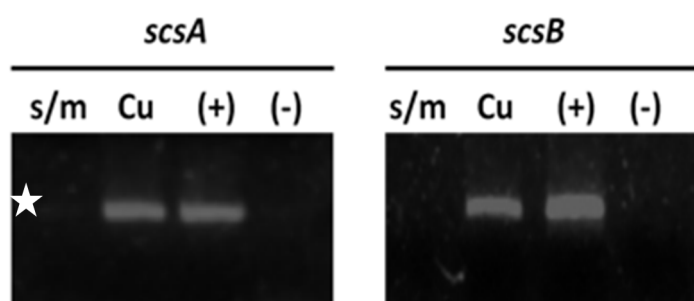


Figura 23. La expresión transcripcional de los genes *scsABCD* se induce por cobre, pero no por zinc. Inducción de los genes *scsABCD* mediante ensayos de microarreglos de oligonucleótidos, luego del agregado de cobre o zinc durante 10 minutos a un cultivo de *Salmonella Typhimurium* crecido tanto en medio mínimo M9, como en medio rico SLB. El gráfico muestra la expresión diferencial: relación entre tratado (metal)/no tratado (sin agregado de metal), expresada en \log_2 , para cada sonda de oligonucleótido perteneciente al transcrito de los genes *scsABCD*.

Comprobamos el aumento en los niveles de transcripto de los genes *scsA*, *scsB*, *scsC* y *scsD* en presencia de cobre observado mediante microarreglos por la técnica de retrotranscripción seguida de PCR semicuantitativa (RT-PCR) y de PCR en tiempo real (RT-qPCR). Cultivos de la cepa silvestre se crecieron hasta una densidad óptica (DO) de 0,6 y en ese momento a una fracción del cultivo se le agregó sulfato de cobre a una concentración final de 1 mM, dejando otra fracción sin agregado de metal. En ese instante, se tomó una alícuota de 5 ml, tiempo 0 minutos, se le agregó una solución "stop" y se procedió a extraer el ARN. Lo mismo se hizo para las alícuotas a los 5, 10, 20, 40 y 60 minutos. Una vez obtenido el ADN copia (ADNc), se utilizaron oligonucleótidos

para amplificar *scsA* (250 pb), *scsB* (263 pb) y el gen de referencia *rnpB* (157 pb), y se procedió a determinar los niveles de estos transcritos mediante PCR y qPCR. Nuestros resultados corroboran la inducción de los genes *scs* por Cu observada previamente en los ensayos de microarreglos a 10 minutos de exposición a una concentración subletal del metal (Figura 24 A y B), además de evidenciar un importante incremento de los transcritos de los genes *scsA* y *scsB* luego de 40 y 60 minutos de exposición a cobre (Figura 24 B), alcanzando su máximo a los 40 minutos luego del agregado del metal.

De esta manera, *scsA* y *scsB*, que codifican para proteínas de la envoltura celular de *Salmonella Typhimurium*, se encuentran inducidos en respuesta al estrés por cobre. Dado que el cobre puede interactuar con los grupos tioles libres (Annie Hiniker, Collet, y Bardwell 2005), la expresión de los genes *scsA*, *scsB*, *scsC* y *scsD*, cuyos productos tendrían funciones similares a las de las proteínas Dsb, como por ejemplo el plegamiento adecuado de las proteínas del periplasma o la reparación de los residuos de cisteínas oxidados (Gupta, Wu, y Rick 1997; Shepherd y col. 2013; Anwar y col. 2013), aseguraría el adecuado plegamiento de proteínas recientemente exportadas al periplasma como así también la protección frente al daño oxidativo que puede estar ocurriendo en la envoltura por la presencia del metal. En contraste, *dsbC*, *dsbG* y *dsbD* (*dipZ*) que codifican para los sistemas de formación y reparación/reducción de puentes disulfuro extracitoplasmáticos identificados y caracterizados en *E. coli* (Arts, Gennaris, y Collet 2015), no se inducen por el agregado del metal en *Salmonella Typhimurium* (Figura 25). La expresión de los genes del locus *scs* y no la de *dsbC*, *dsbG* y *dsbD* (*dipZ*) ante el exceso de Cu en el periplasma, sugiere que el estrés generado daña ciertos blancos en este compartimento que requieren de una respuesta específica.



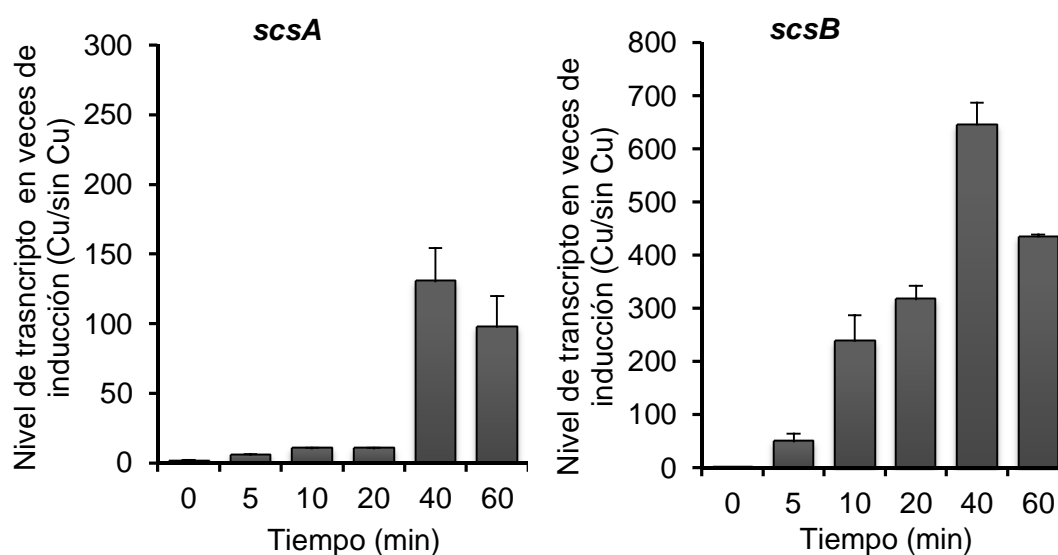
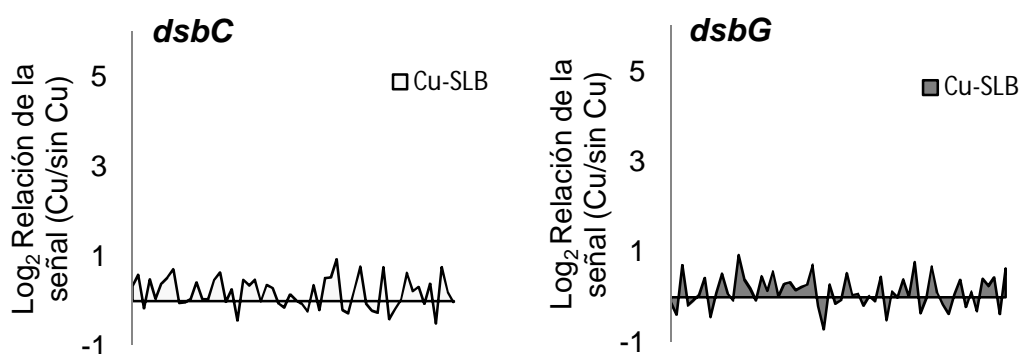


Figura 24. Los genes *scsABCD* se inducen por cobre. (A) Análisis transcripcional de los genes *scs* por RT-PCR en células cultivadas en ausencia de metal (s/m) o en presencia de sulfato de cobre 1mM final (Cu) durante 10 minutos de *shock* de cobre. (+) Control positivo ADN genómico (-) control negativo. La estrella marca que en ausencia del metal hemos observado un nivel muy bajo de transcritpo *scsA*, no así en *scsB* **(B)** Determinación de los niveles de transcritpo de los genes *scsA* y *scsB* de *Salmonella Typhimurium* a distintos tiempos luego del agregado de 1mM CuSO₄. Las determinaciones se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores se indican enveces de inducción respecto al cultivo no tratado y se calcularon como la cantidad relativa del gen target bajo la condición experimental (tratado con cobre), normalizado al gen de control interno (*rnpB*) dividido la cantidad relativa del gen target bajo la condición control (sin cobre), normalizado al gen de referencia, a cada tiempo. Los valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes y las barras de error refieren a la desviación estándar.



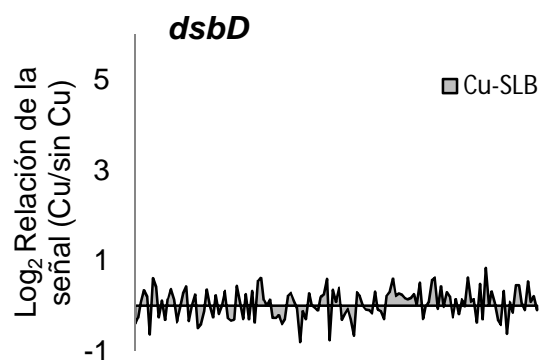


Figura 25. Los genes *dsbC*, *dsbG* y *dsbD* (*dipZ*), que codifican para los sistemas de reducción de la envoltura bacteriana de *S. Typhimurium* no se inducen por cobre después de un *shock* de 10 minutos del metal. Niveles relativos de expresión transcripcional de los genes *dsbC*, *dsbG* y *dsbD* mediante ensayos de microarreglos de oligonucleótidos, luego del agregado de cobre durante 10 minutos a un cultivo de *Salmonella Typhimurium* crecido en medio rico SLB. El gráfico muestra la expresión diferencial: relación entre tratado (metal)/no tratado (metal), expresada en \log_2 , para cada sonda de oligonucleótido perteneciente a los transcritos de *dsbC*, *dsbG* y *dsbD*, según se indica.

V.2. Los genes *scsA*, *scsB*, *scsC* y *scsD* se transcriben principalmente a partir de la región promotora de *scsA*.

El gen *scsA* está separado de *scsB* por 48 pares de bases y en esa región, al igual que corriente arriba de *scsA*, se predicen posibles elementos -10 y -35 que pueden ser reconocidos por la maquinaria transcripcional (Gupta, Wu, y Rick 1997) (Figura 26 B). Los cuatro genes *scsA*, *B*, *C* y *D*, se transcriben en la misma dirección y los tres últimos se solapan parcialmente, condición encontrada comúnmente en operones bacterianos. Si bien no está confirmado si los cuatro genes *scs* forman una o dos unidades transcripcionales en *Salmonella Typhimurium*, una conformada por *scsA* y la otra por los genes *scsBCD*, únicamente se ha identificado un sitio de inicio de la transcripción (Figura 26 A y B) corriente arriba del gen *scsA* (Kroger y col.2012). Se introdujo una inserción polar de un *cassette* de Cm^R (*cat*) a 79 pares de bases (pb) 3' del ATG de *scsA* y en orientación opuesta a su transcripto (Figura 26 A), y se analizó en esta cepa la dependencia del promotor de *scsA* en la transcripción de *scsBCD* (Fig. 26 C). Si el promotor localizado 5' de *scsA* gobierna de manera mayoritaria la transcripción de *scsBCD*, la presencia de este *cassette* de Cm^R impedirá la progresión de la inducción en la transcripción por cobre hacia los genes ubicados corriente abajo del mismo. Para esto, se extrajeron ARN de cultivos crecidos en presencia y ausencia de sulfato de cobre, tanto de la cepa silvestre como de la cepa mutante *scsA::cat*. Se llevó a cabo la retrotranscripción y una PCR convencional utilizando oligonucleótidos que amplifican

C

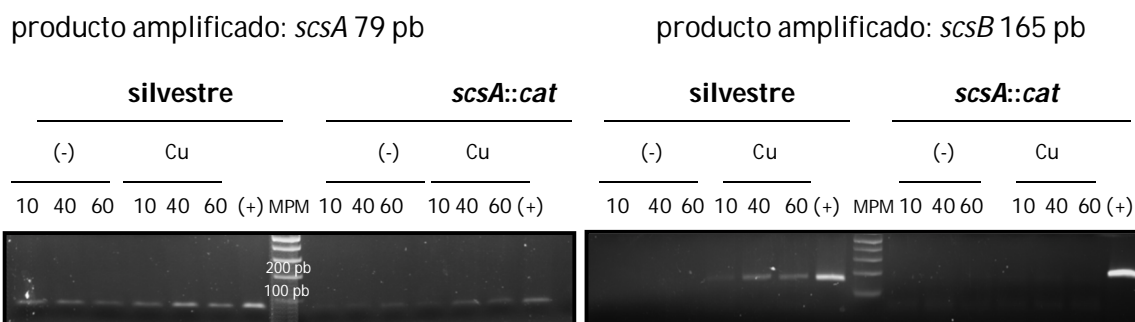


Figura 26. La transcripción de los genes *scs* está principalmente gobernada por la región promotora corriente arriba de *scsA*. (A) Esquema de la construcción en la cual se introdujo una inserción polar de un *cassete* de Cm^R en la región 5' del ORF de *scsA*, a 79 pb del ATG. Silvestre: cepa sin inserción y *scsA::cat*: cepa con inserción. También se marcan los 48 pb que separan a *scsA* y *scsB*. (B) Secuencia de ADN de la región promotora de *scsA* (P_{scsA}) y de la región intergénica entre *scsA* y *scsB*. Con líneas sólidas y subrayado doble se indican las cajas -35 y -10 posibles. La flecha y +1 indica el sitio de inicio de la transcripción de *scsABCD* (Kroger et al. 2012). Con flecha y en negrita se indican parte de los ORFs de *scsA* y *scsB*. (C) Comparación de los niveles de transcripto entre las cepas de *S. Typhimurium* silvestre y *scsA::cat* (cepa que presenta una inserción polar de un *cassete* de Cm hacia el 5' del ORF de *scsA*). Se utilizaron oligonucleótidos que amplifican 79 bp de *scsA* y 165 pb de *scsB*. Ensayo de RT-PCR de muestras de ARN de las cepas sin (-) y con el agregado de sulfato de cobre 1 mM final (Cu), luego de distintos tiempos de exposición (10, 40 y 60 minutos), según se indica. MPM: marcador de peso molecular, desde abajo hacia arriba 100, 200, 300, 400, 500 pb.

V.3. Rol de los componentes codificados en el locus *scs* frente al agregado de cobre exógeno

Debido a que los genes *scsABCD* se inducen en presencia de cobre, nos propusimos evaluar la contribución de sus productos en la tolerancia a cobre. Para esto construimos las mutantes $\Delta scsA$, $\Delta scsB$, $\Delta scsC$, $\Delta scsD$ y $\Delta scsABCD$ y ensayamos su resistencia a Cu mediante experimentos de concentración inhibitoria mínima (CIM) al metal en placas de LB agar. Las cepas mutantes $\Delta scsB$, $\Delta scsC$, $\Delta scsD$ y la mutante en el locus completo $\Delta scsABCD$ mostraron alteraciones en el crecimiento respecto a la cepa silvestre a concentraciones altas de Cu(II) (Figura 27). Tanto la cepa mutante $\Delta scsB$ como la cepa $\Delta scsABCD$ presentaron la mayor sensibilidad a cobre con una CIM de 3,5 mM $CuSO_4$. Las cepas $\Delta scsC$ y $\Delta scsD$ presentaron una sensibilidad intermedia con CIMs de 3,75 y 4 mM, respectivamente. En contraste, la cepa mutante $\Delta scsA$ no mostró diferencias en su sensibilidad frente al cobre respecto de la cepa silvestre (Fig. 27). Este comportamiento diferencial de cada mutante frente al metal sugiere que los factores codificados en este operón no conforman un único sistema o vía de resistencia a Cu. *ScsA* no presenta homología a proteínas conocidas y tal vez su función puede ser accesoria o estar enmascarada por los otros componentes del sistema *Scs*. *ScsB* posee

homología con factores de la familia de las reductasas tipo DsbD (DipZ en *Salmonella*), responsables de la reducción y el mantenimiento del estado activo de las isomerasas de puentes disulfuro como DsbC y DsbG (S.-H. Cho y col. 2012). Una mutante carente de DsbD afecta también la función de sus sustratos. De igual modo, la carencia de ScsB podría estar afectando la reducción de más de un sustrato y por ende mostrar un fenotipo más marcado frente al estrés por cobre. Ya que este metal es capaz de oxidar los residuos de cisteínas y formar puentes disulfuro incorrectos en las proteínas de la envoltura (Annie Hiniker, Collet, y Bardwell 2005), es de esperar que la mutante $\Delta scsB$ sea más sensible al metal que la $\Delta scsC$, debido a que ScsC, con homología a las isomerasas DsbC y DsbG (Shepherd y col. 2013), es probablemente uno de los sustratos putativos de ScsB. Esto además coincide con el fenotipo de la mutante $\Delta dsbC$ en *E. coli* que presenta sensibilidad incrementada a cobre respecto a la cepa silvestre (Annie Hiniker, Collet, y Bardwell 2005).

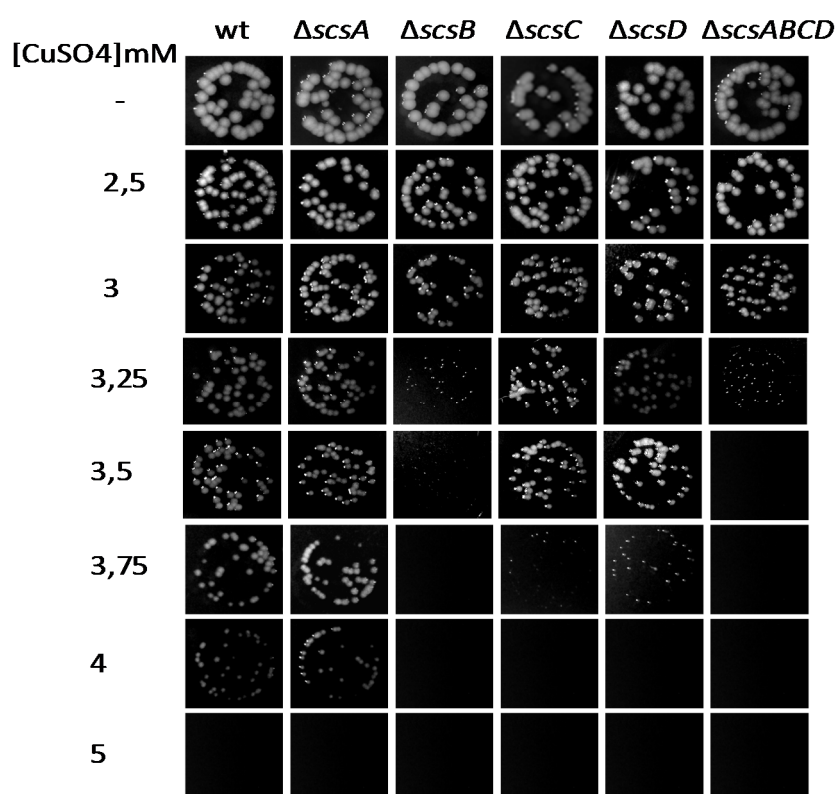


Figura 27. Rol de ScsA, ScsB, ScsC y ScsD en la resistencia a cobre. 20 μ l de diluciones 5×10^{-7} de las cepas silvestre, $\Delta scsA$, $\Delta scsB$, $\Delta scsC$, $\Delta scsD$ y $\Delta scsABCD$ fueron crecidas ON en placas LB agar, durante 24 hs, con las concentraciones de cobre señaladas. La concentración en la que no se observó crecimiento se consideró como CIM. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante ensayos de microarreglos y de PCR en tiempo real, demuestran la inducción transcripcional por cobre de los genes *scsABCD*, sumado a que los productos codificados por estos genes son funcionalmente requeridos para el crecimiento de *S. Typhimurium* en presencia de un exceso de cobre, y corroboran el rol del sistema ScsABCD en la homeostasis del metal en la envoltura bacteriana (Gupta, Wu, y Rick 1997; Shepherd y col. 2013; Anwar y col. 2013). Durante el transcurso de esta Tesis, Anwar y colaboradores, mostraron mediante curvas de crecimiento (DO vs. tiempo) que tanto la mutante que carece del locus completo *scsABCD*, como las mutantes en *scsB*, *scsC* o en *scsD* afectan de la misma manera la resistencia a cobre (Anwar y col. 2013). Estas observaciones difieren parcialmente de nuestros resultados, que indican una contribución diferencial de ScsB, ScsC y ScsD a la resistencia al metal.

V.4. ScsABCD es requerido para el crecimiento óptimo de *S. Typhimurium* frente a un exceso de cobre, pero no de otros metales

Analizamos la especificidad en la resistencia a cobre del sistema Scs, teniendo en cuenta que no se observó inducción por Zn (Figura 23 B).

En un ensayo de difusión en disco la cepa que carece de los genes *scsABCD* no mostró una sensibilidad incrementada a zinc respecto de la cepa silvestre, ya que el diámetro del halo de inhibición obtenido es idéntico para ambas cepas (Fig. 28 A). Se realizaron curvas de crecimiento en medio líquido en presencia de concentraciones crecientes de $ZnCl_2$ para las cepas silvestre y $\Delta scsABCD$. Mediante este análisis tampoco observamos diferencias en la sensibilidad al metal (Fig. 28 B), indicando que el locus *scs* no es requerido para la resistencia a zinc. Esto se correlaciona con los perfiles transcripcionales del locus, que no muestra inducción por el agregado de Zn. Restaría analizar si la sobreexpresión del mismo favorece la tolerancia a altas concentraciones de este metal.

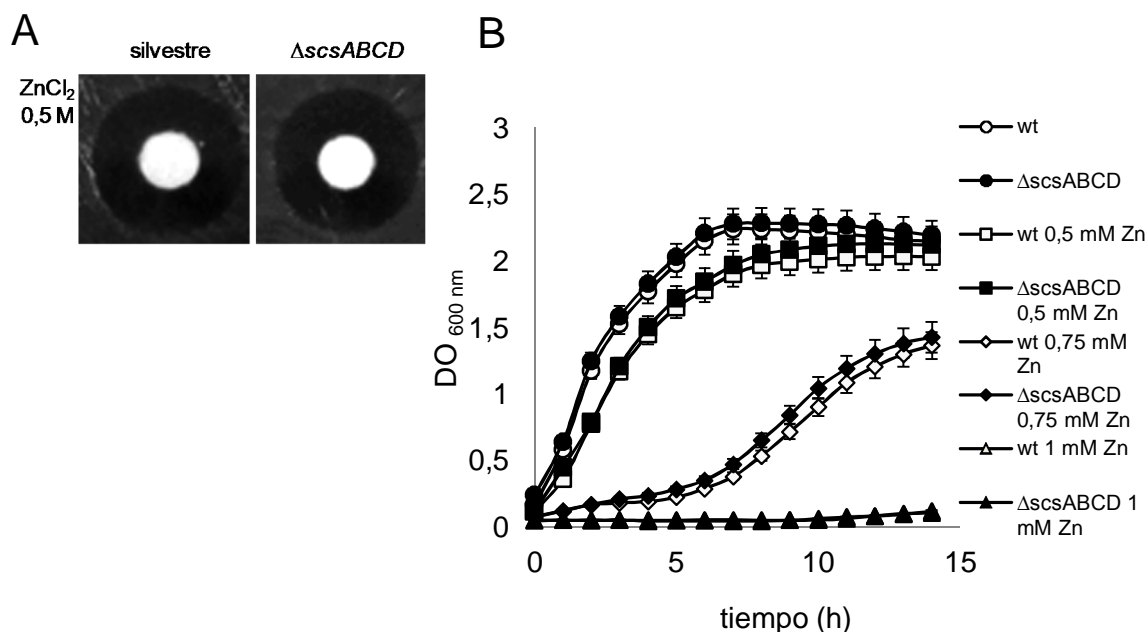


Figura 28. El locus *scs* no participa en la resistencia de *S. Typhimurium* a un exceso de zinc. (A) Ensayo de difusión en discos. Las cepas silvestre y mutante $\Delta scsABCD$ se crecieron en presencia de discos de filtro estériles embebidos en 500 mM de $ZnCl_2$. Se determinó el halo de inhibición alrededor del disco embebido. **(B)** Se determinó la densidad óptica de la cepa silvestre o mutante $\Delta scsABCD$ en función del tiempo en cultivos líquidos crecidos a 37 °C en microplaca de 96 wells con agitación continua, en ausencia de zinc (sin agregado), a 0,5 mM; 0,75 y 1 mM final de sulfato de zinc. Valores promedio de dos experimentos independientes, las barras de error indican el desvío estándar.

Analizamos además el requerimiento del locus frente a concentraciones elevadas de distintos metales como cadmio (Cd) y cobalto (Co), ya que las proteínas Scs podrían participaren el plegamiento de proteínas de la envoltura que han sufrido inactivación, debido al desplazamiento de un cofactor nativo o ver afectados sus grupos -SH. De hecho, se ha reportado, que una mutante en *E. coli* que carece de *dsbA* es sensible a Cd y a Zn, pero no a Cu (Christopher Rensing, Mitra, y Rosen 1997). Nuestros resultados (Figura 29) muestran que la mutante $\Delta scsABCD$ no presenta sensibilidad incrementada ni a $CoSO_4$ ni tampoco a $CdCl_2$, respecto de la cepa silvestre. Es probable que la ausencia del sistema Scs, no afecte el plegamiento y/o la actividad de proteínas con tioles libres que pueden reaccionar con metales distintos al cobre (como Cd y Zn), debido a la presencia del sistema DsbA/DsbB.

La presencia de cobalto produce, directa o indirectamente, una serie de efectos, como la competencia con los iones hierro, la inducción de estrés oxidativo y posiblemente el suministro de azufre, que convergen hacia, y culminan en, un defecto general de la función de las enzimas con centros Fe-S (Barras y Fontecave 2011), dianas

también de la toxicidad por cobre (Roche y col. 2013). Según nuestros resultados, las proteínas Scs no estarían involucradas en aliviar el daño generado en las proteínas con centros Fe-S generado por un exceso de cobalto, que seguramente está afectando de manera mayoritaria a las proteínas del citoplasma bacteriano.

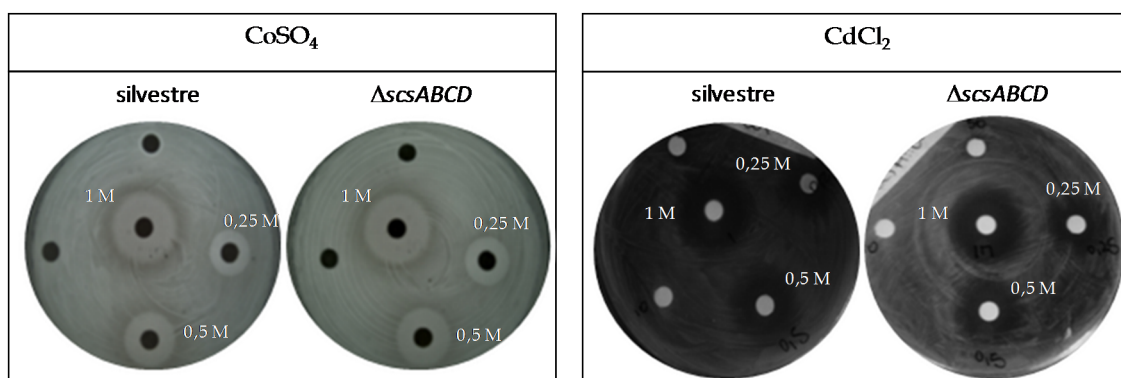


Figura 29. El locus *scs* no participa en la resistencia de *S. Typhimurium* a un exceso de cobalto o cadmio
Ensayo de difusión en discos. Las cepas silvestre y mutante $\Delta scsABCD$ se crecieron en presencia de discos de filtro estériles embebidos en concentraciones crecientes de $CoSO_4$ o $CdCl_2$: 0,01, 0,05, 0,25, 0,5 y 1M, según se indica. Se determinó y comparó el halo de inhibición alrededor del disco embebido.

Por último, analizamos el rol de las proteínas Scs frente al estrés redox ocasionado por hierro. Este metal, al igual que el cobre, participa en reacciones de Fenton (Slauch 2011), aunque generalmente el compartimento afectado por las especies oxidativas generadas por un exceso de hierro es el citoplasma bacteriano. No se observaron diferencias en el crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de hierro (citrato férrico) entre la cepa silvestre y la mutante que carece de los genes *scsABCD* (Figura 30). Restaría analizar el rol del locus *scs* frente a limitación de hierro.

En suma, nuestros resultados indican que el sistema Scs participa de manera específica para aliviar el estrés generado por cobre en la envoltura bacteriana.

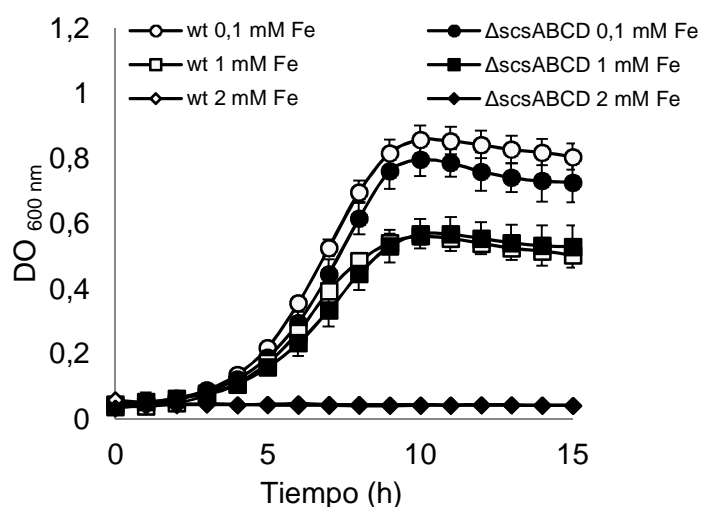


Figura 30. El locus *scs* no participa en la resistencia de *S. Typhimurium* a un exceso de hierro. Se determinó la densidad óptica de la cepa silvestre y la mutante $\Delta scsABCD$ en función del tiempo en cultivos líquidos crecidos en medio mínimo a 37 °C en microplaca de 96 wells con agitación continua, en presencia de bajo hierro (0,1 mM) y a concentraciones elevadas del metal, a 1 mM y 2mM final de citrato de Fe(III). Valores promedios de dos experimentos independientes, las barras de error indican el desvío estándar.

V.5. El par *ScsB/ScsC* tiene un rol más relevante que el sistema *DsbD/DsbC-DsbG* en la protección de la envoltura de *S. Typhimurium* frente al estrés por cobre

Como se ha mencionado en la introducción, en el genoma de *Salmonella Typhimurium* están codificados varios sistemas homólogos de formación/reparación de puentes disulfuro y de mantenimiento de cisteínas reducidas, que participan o participarían en la protección de la envoltura celular bacteriana (Gupta, Wu, y Rick 1997; Anwar y col. 2013), favoreciendo el correcto plegamiento de las proteínas transportadas al periplasma desde el citoplasma, y evitando el daño generado por la oxidación de las cisteínas y metioninas como así también por la introducción de enlaces disulfuro incorrectos (Arts, Gennaris, y Collet 2015). En la tabla 6, se muestran los genes de *S. Typhimurium* que codifican para estos sistemas, incluyendo aquellos homólogos a los presentes en *E. coli* (Ito y Inaba 2008) y los específicos de este patógeno.

Codificados en el genoma de <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i>	Específico de <i>S. enterica</i>	Función
<i>dsbA</i>	<i>srgA</i> , <i>dsbL</i> (STM3193)	Formadoras de puentes S-S (vía oxidativa).
<i>dsbB</i>	<i>dsbI</i> (STM3194)	Mantiene oxidadas (activas) a las formadoras de puentes S-S (vía oxidativa).
<i>dsbC</i> , <i>dsbG</i>	<i>scsC</i> , <i>bcfH</i>	DsbC y DsbG isomerasas. ScsC y BcfH isomerasas putativas.
<i>dsbD</i> (<i>dipZ</i>)	<i>scsB</i>	DsbD (DipZ) mantiene reducidas a las isomerasas. Transfiere electrones a diversas vías reductoras. Se reportó que ScsB de <i>Caulobacter crescentus</i> pertenece a una subfamilia de DsbD.
<i>dsbE</i> (<i>ccmG</i>)		Biogénesis citocromo tipo c.
	<i>scsA</i>	No presenta homología a proteínas anotadas.
	<i>scsD</i>	ScsD homóloga a las proteínas tipo tiorredoxinas como TipA de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .

Tabla 6. Genes que codifican para proteínas de tipo tiorredoxinas extracitoplasmáticas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, específicos de este patógeno e identificados y caracterizados en *E. coli*.

En *E. coli*, únicamente la proteína EcDsbC participaría en la resistencia a cobre, ya que sólo la mutante $\Delta dsbC$ es sensible al metal, a diferencia de una cepa que carece de *dsbG* o *dsbA* (Annie Hiniker, Collet, y Bardwell 2005). Asimismo, DsbG actúa como una proteína protectora de grupos tiol *in vivo*, protegiendo a las cisteínas de la oxidación (Depuydt y col. 2009). Este escenario cobra interés en el patógeno *Salmonella enterica* ya que su genoma codifica para las proteínas DsbC, DsbG, DsbD, ScsA, ScsB, ScsC y ScsD, sugiriendo redundancia funcional en muchos de estos casos, de manera similar a lo reportado para los múltiples sistemas detoxificadores de peróxido de hidrógeno citoplasmáticos (Hebrard y col. 2009; Slauch 2011). Por lo tanto consideramos relevante analizar la contribución de mutantes individuales así como en múltiples de los genes que codifican para estos factores en la resistencia a cobre (Figura 31 y Tabla 7).

Únicamente la mutante carente de ScsC presenta una sensibilidad incrementada frente al agregado de sulfato de cobre mientras que las mutantes en *dsbC* y *dsbG* presentan un crecimiento idéntico a la cepa silvestre (Figura 31 y Tabla 7). La ausencia de *dsbC* en una cepa carente de *scsC* incrementó la sensibilidad al metal, con una CIM

de 3,5 mM CuSO₄. Esto indica que DsbC puede sustituir parcialmente a ScsC en la defensa frente al estrés generado por cobre, aunque en presencia ScsC no se requeriría de DsbC para contrarrestar la toxicidad del metal. Asimismo, la sensibilidad incrementada a cobre en la mutante doble $\Delta scsC \Delta dsbC$, sugiere que ScsC y DsbC presentarían diferente especificidad de sustratos y que a su vez estos sustratos tienen un papel distinto en la defensa contra el estrés generado por cobre.

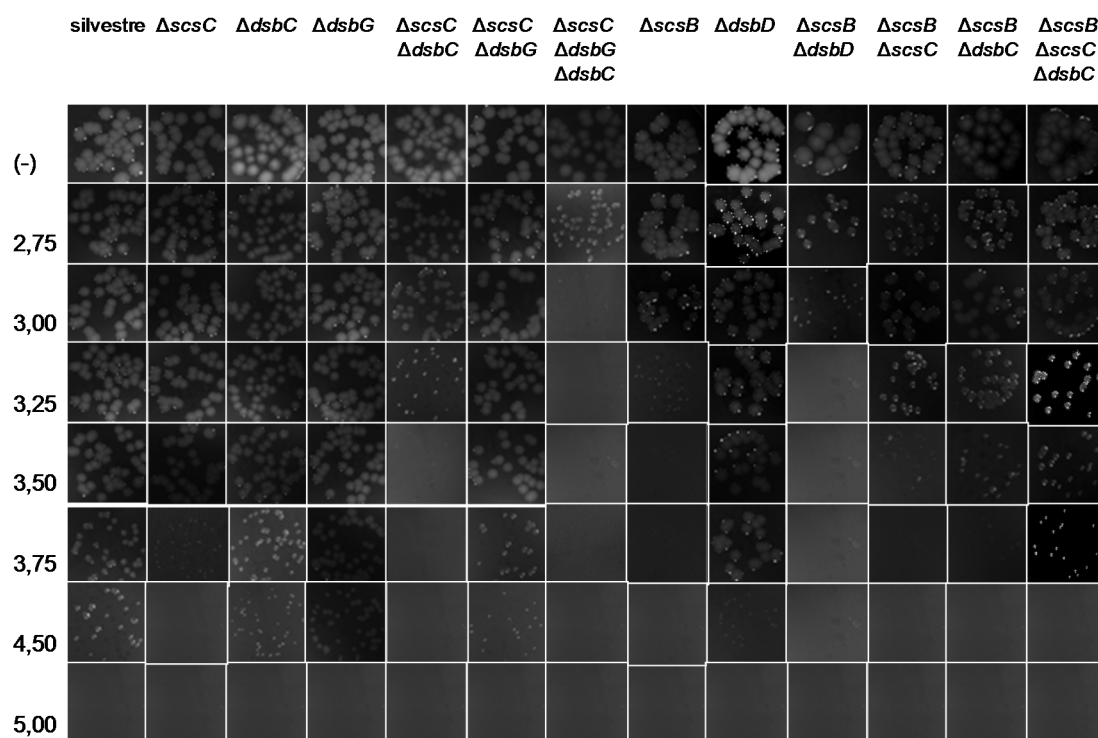


Figura 31. Rol de ScsB, ScsC, DsbC, DsbG y DsbD en la resistencia a cobre. 20 μ l de diluciones 5×10^{-7} de las cepas silvestre, $\Delta scsC$, $\Delta dsbC$, $\Delta dsbG$, $\Delta scsC \Delta dsbC$, $\Delta scsC \Delta dsbG$, $\Delta scsC \Delta dsbC \Delta dsbG$, $\Delta scsB$, $\Delta dsbD$, $\Delta scsB \Delta dsbD$, $\Delta scsB \Delta scsC$, $\Delta scsB \Delta dsbC$ y $\Delta scsB \Delta scsC \Delta dsbC$, según se indica fueron crecidas ON en placas LB agar, durante 24 hs, con las concentraciones de cobre señaladas. La concentración en la que no se observó crecimiento se consideró como CIM. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

La inactivación de *dsbG* en la $\Delta scsC$, no afectó su crecimiento en presencia de cobre, siendo igual al observado en una cepa silvestre (Fig. 31 y Tabla 7), sugiriendo que la carencia de DsbG suprime el fenotipo de sensibilidad a cobre de la $\Delta scsC$ por la inducción de la respuesta de DsbC, del resto de la proteínas Scs u otras, capaces de restablecer el balance de la homeostasis de cobre en la envoltura. Sin embargo, cuando se inactivó *dsbG* en la mutante $\Delta dsbC \Delta scsC$, la CIM decreció a 3,0 mM CuSO₄ (Fig. 31 y Tabla 7). En conjunto, estos resultados sugieren que DsbG participaría en última instancia frente al estrés por cobre en el periplasma, ya que su función se ve

enmascarada por DsbC y ScsC. El efecto protector frente al exceso de cobre es principalmente dependiente de ScsC. Una hipótesis que nos planteamos es que *Salmonella Typhimurium* mantiene estos sistemas de isomerización/reducción como resultado de una adaptación al medioambiente, ya que los genes que codifican para estos sistemas pueden ser inducidos de manera diferencial en distintas fases del crecimiento de la bacteria y frente a distintos tipos de estrés que perturben la envoltura bacteriana actuando sobre diferentes dianas de este compartimento.

También ensayamos la sensibilidad frente a cobre de la cepa que carece tanto de *scsC* como de *scsB*, que codifican para el par isomerasa/reductasa putativo. Esta cepa mostró la misma sensibilidad a cobre que la mutante simple $\Delta scsB$, con una CIM de 3,5 mM CuSO₄ (Fig. 31 y Tabla 7), siendo menor que la de la cepa que carece de DsbC, DsbG y ScsC, con una CIM de 3,0 mM CuSO₄, sugiriendo que en ausencia de *scsB*, las isomerasas/reductasas DsbC y DsbG pueden ser reducidas por el homólogo a ScsB, DsbD.

Asimismo, en la Figura 31 y Tabla 7 se observa que la mutante que carece de *dsbD* (*dipZ*), que codifica para la reductasa asociada a DsbC y DsbG según lo reportado en *E. coli* (Ito and Inaba 2008), mostró la misma sensibilidad a Cu que la cepa silvestre. Sin embargo, la delección de ambas reductasas simultáneamente, $\Delta dsbD \Delta scsB$, mostró una CIM de 3,0 mM CuSO₄, similar al fenotipo de sensibilidad a Cu exhibido por la cepa $\Delta scsC \Delta dsbC \Delta dsbG$. Estas observaciones fueron reforzadas por los valores de CIM determinados para las mutantes $\Delta scsB \Delta dsbC$ y $\Delta scsB \Delta scsC \Delta dsbC$, que presentaron menor sensibilidad al metal a los observados para las cepas que tenían todo el par isomerasa/reductasa no funcional.

Cabe destacar, que los resultados obtenidos mediante análisis transcripcional por ensayos de microarreglos, que mostraron que los niveles de los genes *dsbC*, *dsbG* y *dsbD* no se inducen por un *shock* de 10 minutos de una concentración subletal de cobre (Figura 25), se correlacionan con la contribución individual de los productos codificados por estos genes a la resistencia a cobre. Consideramos interesante evaluar el perfil transcripcional de estos genes en la cepa silvestre y en una cepa mutante $\Delta scsABCD$ en presencia de cobre de manera de evaluar si hay activación en ausencia del sistema Scs dependiente del metal. Asimismo, analizar la inducción de la transcripción durante un mayor tiempo de exposición al metal y/o en distintas fases del crecimiento.

Cepa	CIM (mM)*
silvestre	5,00
<i>scsA</i>	5,00
<i>scsB</i>	3,50
<i>scsC</i>	3,75
<i>scsD</i>	4,00
<i>scsABCD</i>	3,50
<i>dsbC</i>	5,00†
<i>dsbG</i>	5,00
<i>dsbD (dipZ)</i>	5,00†
<i>scsC dsbC</i>	3,50
<i>scsC dsbG</i>	5,00†
<i>scsC dsbC dsbG</i>	3,00
<i>scsB scsC</i>	≥3,50, ≤3,75
<i>scsB dsbC</i>	3,75
<i>scsB scsC dsbC</i>	3,75
<i>scsB dsbD</i>	≥3,00, ≤3,25

Tabla 7. Fenotipo de tolerancia a cobre de las cepas mutantes de *S. Typhimurium* analizadas en este trabajo. * Los valores de CIM se determinaron en placas LB que contenían cantidades crecientes de CuSO₄ bajo condiciones de aerobiosis. Los datos corresponden a valores promedios de dos experimentos independientes realizados por duplicado. † Se observaron colonias más pequeñas en comparación con la cepa de tipo silvestre.

En conjunto, todos los resultados de esta sección, resumidos en la Tabla 7, ponen de relieve el rol del par ScsB/ScsC en la protección de la envoltura de *Salmonella* del daño mediado por Cu y asignan al sistema DsbD/DsbC-DsbG una participación más bien auxiliar bajo el estrés por Cu.

V.6. El operón *scsABCD* forma parte del regulón Cpx

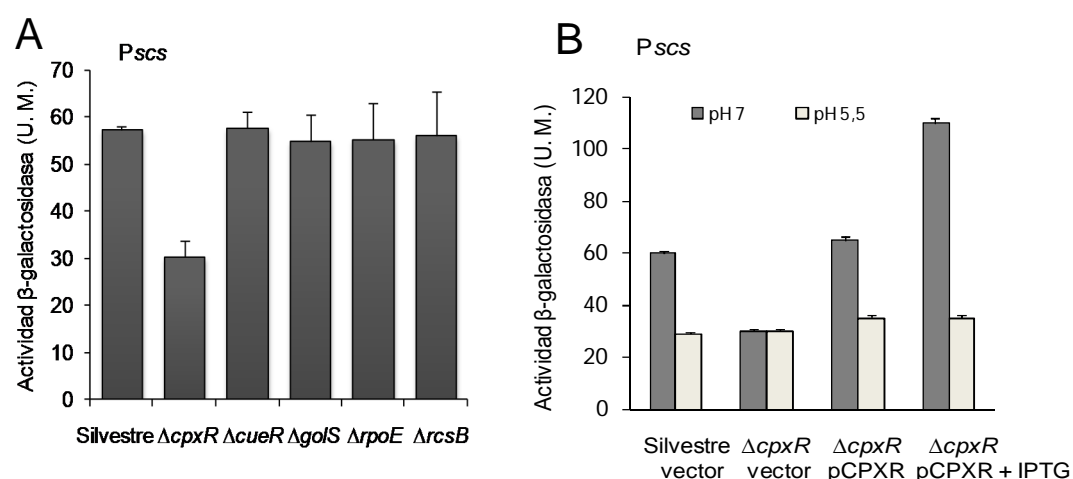
6.1. CpxR activa la transcripción de *scsABCD* en respuesta al estrés mediado por Cu

Para dilucidar el mecanismo de activación transcripcional del operón *scsABCD*, analizamos en primer lugar si esta activación depende del sensor citoplasmático CueR, principal responsable de la homeostasis de cobre en *Salmonella* (Espariz y col. 2007; Pontel y Soncini 2009). Los reguladores de la familia MerR reconocen una secuencia relativamente conservada en los promotores de los genes que regulan y, por ejemplo, los operadores de los sensores de cobre y oro, CueR y GoIS, difieren en muy pocas bases entre sí (Pontel y Soncini 2009). Si bien no detectamos una secuencia similar a la reconocida por CueR/GoIS en la región promotora de los genes *scsABCD*, se construyó un reportero cromosomal utilizando el gen *lacZ* fusionado al promotor de los genes *scsABCD* (*P_{scs}*) y se analizó su expresión en la cepa silvestre, mutante en *cueR* o en *goIS*, gen que codifica para el parálogo del metaloregulador CueR (Humbert y col. 2013). Como se observa en la Figura 32 A, no hay diferencia en la actividad β -galactosidasa entre las cepas silvestre y mutantes cuando los cultivos se crecieron en presencia de iones Cu, indicando que ni CueR ni GoIS controlan la expresión transcripcional del locus *scs*.

Como se detalla en la introducción los sistemas de dos componentes juegan un rol primordial en la detección y transmisión de señales que indican el estado de la envoltura bacteriana. Como los genes *scsABCD* codifican para proteínas que participan en la envoltura bacteriana, decidimos incluir mutantes en factores de transcripción involucrados en la defensa contra estrés de envoltura (Rowley y col. 2006; Ferric C. Fang y col. 2016), como $\Delta cpxR$, $\Delta rpoE$ y $\Delta rcsB$. Como se muestra en la Fig. 32 A, sólo la supresión de *cpxR* disminuyó a la mitad la expresión desde el promotor *P_{scs}* cuando los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en presencia de cobre, y los niveles de actividad β -galactosidasa se restablecieron cuando se proporcionó CpxR en *trans* (Figura 32 B). Este efecto no se observó en cultivos a pH 5,5, condición en la que el sistema de dos componentes CpxR/CpxA no está inducido (Danese y Silhavy 1997).

La sobreexpresión de la lipoproteína de membrana externa NlpE indujo un aumento de 3 veces la expresión desde el promotor *Pscs* (Figura 32 C, panel derecho). La cepa reportera *PcpxP::lacZ* (*PcpxP*), se usó como control positivo, ya que forma parte del regulón Cpx (Price y Raivio 2009).

Se ha reportado que la sobreexpresión de NlpE estimula la vía Cpx de manera dependiente de CpxA (Snyder y col. 1995; Suntharalingam y col. 2003). Por lo que la activación transcripcional de *scsABCD* requiere de un sistema de dos componentes CpxRA intacto. Asimismo, como el regulador CpxR puede modular la expresión génica independientemente de la presencia de CpxA (De Wulf y col. 1999; DiGiuseppe y Silhavy 2003), analizamos si la inducción de la expresión de *scsABCD* a pH 7, depende de la quinasa sensora CpxA. Como se observa en la Fig. 32 C, panel izquierdo, la delección de *cpxA* disminuyó la expresión desde el promotor *Pscs*, a niveles similares al entorno $\Delta cpxR$.



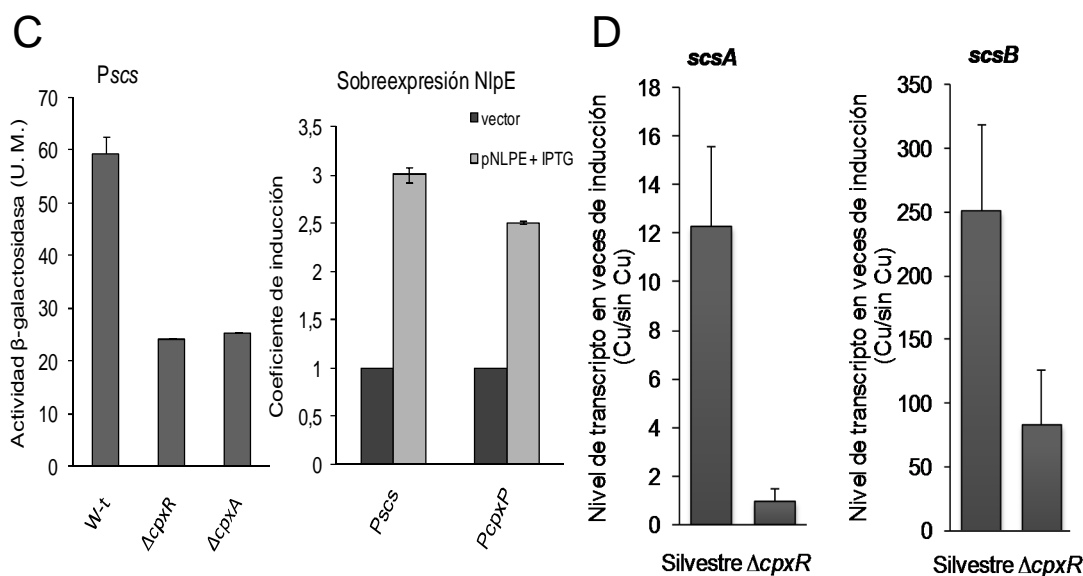


Figura 32. Los genes *scsABCD* son nuevos miembros del regulón Cpx. Su expresión transcripcional inducida por cobre depende del sistema de dos componentes CpxRA. (A) Actividad β-galactosidasa de la fusión transcripcional del promotor de *scsABCD* al reportero *lacZ* (*Pscs*) expresada en un entorno silvestre, *ΔcpxR*, *ΔcueR*, *ΔgolS*, *ΔrpoE* y *ΔrcsB*, según se indica. Los cultivos fueron crecidos durante la noche en medio LB en presencia de 1 mM de CuSO_4 . **(B)** Actividad β-galactosidasa de la fusión transcripcional *PscsA-lacZ* en el cromosoma (*Pscs*) expresada en la cepa silvestre, *ΔcpxR* o la cepa *ΔcpxR* complementada con CpxR en *trans* (*ΔcpxR/pCPXR*) sin o con la adición de 100 μM de IPTG (+ IPTG) crecido durante la noche en LB tamponado con 100 mM MES para ajustar el valor de pH a 7,0 o 5,5. **(C)** Panel izquierdo: Actividad β-galactosidasa de la fusión transcripcional *PscsA-lacZ* (*Pscs*) en un entorno silvestre, *ΔcpxR* o *ΔcpxA*. Panel derecho: expresión relativa desde el promotor *Pscs-lacZ* (*Pscs*) o desde el promotor *PcpxP-lacZ* (*PcpxP*) determinada en medio LB. Coeficiente de inducción corresponde a la relación entre las unidades de actividad β-galactosidasa (U. Miller) de la cepa que no sobreexpresa NlpE (vector) o que sobreexpresa NlpE (pNLPE + IPTG) con respecto a las U. Miller de las células que no sobreexpresan NlpE (vector), para cada fusión reportera cromosomal según se indica. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **(D)** Determinación de los niveles de transcripción de los genes *scsA* y *scsB* expuestos durante 10 minutos al agregado de 1mM CuSO_4 en la cepa silvestre o mutante *ΔcpxR*. Las determinaciones se realizaron mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores se indican en veces de inducción respecto al cultivo no tratado (sin agregado de cobre) y se calcularon como la cantidad relativa del gen blanco bajo la condición experimental (tratado con cobre), normalizado al gen de referencia (*rnpB*), dividido la cantidad relativa del gen blanco bajo la condición control (sin cobre), normalizado al gen de referencia *rnpB*. Los valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes y las barras de error refieren a la desviación estándar.

Por ensayos de transcripción en tiempo real (RT-qPCR) comprobamos que los niveles transcripcionales de *scsA* y *scsB* que se inducen por cobre son modulados y dependientes del regulador de respuesta CpxR. La supresión de *cpxR* perjudicó de manera significativa la activación de la transcripción de ambos genes, *scsA* y *scsB*, mediada por Cu, aunque observamos inducción aún en ausencia de CpxR, sobre todo en *scsB*, por lo que su activación dependería también de otros factores transcripcionales (Figura 32 D).

En conclusión, el operón *scsABCD* forma parte del regulón Cpx y la activación por parte del regulador de respuesta CpxR depende de las señales que perturban la envoltura celular sensadas por CpxA.

Reportes previos en *E. coli*, han establecido una asociación entre CpxRA y la detección de metales como el cobre (Yamamoto y Ishihama 2006). Asimismo, los principales genes que forman parte del regulón Cpx de *E. coli*, como *degP*, *dsbA* y *ppiA* (N. L. Price y Raivio 2009), codifican para proteínas que cumplen funciones de protección de la envoltura celular. En nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que CpxR cumple un rol en la resistencia a cobre (sección IV.2.1) y que regula a *cueP*, que codifica para una proteína que también participa en la tolerancia al metal.

6.2. CpxR regula la expresión de *scsABCD* actuando en forma directa sobre su promotor

Un análisis *in silico* de la región promotora de los genes *scs* reveló la presencia de un sitio de unión a CpxR putativo entre los nucleótidos -46 y -60 en relación al sitio de inicio de la transcripción de *scsABCD* (Kroger y col. 2012). Esta secuencia, 5'-GTAAAgttatGTCGG-3', difiere en sólo 3 nucleótidos con el sitio consenso 5'-GTAAAN5GTAAA-3' de reconocimiento de este regulador de respuesta (Yamamoto y Ishihama 2006; N. L. Price y Raivio 2009).

Para confirmar la interacción de CpxR con esta región promotora, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida, usando un fragmento de ADN amplificado por PCR que contiene la región promotora de *scsABCD* y cantidades crecientes de la proteína CpxR preincubada con acetil fosfato para su fosforilación *in vitro* (CpxR-P). Como se observa en la Figura 33 A, CpxR-P produjo el retardo de la sonda a partir de una concentración de 0,5 μ M y al aumentar la concentración de CpxR-P se observa una disminución de la sonda de ADN libre y un aumento en la especie ADN/CpxR-P. Para identificar el sitio de reconocimiento de CpxR en el promotor de *scsABCD* (*P_{scs}*), se llevaron a cabo ensayos de protección a la ADNasa I. El regulador CpxR-P protegió desde el nucleótido (nt) -37 al nt -62 en la hebra codificante (panel izquierdo Figura 33 B) y desde el nt -42 al nt -66 en la hebra no codificante (panel derecho Figura 33 B). Como se muestra en la Figura 33 C el sitio de reconocimiento de CpxR (marcado en negrita) determinado experimentalmente coincide con el predicho en el análisis *in silico*.

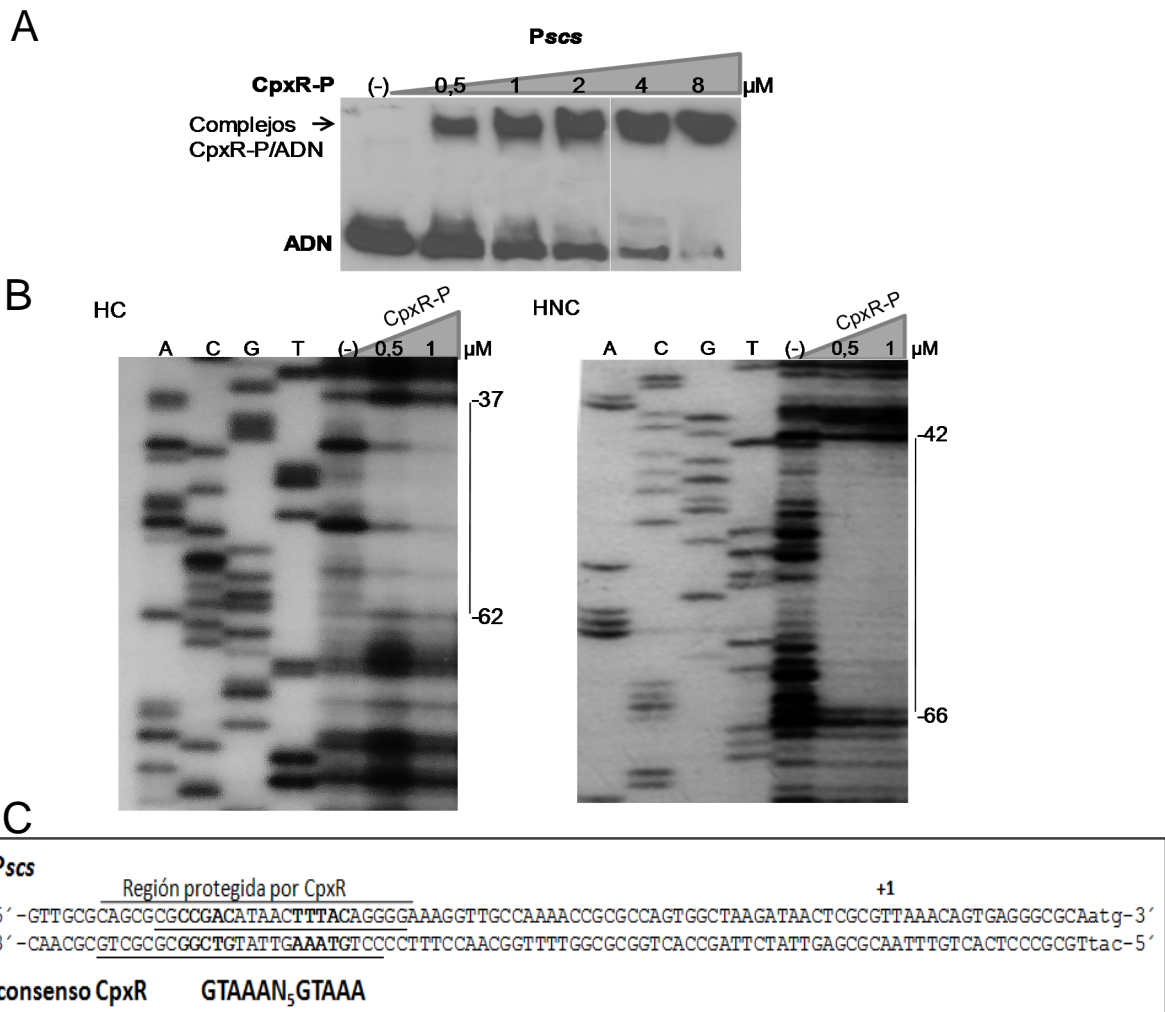


Figura 33. CpxR interacciona con la región promotora de *scsABCD*. (A) Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. Un fragmento de 303 pb que contiene la región promotora de *scsABCD* (Pscs) marcado con ³²P fue incubado con 0, 0,5, 1, 2, 4 y 8 μM de CpxR purificada y pre incubada con acetil fosfato (CpxR-P). ADN representa el fragmento de PCR sin retardo, la flecha indica el fragmento retardado por CpxR-P (B) Mapeo del sitio de unión de CpxR mediante análisis de ensayos de protección a la ADNasa I con la región promotora de *scs*. Se llevó a cabo sobre la región promotora de *scs* (Pscs) marcando tanto la hebra codificante (HC) como la hebra no codificante (HNC). Los fragmentos de ADN fueron incubados con CpxR purificada y pre incubada con acetil fosfato (CpxR-P) a las concentraciones finales de 5 y 10 μM. Las líneas sólidas indican las regiones protegidas por CpxR indicándose además las bases correspondientes a los extremos de las regiones de protección. (C) Secuencia de ADN de la región promotora de *scsABCD*. Las líneas indican las regiones protegidas por CpxR-P en cada hebra y en negrita se muestra el sitio de reconocimiento de CpxR en Pscs, 5'-GTAAAGttatGTCGG-3' que se encuentra en orientación opuesta al transcrito *scsABCD*. En el renglón de abajo se muestra el sitio consenso de CpxR.

Construimos dos cepas mutantes, en una de ellas se reemplazaron las bases CT del sitio de reconocimiento para CpxR por GC, denominada Pscs box⁽⁻⁾, y en la otra, se cambiaron y/o se deletaron bases dentro y fuera del sitio de reconocimiento (Pscs box^A). En la Figura 34 A se muestra en negrita la caja de reconocimiento de CpxR en el promotor de *scs* y en subrayado se indican las bases cambiadas, determinadas por secuenciación. En la Figura 34 B se muestra el ensayo de protección a la ADNasa I,

realizado con la región promotora silvestre y con la región promotora mutada en el sitio de unión de CpxR Pscs box^Δ. En este experimento se evidencia la pérdida de protección por parte de CpxR-P cuando se compara la sonda silvestre con la sonda con el sitio mutado, lo que indica que CpxR requiere de este sitio en la región promotora de scs para su interacción.

Se construyeron las fusiones reporteras en el plásmido sin promotor pMC1871 que contiene el gen *lacZ*, usando el promotor silvestre Pscs, el promotor con deleciones y modificaciones en el sitio de unión de CpxR, Pscs box^Δ, y el promotor modificado en dos bases del sitio de unión de CpxR Pscs box⁽⁻⁾, y se realizaron medidas de actividad β-galactosidasa. Como se observa en la Figura 34 C, la expresión del reportero desde el promotor Pscs box^Δ como desde el promotor Pscs box⁽⁻⁾ fue significativamente menor a la expresión desde el promotor silvestre Pscs. Además, los valores de actividad β-galactosidasa desde los promotores mutantes clonados en la cepa silvestre como en la mutante que carece del regulador de respuesta CpxR ($\Delta cpxR$) fueron similares. Esto indica que la pérdida del sitio de reconocimiento de CpxR en el promotor de scs previene su activación por parte del regulador de respuesta CpxR. Y esto se observa usando tanto una modificación muy grande (debido al "gap" en el promotor Pscs box^Δ), como una pequeña modificación (Pscs box⁽⁻⁾) que involucró un cambio de únicamente dos nucleótidos en la caja de unión de CpxR, (Fig. 34. C). Estos resultados corroboran la identidad del sitio de unión predicho y además confirman que la regulación transcripcional de *scsABCD* depende de CpxR, que ejerce su activación de manera directa sobre este promotor.

A

Pscs (silvestre)

5' - GCGCCGACATAACTTTTACAGGG- 3'

Pscs box⁽⁻⁾

5' - GCGCCGACATAACTTTCAGAGGG- 3'

Pscs box^Δ

5' - GCGTA-AC-TAA-TG---AGGG- 3'

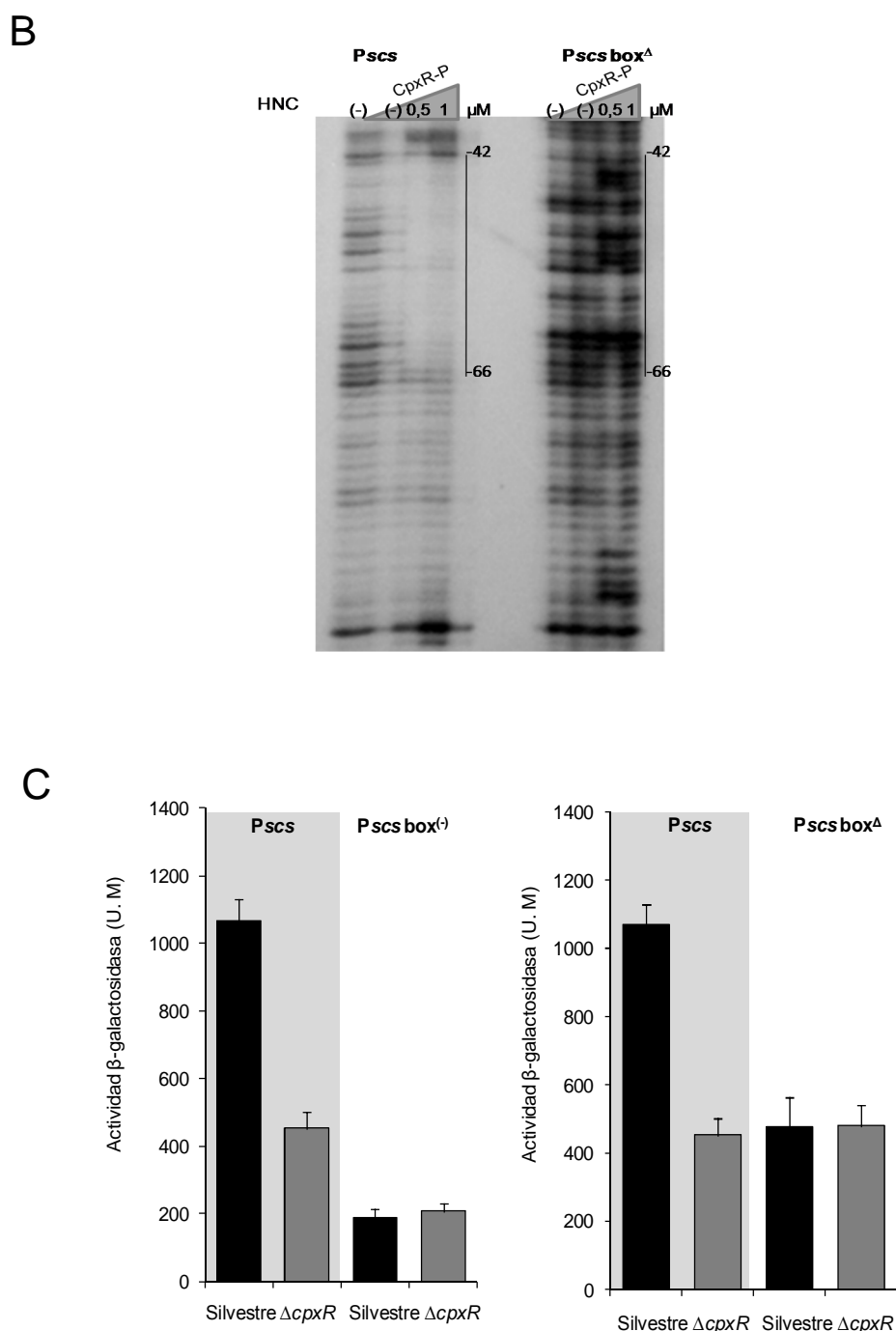


Figura 34. CpxR regula de forma directa la expresión de *scs*. (A). Secuencia de ADN de la región promotora de *scs* silvestre (*Pscs*), mutante con dos bases puntuales del sitio de reconocimiento para CpxR cambiadas (*Pscs box⁽⁻⁾*) y mutante con bases dentro y fuera del sitio de reconocimiento cambiadas o deletadas (*Pscs box^A*). En negrita se indica la caja de reconocimiento de CpxR y en subrayado se indican las bases cambiadas. (B) Interacción directa de CpxR con el promotor de *scs* silvestre, *Pscs*, y modificado en el sitio de reconocimiento se CpxR, *Pscs box^A*, con 0; 0,5 y 1 μ M de CpxR incubada con acetil fosfato (CpxR-P). (C) Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional reportera, en el plásmido sin promotor pMC1871, *Pscs* (promotor silvestre) y las mutantes en el promotor de *scs*, *Pscs box⁽⁻⁾* y *Pscs box^A* expresadas en un entorno silvestre o $\Delta cpxR$. Los cultivos fueron crecidos a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0. Se graficaron los valores promedios de tres experimentos independientes, las barras de error corresponden al desvío estándar.

En conjunto, los resultados mostrados suman evidencias a que el sistema de dos componentes CpxR/CpxA participa en la homeostasis de cobre de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium activando transcripcionalmente a *scsABCD*. Estos genes se inducen por cobre y confieren tolerancia a un exceso del metal. El locus *scs* es relevante para la sobrevivencia de *Salmonella* ya que, a pesar de que este patógeno codifica para varias proteínas de tipo tiorredoxinas extracitoplasmáticas, demostramos que sólo *scsABCD* se inducen por cobre, no así *dsbC*, *dsbG* y *dsbD*, y además únicamente las mutantes que carecen de los genes *scs* mostraron un fenotipo más marcado en la resistencia al metal. Asimismo, de un análisis preliminar de los resultados de ensayos de microarreglos, realizados en una estancia en el exterior por el Dr. Alejandro Pezza, se identificó un conjunto de genes activados por cobre de manera dependiente de CpxR, entre ellos los genes *scsABCD*, pero no los genes *dsbC*, *dsbG*, *dsbA* y *dipZ*. Estos indicios, sumado a que cuando se realizó una inspección de la región promotora de estos genes en busca de sitios de reconocimiento de CpxR no se encontraron cajas similares a la consenso, nos dirigen hacia la idea de que *Salmonella* ha desarrollado estrategias para lidiar con altas concentraciones de iones de metales como el cobre que le permitan responder de manera adaptativa y rápida para mantener la viabilidad celular. En este sentido, nuestros resultados sugieren una asociación entre los sistemas de dos componentes de transducción de señales, como CpxRA que está íntimamente implicado en el monitoreo de la acumulación de perturbaciones en la envoltura celular (Guest y Raivio 2016) y puede regular la expresión de los genes *scsABCD*, específicos de *Salmonella*, relacionados con la sobrevivencia y virulencia bacterianas (Anwar y col. 2013; Verbrugghe y col. 2016), de manera tal de obtener respuestas adaptativas a los cambios en la concentración de cobre.

V.7. Rol de ScsABCD en la respuesta a estrés oxidativo

En primer lugar, evaluamos la sensibilidad de la cepa silvestre y de mutantes en el locus *scs* frente a peróxido de hidrógeno. Incluimos como control positivo una mutante en *tpx* (que codifica para una tiorredoxinasa) de *Salmonella enterica*, ya que presenta una sensibilidad incrementada a peróxido de hidrógeno exógeno (Horst y col. 2010).

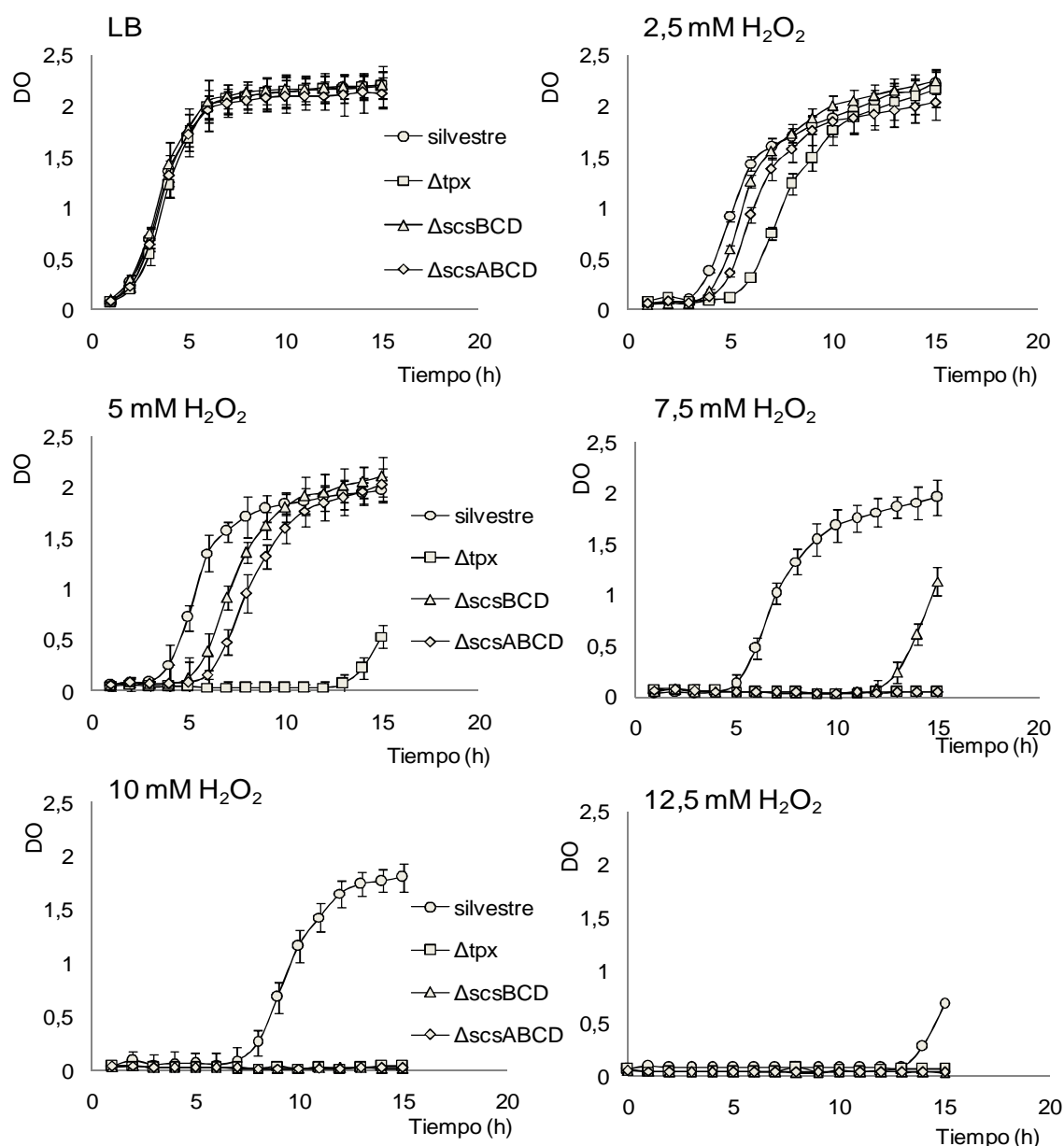


Figura 35. Los genes *scsABCD* participan en la respuesta a estrés mediado por peróxido de hidrógeno exógeno. Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600nm} (DO) de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre (círculo) y para las mutantes $\Delta scsBCD$ (triángulo), $\Delta scsABCD$ (rombo) y Δtpx (cuadrado), como control positivo. Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en condiciones de agitación y en aerobiosis, con el agregado de concentraciones crecientes de H_2O_2 exógeno, según se indica en la parte superior de cada gráfico. Los datos corresponden a valores promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

A una concentración de 5mM de H_2O_2 , se observó retardo en el crecimiento de las mutantes $\Delta scsABCD$ y $\Delta scsBCD$, evidenciado por una extensión de la fase *lag* respecto de la cepa silvestre (Figura 35). A esta concentración el retardo de la mutante Δtpx fue mucho más pronunciado (primer panel del medio), mostrando ya un defecto en el crecimiento a la menor concentración ensayada de 2,5 mM de H_2O_2 (panel

superior derecho). La mutante que carece del locus completo *scsABCD* mostró mayor sensibilidad al estrés oxidativo generado por 7,5 mM H₂O₂ que la cepa carente de los genes *scsBCD* (segundo panel del medio), indicando un rol preponderante del producto de *scsA* entre los genes del locus *scs* en la respuesta a este tipo de estrés. Todas las mutantes fueron incapaces de crecer en un medio conteniendo 10 mM de H₂O₂ a diferencia de la cepa silvestre (panel inferior derecho).

Si bien se ha reportado que la delección de *scsA* aumenta la sensibilidad a peróxido de hidrógeno este fenotipo no se observó al eliminar el locus completo *scsABCD*, aunque la ausencia de los cuatro genes provocó una mayor acumulación de proteínas periplasmáticas carboniladas en presencia de H₂O₂ (Anwar y col. 2013). Nuestras determinaciones difieren parcialmente de las reportadas, ya que observamos que las cepas que carecen de los genes *scsABCD* presentan defectos en el crecimiento cuando están expuestas a especies oxidativas, demostrando que los productos Scs están involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno exógeno y se requieren para el crecimiento óptimo de *S. Typhimurium* frente a este tipo de estrés. Cada una de las mutantes individuales en los genes *scs* presentó un defecto ante la presencia de H₂O₂, además de la contribución de ScsA indicada previamente. En comparación, la mutante $\Delta scsA$ no presentó crecimiento a 7,5 mM H₂O₂ (Fig. 36 C), mientras que las mutantes $\Delta scsC$ y $\Delta scsD$, mostraron una fase *lag* más prolongada a las dos concentraciones de H₂O₂ ensayadas (Figura 36 B y C). Sólo se observó un retardo en el crecimiento de la mutante $\Delta scsB$ a la concentración más alta de H₂O₂ ensayada (Fig. 36 C). Estos resultados destacan un rol para todas las proteínas Scs en la defensa contra estrés oxidativo, sugiriendo un nuevo vínculo entre las proteínas que participan en el plegamiento oxidativo y los mecanismos anti-oxidativos en la envoltura de este patógeno.

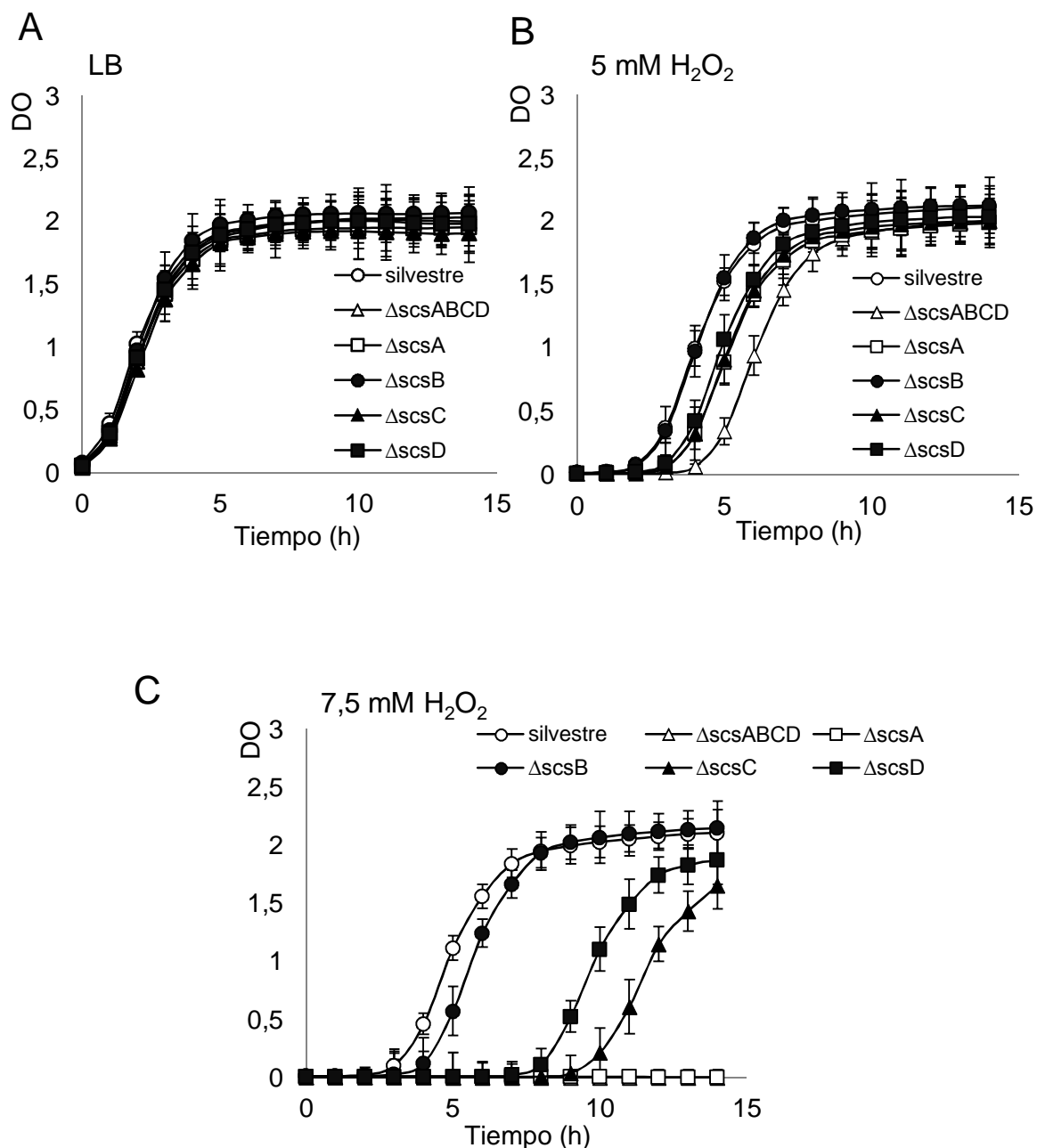


Figura 36. ScsA contribuye mayormente a la respuesta a estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno exógeno. (A-C) Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600nm} (DO) de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre (círculo vacío) y para las mutantes $\Delta scsABCD$ (triángulo vacío), $\Delta scsA$ (cuadrado vacío), $\Delta scsB$ (círculo lleno), $\Delta scsC$ (triángulo lleno) y $\Delta scsD$ (cuadrado lleno). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en condiciones de agitación y en aerobiosis, con el agregado de concentraciones crecientes de H_2O_2 exógeno, según se indica en la parte superior de cada gráfico. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

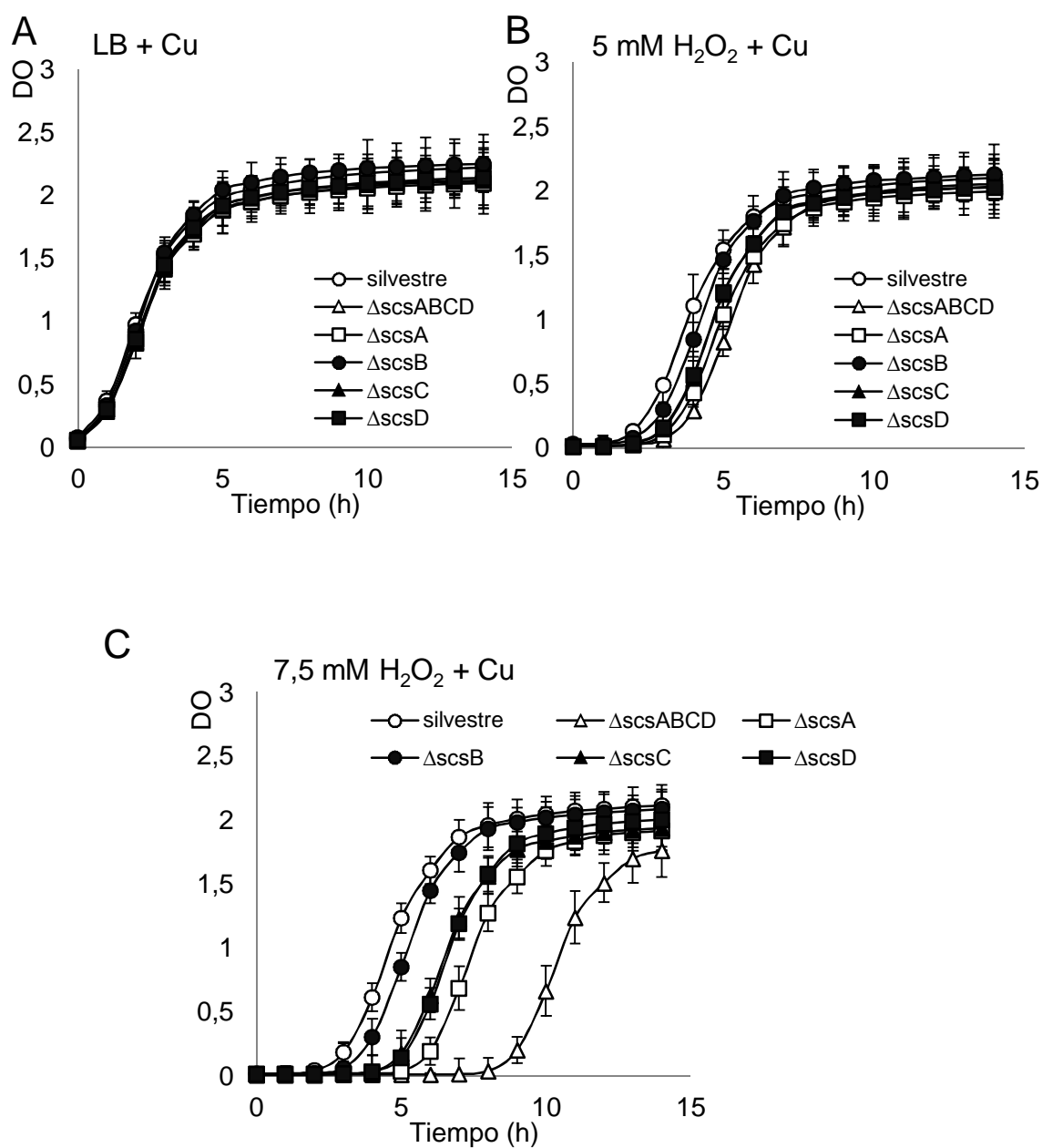


Figura 37. El cobre exógeno protege a las cepas mutantes en los genes *scs* del estrés oxidativo mediado por H₂O₂. (A-C) Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600nm} (DO) de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre (círculo vacío) y para las mutantes $\Delta scsABCD$ (triángulo vacío), $\Delta scsA$ (cuadrado vacío), $\Delta scsB$ (círculo lleno), $\Delta scsC$ (triángulo lleno) y $\Delta scsD$ (cuadrado lleno). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en condiciones de agitación y en aerobiosis, con el agregado de concentraciones crecientes de H₂O₂ exógeno, en simultáneo con una concentración fija subletal de 1 mM CuSO₄ (+ Cu), según se indica. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Observamos que en ausencia de los productos del locus *scs* el cobre ejerce un efecto protector al daño producido por H_2O_2 (Figura 37 B y C). Esta protección se evidenció como una disminución en la extensión de la fase *lag* de las cepas mutantes, sobre todo a la concentración máxima de H_2O_2 (Figura 37 C vs Figura 36 C). Este efecto se observó incluso cuando el cultivo de la cepa que carece de *scsABCD* fue pre-tratado con 1 mM $CuSO_4$ durante 1 h, lavado y luego expuesto a peróxido de hidrógeno durante todo el crecimiento (Figura 38), por lo que la protección depende de la expresión inducida por Cu, sobre todo en las cepas que carecen de *scsA* y de *scsABCD*.

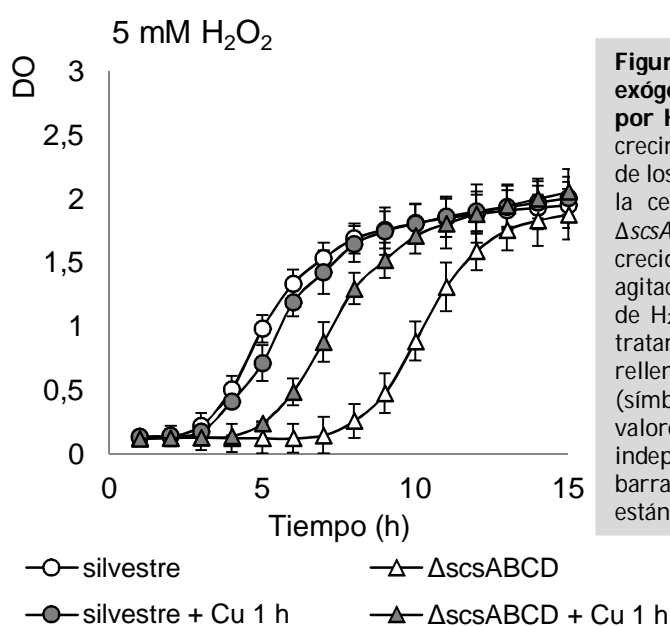


Figura 38. El pre-tratamiento con cobre exógeno protege del estrés oxidativo mediado por H_2O_2 en la mutante $\Delta scsABCD$. Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600nm} (DO) de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre (círculo) y para la mutante $\Delta scsABCD$ (triángulo). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en condiciones de agitación y en aerobiosis, con el agregado de 5 mM de H_2O_2 a cultivos lavados después de un pre-tratamiento con $CuSO_4$ por una hora (símbolos rellenos con color gris) o sin pre-tratamiento (símbolos vacíos). Los datos corresponden a valores promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

La causa principal de la toxicidad celular del Cuno ha sido del todo dilucidada aún. Se ha postulado que, tal como ocurre *in vitro*, el $Cu(I)$ reacciona con moléculas de H_2O_2 endógenas para generar radicales hidroxilos (Dupont y col. 2011) en un proceso análogo a la reacción de Fenton. Cuando la reacción análoga es generada *in vivo* por $Fe(II)$, los radicales hidroxilos son potentes oxidantes del ADN causando mutagénesis y letalidad (Imlay y col. 1988). Sin embargo, son escasas las evidencias directas que muestren que la generación de EROs inducida por Cu es la causa principal de la toxicidad del metal (Macomber y col. 2007). En *E. coli*, se han sugerido mecanismos alternativos de la toxicidad por Cu en los cuales el cobre, en lugar de estar involucrado en el daño oxidativo del ADN, suprimiría el daño mediado por el Fe (Macomber y col. 2007), aunque tampoco se ha demostrado cuál es el mecanismo de esta protección. Según nuestros resultados (Figuras 37 y 38) el efecto protector que ejerce una

concentración subletal de cobre a las células que son crecidas en presencia de peróxido de hidrógeno exógeno, es más marcado en las cepas que carecen de *scsA* o *scsABCD*. Esto sugiere que en estos entornos se inducirían defensas antioxidantes mediadas por cobre. El desbalance en la envoltura celular generado por la ausencia de las proteínas Scs en presencia de H_2O_2 parece ser compensado en parte por la preincorporación de cobre, mejorando el crecimiento de las cepas afectadas.

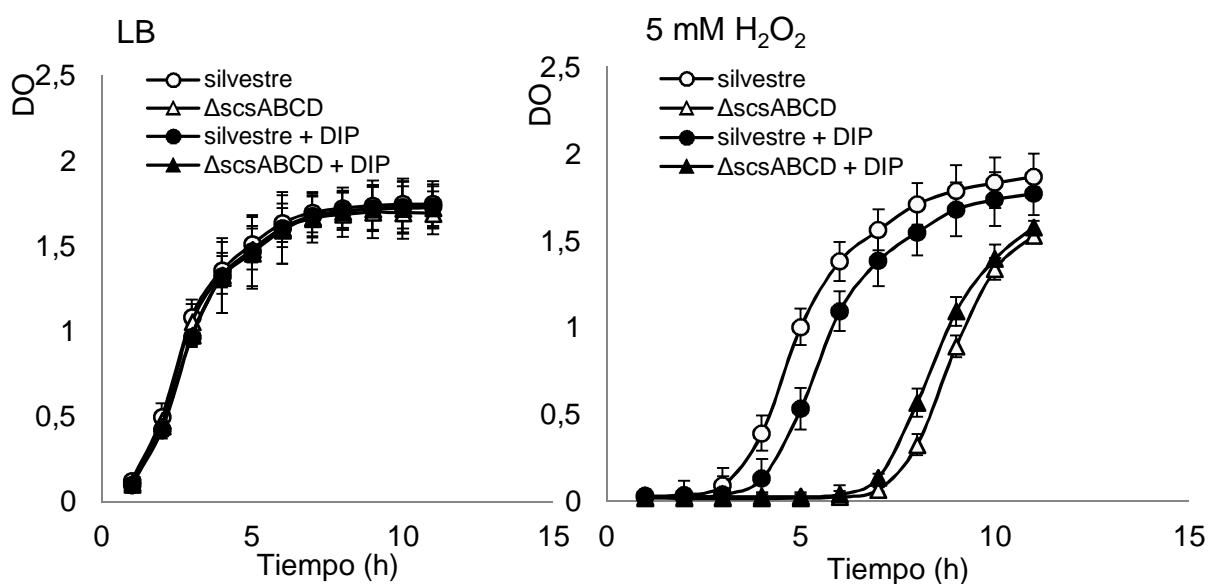


Figura 39. Curvas de crecimiento de la cepa silvestre y mutante $\Delta scsABCD$ en medio LB sin (A) y con el agregado de 5 mM H_2O_2 (B) en ausencia o en presencia del quelante de hierro 2,2'-dipiridilo (+ DIP). Se determinó la DO_{600nm} (DO) de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre (círculo) y para la mutante $\Delta scsABCD$ (triángulo). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB en condiciones de agitación y en aerobiosis, con el agregado de 5 mM de H_2O_2 en ausencia (símbolos vacíos) o en presencia (símbolos color negro) del quelante de hierro 2,2'-dipiridilo. Los datos corresponden a valores promedio de dos experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la

Nuestros resultados muestran un efecto sutil que va en dirección a lo reportado en *E. coli* por Macomber y colaboradores, que proponen que el cobre puede proteger a las células que acumulan el metal y que se enfrentan a un estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno exógeno (Macomber y col. 2007), bloqueando el daño oxidativo generado por el hierro y el H_2O_2 . En este sentido, observamos una leve recuperación del crecimiento de la cepa mutante $\Delta scsABCD$ respecto de la cepa silvestre en presencia del quelante de hierro 2,2'-dipiridilo (Figura 39), sugiriendo que tanto cobre como un quelante de hierro pueden bloquear el daño que produce el Fe en presencia de H_2O_2 . De todas formas es evidente que existen otros mecanismos involucrados en la reducción del daño oxidativo, ya que el efecto observado no fue muy

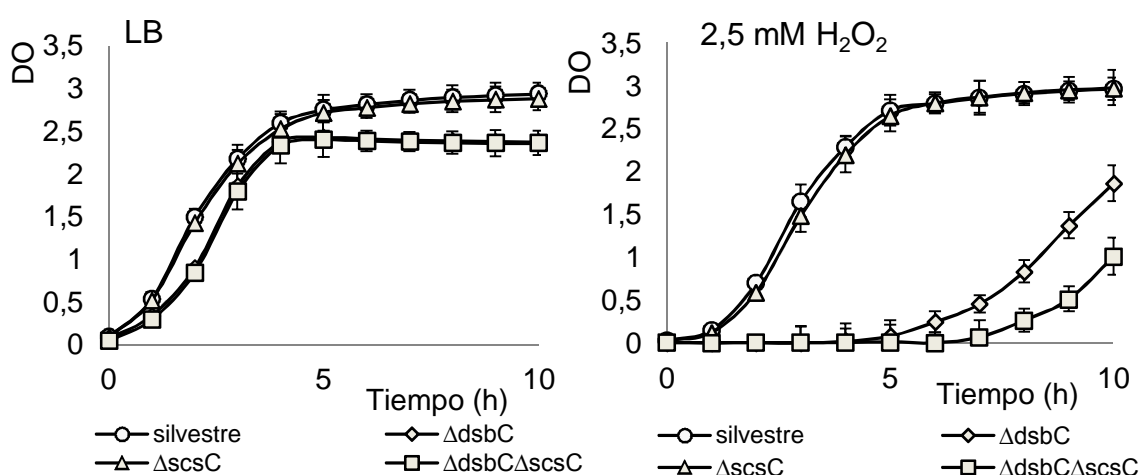
marcado. Asimismo, se ha reportado que la producción de sideróforos, como enterobactina y salmoquelina, aumenta la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de los macrófagos, sobre todo durante las etapas tempranas de la infección, coincidiendo con el estallido respiratorio (Achard y col. 2013). Además, la síntesis de estos sideróforos tiene un rol adicional en la protección de las células bacterianas frente a las EROs, ya que una cepa que carece de algunas de las enzimas (EntC e IroB) que participan en la biosíntesis de estos sideróforos es más sensible al estrés oxidativo generado por H₂O₂ exógeno (Achard y col. 2013) y al suministrar el precursor de enterobactina ácido 2,3-dihidroxibenzoico (DHB) se proporciona nuevamente protección frente a las EROs (Achard y col. 2013). El locus *entCEBA*, que codifica para las enzimas implicadas en la síntesis de enterobactina y salmoquelina, se induce luego de la exposición a cobre de *Salmonella* Typhimurium (Pontel y col. 2014) y también hemos observado, de los resultados de los microarreglos realizados por Lucas Pontel, que el locus *iroBCDE* (que participa en la biosíntesis de salmoquelina) presenta un perfil transcripcional de inducción por cobre similar al del locus *entCEBA*. En base a estas evidencias y observaciones, postulamos que la protección por cobre, más marcada en las mutantes $\Delta scsA$ y $\Delta scsABCD$, frente a un estrés generado por peróxido de hidrógeno, también podría relacionarse a la activación de sideróforos, como enterobactina y salmoquelina, capaces de proteger a las células del estrés oxidativo.

Los genes *scsABCD* presentan homología a proteínas tipo tiorredoxinas, como TlpA del género *Neisseria* (Gupta y col. 1997). Se ha reportado que estas tiorredoxinas están involucradas en la protección contra el estrés generado por peróxido exógeno en bacterias patógenas, y se ha establecido un vínculo entre estas proteínas y la virulencia de estos microorganismos (Achard y col. 2009; Andisi y col. 2012).

V.8. DsbC cumple un rol en la protección contra el estrés oxidativo en *Salmonella Typhimurium*

Como se ha detallado en la introducción, uno de los mecanismos utilizados por los macrófagos para controlar la sobrevivencia de *Salmonella* en el interior de la vacuola que la contiene, es la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (EROs) y del nitrógeno (ERNs) (Slauch 2011). La oxidasa fagocítica produce superóxido que entra al periplasma y potencialmente daña a las bacterias por reducción u oxidación de blancos desconocidos (Slauch 2011). SodCI protege a las células porque dismuta el superóxido a peróxido de hidrógeno (Slauch 2011). Además, *Salmonella* produce catalasas y peroxidasas capaces de mantener los niveles de peróxido por debajo de las concentraciones tóxicas (Slauch 2011). En el apartado anterior, observamos que las proteínas Scs protegen la envoltura celular de *S. Typhimurium* del estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno.

Habiendo demostrado que el sistema ScsABCD participa en la protección contra el estrés oxidativo, analizamos si otras proteínas de tipo tiorredoxinas extracitoplásmicas cumplen un rol en la defensa anti-oxidante. Comparamos las curvas de crecimiento de la cepa silvestre y de mutantes $\Delta dsbC$, $\Delta scsC$ y $\Delta dsbC \Delta scsC$ frente a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno exógeno (Fig. 40).



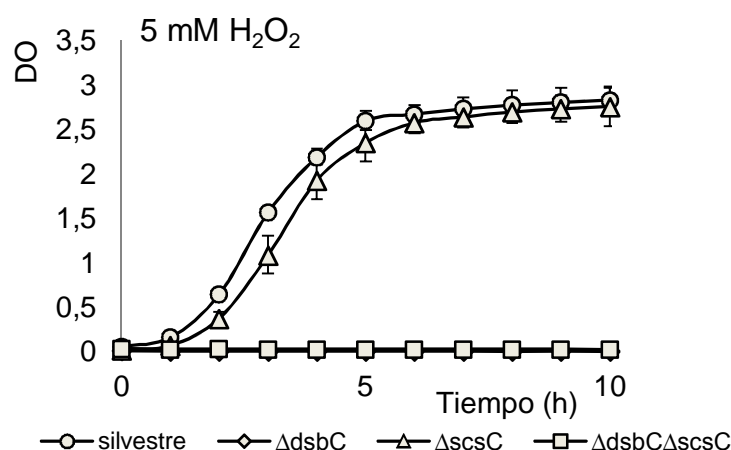


Figura 40. DsbC cumple un rol predominante respecto a ScsC en la respuesta a estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno. Se determinó la densidad óptica de las cepas silvestre (círculo), $\Delta scsC$ (triángulo), $\Delta dsbC$ (rombo) y $\Delta dsbC \Delta scsC$ (cuadrado) en función del tiempo en cultivos líquidos crecidos a 37 °C en microplaca de 96 wells con agitación continua, sin agregado de H_2O_2 (LB) y con 2,5 y 5 mM final de H_2O_2 .

Los resultados de la Figura 40 indican que DsbC cumple un rol en la protección contra el estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno exógeno en *Salmonella* Typhimurium. La cepa que carece de *dsbC* muestra un marcado defecto en el crecimiento en presencia de 2,5 mM H_2O_2 , y lo mismo ocurre con la doble mutante $\Delta dsbC \Delta scsC$ mientras que la mutante $\Delta scsC$ y la cepa silvestre presentaron crecimiento normal a esa concentración. En presencia de 5 Mm H_2O_2 no se observó crecimiento de las cepas mutantes $\Delta dsbC$ como $\Delta dsbC \Delta scsC$, mientras que la mutante $\Delta scsC$ mostró un retardo sutil en su crecimiento respecto de la cepa silvestre (Figura 40). Esto indica que DsbC tiene una participación más relevante que ScsC frente al estrés generado por peróxido de hidrógeno. Si bien ambos sistemas de reducción/isomerización, son requeridos para la protección de la envoltura frente a estrés por cobre o por peróxido de hidrógeno, sus roles se enmascaran y parecen diferenciarse en relevancia según el tipo de estrés; ScsC cumple un papel más predominante frente al daño por cobre y DsbC, frente al daño oxidativo generado por peróxido de hidrógeno.

8.1. DsbC es requerida para el crecimiento óptimo en aerobiosis

Una mutante carente de las tres catalasas y las dos hidropéroxido reductasas y en consecuencia, carente de 5 enzimas citoplasmáticas que eliminan H_2O_2 , forma

largos filamentos tras el cambio de anaerobiosis/aerobiosis (Hebrard y col. 2009). Esto puede asociarse a dificultades en la replicación del ADN (Hebrard y col. 2009), como así también a una fuerte y descontrolada estimulación de los sistemas de dos componentes como PhoPQ o CpxRA (Delhaye, Collet, y Laloux 2016; Yadavalli y col. 2016), que puede conducir a perturbaciones en la homeostasis de peptidoglicano (PG) o lípidos de membrana.

Nosotros observamos que la cepa $\Delta dsbC$ de *S. Typhimurium* presenta un defecto sutil en el crecimiento aún en medio rico (LB) en condiciones de agitación y en aerobiosis (Figura 40). A diferencia de las cepas silvestre y $\Delta scsC$, observamos células filamentosas en cultivos de la mutante $\Delta dsbC$ en LB con agitación (Figura 41). Esto sugiere que DsbC participa en la protección contra el daño oxidativo generado tanto por peróxido de hidrógeno exógeno como por un *shock* respiratorio que ocurre durante el cambio de anaerobiosis a aerobiosis y que es capaz de generar EROs endógenas. Esto pone de manifiesto la relevancia de la proteína DsbC en la protección de la envoltura de la oxidación de residuos de cisteínas por las EROs.

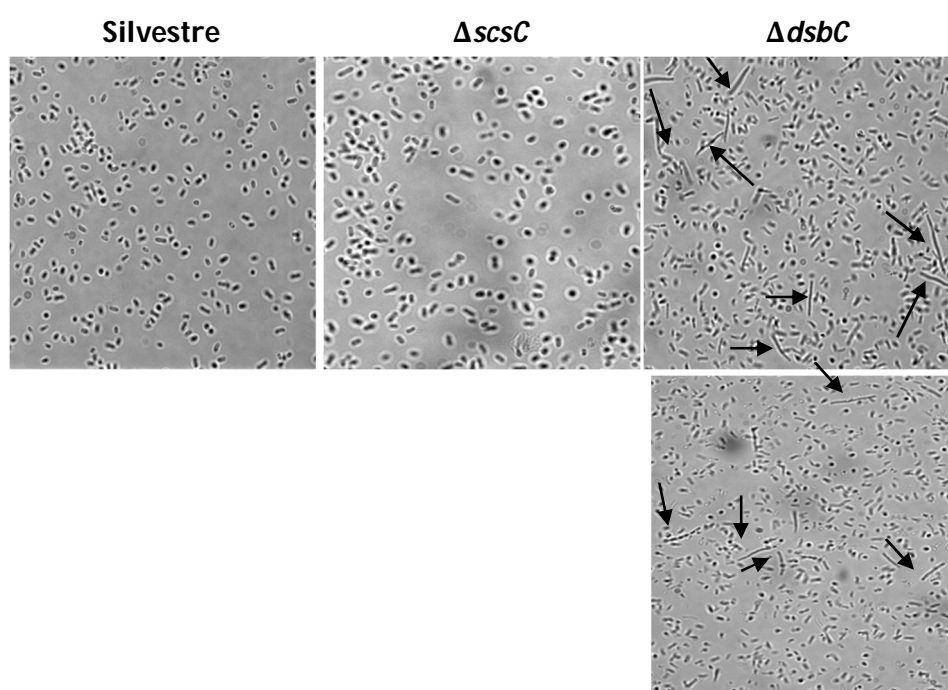


Figura 41. DsbC presenta un defecto en el crecimiento relacionado a filamentos. Cepas de *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium 14028 (Silvestre), $\Delta scsC$ y $\Delta dsbC$ fueron crecidas en medio rico LB anaeróbicamente hasta fase logarítmica temprana. Posteriormente se inocularon en un medio fresco LB y crecidas aeróbicamente hasta DO_{600nm} de 0,5 y se observaron en el microscopio (Magnificación 100 X). Las flechas señalan las bacterias que forman largos filamentos.

En el ambiente oxidante del periplasma, existen proteínas que requieren que sus residuos de cisteínas sean mantenidos en estado reducido (Depuydt y col. 2009; Denoncin y col. 2014). Debido a que estos residuos no están formando enlaces disulfuro, dichas cisteínas son vulnerables a la oxidación y pueden ser dañadas por las EROs en el periplasma mediante la formación de ácido sulfénico (Arts y col. 2015). Se conocen muy pocos sustratos de DsbC, sobre todo los de este tipo que necesitan que sus cisteínas sean reducidas y protegidas de la sulfenilación y posterior inactividad si las especies sulfeniladas continúan su oxidación a las formas irreversibles. Los defectos observados en la mutante $\Delta dsbC$ frente a aerobiosis y condiciones más oxidantes como el agregado de peróxido de hidrógeno exógeno, sugieren que DsbC de *Salmonella enterica* presenta sustratos sensibles a la oxidación que pueden estar involucrados en el ensamblaje de PG y la integridad de las membranas, ya que al ser inactivados generan grandes defectos en el crecimiento y aberraciones morfológicas como la filamentación.

Contar con múltiples vías de reducción en el medio ambiente oxidante del periplasma cobra relevancia para un patógeno como *Salmonella*, no sólo para asegurar el correcto plegamiento en este compartimento, sino también para contribuir con la protección de las proteínas contra la inactivación, tanto por la eliminación directa de las EROs antes de que alcancen sus blancos proteicos, o por asegurar la reparación de las proteínas oxidadas. De esta forma, se puede asociar un mayor número de proteínas de tipo tiorredoxinas periplasmáticas a una mayor contribución específica en la defensa frente a los radicales oxigénicos generados por los macrófagos, microorganismos competidores y ambientes ricos en metales. Así, las bacterias patógenas, entre ellas *Salmonella*, han convertido a determinadas proteínas en un arsenal defensivo frente al ataque de células fagocíticas, contribuyendo significativamente a su potencial virulento. Asimismo, este arsenal podría contribuir no sólo dentro del hospedador sino también en la sobrevivencia de los patógenos en el medio ambiente, favoreciendo también a la efectividad con que se transmiten ya que aumenta la persistencia de *Salmonella* y por ende su virulencia.

V.9. Conclusiones Capítulo II

En este capítulo se avanzó en la caracterización de los genes *scsA*, *scsB*, *scsC* y *scsD*, en su rol en la homeostasis de Cu y participación en la protección contra el daño oxidativo y en la regulación de la expresión de estos genes, inducida por cobre.

La tecnología de microarreglos de ADN nos permitió evaluar el patrón de expresión de *Salmonella Typhimurium* silvestre bajo estrés generado por cobre o por zinc. En particular, el análisis realizado en esta oportunidad se focalizó en la búsqueda de nuevos genes que se encuentren activados por cobre y que sean específicos de especie. De esta manera se logró identificar el locus *scs*, supresor de la sensibilidad a cobre, que codifica para proteínas de la envoltura celular bacteriana. Mediante ensayos de RT-PCR y RT-qPCR validamos los resultados obtenidos de los microarreglos y además observamos que los genes *scsA* y *scsB* están fuertemente inducidos por cobre, incluso hasta una hora después de exposición al metal. Esta inducción fue específica de cobre y no de zinc, por lo que productos Scs protegerían blancos concretos de la envoltura bacteriana del daño por un exceso de cobre.

Demostramos que los genes *scsA* se transcriben principalmente a partir de la región promotora de *scsA*, lo que sugiere que estarían conformando un operón.

La inducción inducida por cobre de los genes *scsA*, *scsB*, *scsC* y *scsD* está relacionada con su rol en la homeostasis de cobre, ya que también corroboramos y pudimos correlacionar los resultados transcripcionales con los obtenidos fenotípicamente. Evidenciamos el rol de las proteínas ScsABCD en la resistencia a cobre en aerobiosis, ya que existen diferencias en la concentración inhibitoria mínima para este metal entre $\Delta scsABCD$ y la cepa silvestre.

Asimismo, sólo observamos que este sistema confiere resistencia a cobre pero no a otros metales ensayados, que al igual que el cobre pueden generar toxicidad desplazando cofactores metálicos nativos. El sistema Scs constituye un nuevo mecanismo de respuesta y resistencia al estrés generado por cobre en el periplasma.

ScsC, DsbC y DsbG son requeridas para la resistencia a Cu, pero el rol de ScsC es más relevante para aliviar el estrés generado por este metal en el periplasma. DsbC y DsbG cumplirían un papel de respaldo que actúa sobre todo cuando ScsC no puede

funcionar correctamente. Las tres isomerasas/reductasas presentarían distintos blancos en la respuesta al estrés por cobre.

Avanzamos en la caracterización de los sistemas extracitoplasmáticos que participan en la protección contra el daño oxidativo en este compartimento. El sistema ScsABCD cumple un rol en la resistencia a peróxido de hidrógeno exógeno, lo que sugiere que *Salmonella Typhimurium* cuenta con estas proteínas como defensa antioxidante para detoxificar el periplasma antes de que el daño llegue al citoplasma.

DsbC es una de las proteínas periplasmáticas que cumple un rol más predominante en la defensa contra el estrés oxidativo. Una cepa que carece de DsbC, presenta alteraciones en su crecimiento óptimo en aerobiosis, que está asociado a aberraciones morfológicas como la filamentación. Frente a un *shock* respiratorio, se requiere la participación de DsbC para mantener reducidos a los residuos de cisteínas vulnerables a las especies reactivas del oxígeno. Asimismo, en comparación con el rol de la proteína Scs, DsbC es necesaria a menores concentraciones de peróxido de hidrógeno exógeno, lo que pone de relieve su rol más predominante frente a especies oxidantes que perturban el periplasma y otorga un rol de respaldo a ScsC.

Salmonella enterica serovar Typhimurium mantiene esta amplia variedad de genes que codifican para proteínas de tipo tiorredoxinas periplasmáticas ya que cumplirían distintos roles en la defensa frente a diferentes perturbaciones de la envoltura. Hemos observado que los genes *scsABCD* se inducen por cobre, no así los genes del sistema Dsb, lo que constituye una modulación diferencial de la expresión de este repertorio de genes, otorgándole a un patógeno como *Salmonella* distintas capacidades para proteger a las células de la toxicidad generada por cobre o peróxido de hidrógeno.

Demostramos que la expresión de *scsABCD* depende del sistema de dos componentes de respuesta a estrés de envoltura celular CpxRA. Se demostró que a pH neutro, la expresión de *scsABCD* requiere de las señales detectadas por la histidina quinasa CpxA que activa mediante fosforilación a la proteína reguladora de la respuesta CpxR. CpxR regula positivamente y de manera directa la transcripción de *scs*, reconociendo su sitio de unión en la región promotora de *scsABCD*.

Mediante retardo de la movilidad electroforética y ensayos de protección a la ADNasa I se demostró que la proteína reguladora CpxR se une a la región promotora de *scs* a través de su caja CpxR y que este sitio de reconocimiento es esencial para su interacción con el promotor de los genes *scs*. Además demostramos que este sitio de unión de CpxR se necesita *in vivo* para modular la transcripción de *scsABCD*. Asimismo la sobreexpresión de la lipoproteína NlpE induce la transcripción de los genes *scs*, lo que suma evidencias a la necesidad de un sistema Cpx intacto para la modulación génica de *scs*. La presencia de un sitio de unión a CpxR dentro de 100 pb del sitio de inicio de la transcripción independientemente de la orientación se correlaciona positivamente con una fuerte regulación dependiente de Cpx. Todo esto demuestra que los genes *scs* son nuevos miembros del regulón Cpx y están regulados fuertemente por este sistema.



CONCLUSIONES GENERALES

VI. CONCLUSIONES GENERALES

En *Salmonella Typhimurium* se ha demostrado que CueP cumple un rol relevante en la resistencia a cobre en condiciones de anaerobiosis (Pontel y Soncini 2009). La expresión de CueP requiere de la activación simultánea por parte de los reguladores transcripcionales CueR y CpxR, que reconocen y se inducen por la presencia de cobre en el citoplasma y por el estrés que causa el exceso del metal en la envoltura bacteriana, respectivamente.

Bajo condiciones de estrés de la envoltura causadas por exceso de cobre, el regulador de respuesta CpxR, fosforilado por la histidina quinasa CpxA, aumenta su afinidad por su sitio de unión en el promotor de *cueP*. La activación de CpxR por la proteína sensora CpxA es necesaria para coordinar la señal del estrés periplasmático con la señal citoplasmática detectada por CueR, que detecta Cu(I) en el citosol (Figura 12). Demostramos que la regulación por parte de CpxR es esencial para que CueP proteja del daño generado por cobre en condiciones de anaerobiosis (Figura 13).

Demostramos también la relevancia fisiológica del control estricto de la expresión espacio-temporal de CueP que se logra gracias a la acción coordinada de dos reguladores, CueR y CpxR/CpxA que detectan diferentes estímulos en compartimentos distintos. Observamos que la presencia de cobre estimula la expresión de CueP desde su promotor nativo a partir de las tres horas de exposición al metal, alcanzando un máximo entre las cinco y doce horas, es decir, durante la fase exponencial tardía y estacionaria de la curva de crecimiento. En esas fases de crecimiento se observa una diferencia marcada entre la ausencia y presencia de cobre exógeno (Fig. 14), a diferencia de lo que ocurre cuando artificialmente direccionamos la expresión a través de un promotor independiente de CpxR (Fig. 14). En este caso, observamos una expresión desregulada de la síntesis de CueP que afecta el crecimiento de *Salmonella Typhimurium* tanto en aerobiosis como en condiciones de estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno (Figuras 16), indicando que la falta de control en la expresión de *cueP* no es favorable para el *fitness* de *Salmonella* en ciertas condiciones ambientales.

CpxR~P y CueR-Cu se unen a sus sitios de reconocimiento presentes en la región promotora de *cueP*. Diversos ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) nos permitieron identificar y caracterizar la naturaleza de los complejos formados entre la ARNP, CueR y CpxR sobre el promotor de *cueP*. Esto nos permitió analizar cómo el metaloregulador CueR, en sus dos estados, apo- y holo-CueR, afecta junto con CpxR~P la transcripción de *cueP*. Evaluamos también cómo el regulador de respuesta CpxR, en sus dos estados, fosforilado o no fosforilado, participa en la formación de complejos activos que transitan a especies competentes para el inicio de la transcripción de *cueP*. Los resultados de la Figura 19 indican que CpxR~P es necesario para la formación de complejos activos transcripcionalmente con la ARN polimerasa, mientras que CueR-Cu, como un típico regulador tipo MerR, facilita la orientación apropiada de los elementos -35 y -10 del promotor de *cueP*. CueR es su estado inactivo (apo-CueR), forma complejos cerrados, reforzando el dominio de especies cerradas que no transitan a complejos abiertos cuando se incuban en conjunto con CpxR~P (Fig. 19). En cambio, la presencia del efector Cu unido a CueR (CueR-Cu), promueve la formación de complejos cerrados que se estabilizan junto con CpxR~P para transitar a complejos abiertos competentes que pueden dar inicio a la transcripción de *cueP* al adicionar NTPs (figura 19 A y B). De los dos reguladores transcripcionales, únicamente el regulador de respuesta CpxR~P es esencial para el reclutamiento de la ARNP en el promotor de *cueP* (Figura 20). Tanto CpxR como CpxR~P forman complejos abiertos (Figura 22), aunque luego direccionados a un final distinto, siendo sólo el estado fosforilado el que promueve los complejos de iniciación (Figura 22), lo que le otorgaría una ventaja a *Salmonella* para eliminar rápidamente la activación transcripcional de *cueP* una vez que la señal que fosforila a CpxR es removida. De esta manera, se podría desactivar la expresión de *cueP* cuando las condiciones no son las apropiadas para su síntesis, como por ejemplo frente a estrés oxidativo. Demostramos que tanto el cobre unido a CueR como la fosforilación de CpxR son claves para el control fino del inicio de la transcripción de *cueP* que codifica para la principal cuproproteína de la envoltura bacteriana.

En la segunda parte de este trabajo de Tesis profundizamos en el vínculo entre el sistema de respuesta a estrés de envoltura CpxR y la homeostasis de cobre en *Salmonella*. Caracterizamos funcional y transcripcionalmente a los genes del locus *scs*,

específicos de este patógeno, que codifican para proteínas de la envoltura celular. Al igual que *cueP*, los genes *scsA*, *scsB*, *scsC* y *scsD* se inducen por cobre (Figuras 23 y 24) y participan de manera específica en la resistencia a cobre y no a otros metales ensayados (Figuras 27, 28, 29 y 30). Demostramos también que forman parte de la defensa anti-oxidativa de la envoltura bacteriana contra las especies reactivas del oxígeno (EROs) generadas por peróxido de hidrógeno (Figuras 35 y 36). Ambos roles, ya sea la protección frente a un exceso de cobre o de H₂O₂, son compartidos con otras proteínas homólogas de tipo tiorredoxinas extracitoplasmáticas. Las tres proteínas de tipo isomerasas/reductasas, ScsC, DsbC y DsbG son requeridas para la resistencia a Cu, pero el rol de ScsC es más relevante para aliviar el estrés generado por este metal en el periplasma. DsbC es una de las proteínas periplasmáticas de tipo tiorredoxinas que cumple un rol más predominante en la defensa contra el estrés oxidativo (Fig. 40), mientras que el sistema ScsABCD participa en respuesta a concentraciones más elevadas de especies oxidantes (Fig. 36). Hemos avanzado en la caracterización de estos sistemas de la envoltura celular de *Salmonella* que participan en la protección contra el daño oxidativo en este compartimento, por lo que *S. Typhimurium* cuenta con estas proteínas como defensa antioxidante para detoxificar el periplasma antes de que el daño de las EROs llegue al citoplasma.

Observamos que los genes *scsABCD* se inducen por cobre, no así los genes del sistema Dsb (Figura 23 y 25), lo que le otorga a un patógeno como *Salmonella* distintas capacidades para proteger a las células de la toxicidad generada por cobre o peróxido de hidrógeno, mediante la modulación de la expresión de estos genes. En relación a esto, determinamos que los genes *scs* pertenecen al regulón Cpx y que la inducción por cobre depende del sistema de dos componentes CpxR/CpxA (Figuras 32 y 33).

Si bien *Salmonella Typhimurium* carece de un sistema específico de respuesta a iones de cobre en la envoltura bacteriana, ya que perdió el operón *cusCFBA*, controlado transcripcionalmente por el sistema de transducción de señal de dos componentes CusR/CusS, es capaz de responder al exceso de cobre en el periplasma bacteriano induciendo la transcripción de genes específicos de su género, como *cueP* y los genes del locus *scs*. Esta inducción por cobre depende del regulador de respuesta CpxR activado por la histidina quinasa CpxA, que detecta la señal en la envoltura bacteriana.

Una vez activado, CpxR reconoce su sitio de unión sobre la región promotora de estos genes, promoviendo así la transcripción de *cueP* y los genes *scsABCD*, cuyos productos participan en la resistencia a cobre. Se ha reportado que CueP y el sistema Scs cumplen un rol en la virulencia de *Salmonella* (B.-Y. Yoon, Yeom, y col. 2014; Anwar y col. 2013; Verbrugghe y col. 2016). Por lo que la adquisición y mantenimiento de estos genes podría ser ventajoso para la respuesta adaptativa de *Salmonella* Typhimurium frente a un estrés por cobre que ponga en riesgo la homeostasis del metal en la envoltura bacteriana y, al mismo tiempo, garantice su persistencia tanto fuera como dentro del hospedador, favoreciendo su virulencia.

RESUMEN

RESUMEN

S. enterica subespecie *enterica* serovar Typhimurium es uno de los serovares no tifoideos más comúnmente aislados en el mundo y tiene la capacidad de persistir y proliferar en el medio ambiente desarrollando un estilo de vida cíclico hospedador-ambiente externo-hospedador. En estos hábitats *S. Typhimurium* encuentra metales de transición esenciales y/o tóxicos que pueden afectar su sobrevivencia cuando su concentración supera un umbral determinado. Este patógeno ha desarrollado sistemas que le permiten monitorear iones de cobre y modular la expresión de factores involucrados en la remoción de este metal para mantener su homeostasis y prevenir su toxicidad. El regulador transcripcional CueR detecta de manera específica los iones de Cu(I) en el citoplasma e induce la transcripción de *copA*, *cuiD* y *cueP*. Los productos de estos genes participan en forma directa y específica en la resistencia al metal. *Salmonella* dispone además de sistemas no específicos de respuesta a estrés celular que son importantes moduladores de la respuesta global a metales. En este trabajo de Tesis vinculamos al sistema de dos componentes de respuesta a estrés de envoltura CpxR/CpxA con la homeostasis de cobre en *Salmonella*. En el Capítulo I, dilucidamos el rol fisiológico de la regulación coordinada de *cueP* por parte de CueR y de CpxR/CpxA. Demostramos que la función de CueP frente al estrés por cobre en anaerobiosis depende de esta co-regulación, y que este control transcripcional estricto es necesario para permitir la expresión de CueP únicamente en las condiciones ambientales donde es requerida. Asimismo estudiamos en detalles los aspectos mecanísticos de esta regulación, demostrando que son requeridos tanto la forma metalada de CueR (CueR-Cu), como CpxR fosforilado (CpxR~P) para promover la formación de complejos activos y productivos para el inicio de la transcripción de *cueP*. En el Capítulo II identificamos a los genes del locus *scs*, específicos de este patógeno, como nuevos miembros del regulón Cpx, profundizando en el vínculo entre la respuesta Cpx y el equilibrio de los niveles de cobre que generan estrés en la envoltura de *Salmonella*. Demostramos que la inducción por cobre de estos genes depende de la activación por parte del sistema Cpx. La sobrevivencia y persistencia de *Salmonella* también puede ser afectada por un desbalance entre la producción de especies reactivas y la producción y/o acción de los antioxidantes. En este trabajo avanzamos en la caracterización de

sistemas extracitoplasmáticos que participan en la protección contra el daño oxidativo en la envoltura bacteriana.



REFERENCIAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriata, Luciano A., Lucas B. Pontel, Alejandro J. Vila, Matteo Dal Peraro, and Fernando C. Soncini. 2014. "A Dimerization Interface Mediated by Functionally Critical Residues Creates Interfacial Disulfide Bonds and Copper Sites in CueP." *Journal of Inorganic Biochemistry*. Vol. 140. doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.07.022.
- Achard, Maud E S, Kaiwen W Chen, Matthew J Sweet, Rebecca E Watts, Kate Schroder, Mark A Schembri, and Alastair G Mcewan. 2013. "An Antioxidant Role for Catecholate Siderophores in Salmonella." *Biochem. J* 454: 543–49. doi:10.1042/BJ20121771.
- Achard, Maud E S, Amanda J Hamilton, Tarek Dankowski, Begoña Heras, Mark S Schembri, Jennifer L Edwards, Michael P Jennings, and Alastair G McEwan. 2009. "A Periplasmic Thioredoxin-like Protein Plays a Role in Defense against Oxidative Stress in Neisseria Gonorrhoeae." *Infection and Immunity* 77 (11): 4934–39. doi:10.1128/IAI.00714-09.
- Achard, Maud E S, Jai J. Tree, James a. Holden, Kim R. Simpfendorfer, Odilia L C Wijburg, Richard a. Strugnell, Mark a. Schembri, Matthew J. Sweet, Michael P. Jennings, and Alastair G. McEwan. 2010. "The Multi-Copper-Ion Oxidase CueO of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Is Required for Systemic Virulence." *Infection and Immunity* 78 (5): 2312–19. doi:10.1128/IAI.01208-09.
- Acosta, Nicole, Stefan Pukatzki, and Tracy L. Raivio. 2015. "The Vibrio Cholerae Cpx Envelope Stress Response Senses and Mediates Adaptation to Low Iron." *Journal of Bacteriology* 197 (2): 262–76. doi:10.1128/JB.01957-14.
- Afema, Josephine A., Denis K. Byarugaba, Devendra H. Shah, Esther Atukwase, Maria Nambi, William M. Sicho, SE Majowicz, y col.2016. "Potential Sources and Transmission of Salmonella and Antimicrobial Resistance in Kampala, Uganda." Edited by Patrick Butaye. *PLOS ONE* 11 (3). Public Library of Science: e0152130. doi:10.1371/journal.pone.0152130.
- Ammendola, S, M Ajello, P Pasquali, JS Kroll, PR Langford, G Rotilio, P Valenti, and A. Battistoni. 2005. "Differential Contribution of sodC1 and sodC2 to Intracellular Survival and Pathogenicity of Salmonella Enterica Serovar Choleraesuis." *Microbes Infect.* 7 (4): 698–707.
- Andisi, Vahid Farshchi, Cecilia A Hinojosa, Anne de Jong, Oscar P Kuipers, Carlos J Orihuela, and Jetta J E Bijlsma. 2012. "Pneumococcal Gene Complex Involved in Resistance to Extracellular Oxidative Stress." *Infection and Immunity* 80 (3). American Society for Microbiology (ASM): 1037–49. doi:10.1128/IAI.05563-11.
- Ansari, Aseem Z., Mark L. Chael, and Thomas V. O'Halloran. 1992. "Allosteric Underwinding of DNA Is a Critical Step in Positive Control of Transcription by Hg-MerR." *Nature* 355 (6355): 87–89. doi:10.1038/355087a0.
- Anwar, Naeem, Xiao Hui Sem, Mikael Rhen, P Mastroeni, M Sheppard, ME Ohl, SI Miller, y col.2013. "Oxidoreductases That Act as Conditional Virulence Suppressors in Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." Edited by Dipshikha Chakravorty. *PLoS ONE* 8 (6). Public Library of Science: e64948. doi:10.1371/journal.pone.0064948.
- Arts, Isabelle S., Alexandra Gennaris, and Jean-François Collet. 2015. "Reducing Systems Protecting the Bacterial Cell Envelope from Oxidative Damage." *FEBS Letters* 589 (14): 1559–68. doi:10.1016/j.febslet.2015.04.057.
- Aussel, Laurent, Weidong Zhao, Magali Hébrard, Aude-Agnès Guilhon, Julie P. M. Viala, Sandrine Henri, Lionel Chasson, Jean-Pierre Gorvel, Frédéric Barras, and Stéphane Méresse. 2011. "Salmonella Detoxifying Enzymes Are Sufficient to Cope with the Host Oxidative Burst." *Molecular Microbiology* 80 (3): 628–40. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07611.x.
- Bader, M, W Muse, D P Ballou, C Gassner, and J C Bardwell. 1999. "Oxidative Protein Folding Is Driven by the Electron Transport System." *Cell* 98 (2): 217–27.
- Bannister, JV1, WH Bannister, and G. Rotilio. 1987. "Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase." *CRC Crit Rev Biochem.* 22 (2): 111–80.

- Bardwell, J C, K McGovern, and J Beckwith. 1991. "Identification of a Protein Required for Disulfide Bond Formation in Vivo." *Cell* 67 (3): 581–89.
- Barras, F., and M. Fontecave. 2011. "Cobalt Stress in Escherichia Coli and Salmonella Enterica: Molecular Bases for Toxicity and Resistance." *Metallomics* 3 (11): 1130. doi:10.1039/c1mt00099c.
- Batchelor, Eric, Don Walthers, Linda J Kenney, and Mark Goulian. 2005. "The Escherichia Coli CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC The Escherichia Coli CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC." *Journal of Bacteriology* 187 (16): 5723–31. doi:10.1128/JB.187.16.5723.
- Beaber, John W, Bianca Hochhut, and Matthew K Waldor. 2002. "Genomic and Functional Analyses of SXT , an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from Vibrio Cholerae Genomic and Functional Analyses of SXT , an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from Vibrio Choler." *Journal of Bacteriology* 184 (15): 4259–69. doi:10.1128/JB.184.15.4259.
- Becker, Kyle W, and Eric P. Skaar. 2015. "Metal Limitation and Toxicity at the Interface between Host and Pathogen" 38 (6): 1235–49. doi:10.1111/1574-6976.12087.Metal.
- Behnsen, Judith, and Manuela Raffatellu. 2016. "Siderophores: More than Stealing Iron." *mBio* 7 (6). American Society for Microbiology: e01906-16. doi:10.1128/MBIO.01906-16.
- Berkmen, M., D. Boyd, and J. Beckwith. 2005. "The Nonconsecutive Disulfide Bond of Escherichia Coli Phytase (AppA) Renders It Dependent on the Protein-Disulfide Isomerase, DsbC." *Journal of Biological Chemistry* 280 (12): 11387–94. doi:10.1074/jbc.M411774200.
- Besold, Angelique N., Edward M. Culbertson, and Valeria C. Culotta. 2016. "The Yin and Yang of Copper during Infection." *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 21 (2): 137–44. doi:10.1007/s00775-016-1335-1.
- Bjur, E., S. Eriksson-Ygberg, F. Aslund, and M. Rhen. 2006. "Thioredoxin 1 Promotes Intracellular Replication and Virulence of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Infection and Immunity* 74 (9): 5140–51. doi:10.1128/IAI.00449-06.
- Bondarczuk, Kinga, and Zofia Piotrowska-Seget. 2013. "Molecular Basis of Active Copper Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria." *Cell Biology and Toxicology* 29 (6): 397–405. doi:10.1007/s10565-013-9262-1.
- Bondo, Kristin J., David L. Pearl, Nicol Janecko, Patrick Boerlin, Richard J. Reid-Smith, Jane Parmley, Claire M. Jardine, y col.2016. "Impact of Season, Demographic and Environmental Factors on Salmonella Occurrence in Raccoons (Procyon Lotor) from Swine Farms and Conservation Areas in Southern Ontario." Edited by Patrick Butaye. *PLOS ONE* 11 (9). Public Library of Science: e0161497. doi:10.1371/journal.pone.0161497.
- Borkow, Gadi, and G Gabbay. 2006. "Using Copper Oxide in Medical Devices and Textiles to Fight Disease – Effective, Inexpensive and Feasible Gadi Borkow and Jeffrey Gabbay, Cupron Inc., POB 10973, Greensboro, NC 27404, USA," 137–42.
- Boschi-Muller, Sandrine, Adeline Gand, and Guy Branlant. 2008. "The Methionine Sulfoxide Reductases: Catalysis and Substrate Specificities." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474 (2): 266–73. doi:10.1016/j.abb.2008.02.007.
- Boulanger, Alice, Kyung Moon, Kimberly B Decker, Qing Chen, Leslie Knipling, Scott Stibitz, and Deborah M Hinton. 2015. "Bordetella Pertussis fim3 Gene Regulation by BvgA: Phosphorylation Controls the Formation of Inactive vs. Active Transcription Complexes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (6): E526-35. doi:10.1073/pnas.1421045112.
- Boyd, E. Fidelma, and Daniel L. Hartl. 1998. "Salmonella Virulence Plasmid: Modular Acquisition of the Spv Virulence Region by an F-Plasmid in Salmonella Enterica Subspecies I and Insertion Into the Chromosome of Subspecies II, IIIa, IV and VII Isolates." *Genetics* 149 (3).

- Boyd, E F, F S Wang, T S Whittam, and R K Selander. 1996. "Molecular Genetic Relationships of the Salmonellae." *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3). American Society for Microbiology (ASM): 804–8.
- Boyen, F., F. Haesebrouck, D. Maes, F. Van Immerseel, R. Ducatelle, and F. Pasmans. 2008. "Non-Typhoidal Salmonella Infections in Pigs: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis and Control." *Veterinary Microbiology* 130 (1–2): 1–19. doi:10.1016/j.vetmic.2007.12.017.
- Brenner, F W, R G Villar, F J Angulo, R Tauxe, and B Swaminathan. 2000. "Salmonella Nomenclature." *Journal of Clinical Microbiology* 38 (7): 2465–67.
- Brooks, Benjamin E., and Susan K. Buchanan. 2008. "Signaling Mechanisms for Activation of Extracytoplasmic Function (ECF) Sigma Factors." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (9): 1930–45. doi:10.1016/j.bbamem.2007.06.005.
- Brown, Nigel L, Jivko V Stoyanov, Stephen P Kidd, and Jon L Hobman. 2003. "The MerR Family of Transcriptional Regulators." *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2–3): 145–63.
- Broz, Petr, Maikke B. Ohlson, and Denise M. Monack. 2012. "Innate Immune Response to *Salmonella Typhimurium*, a Model Enteric Pathogen." *Gut Microbes* 3 (2): 62–70. doi:10.4161/gmic.19141.
- Brumell, John H, Patrick Tang, Michelle L Zaharik, and B Brett Finlay. 2002. "Disruption of the Salmonella-Containing Vacuole Leads to Increased Replication of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium in the Cytosol of Epithelial Cells." *Infection and Immunity* 70 (6). American Society for Microbiology (ASM): 3264–70. doi:10.1128/iai.70.6.3264-3270.2002.
- Buelow, Daelynn R., and Tracy L. Raivio. 2010. "Three (and More) Component Regulatory Systems - Auxiliary Regulators of Bacterial Histidine Kinases." *Molecular Microbiology* 75 (3): 547–66. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06982.x.
- Bullas, L. R.y, and J. I. Ryu. 1983. "Salmonella Typhimurium LT2 Strains Which Are R- M+ for All Three Chromosomally Located Systems of DNA Restriction and Modification." *J Bacteriol.* 156 (1): 471–74.
- Bury-Moné, Stéphanie, Yanoura Nomane, Nancie Reymond, Romain Barbet, Eric Jacquet, Sandrine Imbeaud, Annick Jacq, and Philippe Bouloc. 2009. "Global Analysis of Extracytoplasmic Stress Signaling in Escherichia Coli." *PLoS Genetics* 5 (9). doi:10.1371/journal.pgen.1000651.
- Campanacci, Valérie, Russell E Bishop, Stéphanie Blangy, Mariella Tegoni, and Christian Cambillau. 2006. "The Membrane Bound Bacterial Lipocalin B1c Is a Functional Dimer with Binding Preference for Lysophospholipids." *FEBS Letters* 580 (20). PMC Canada manuscript submission: 4877–83. doi:10.1016/j.febslet.2006.07.086.
- Cao, Jieni, Mark R. Woodhall, Javier Alvarez, Michaël L. Cartron, and Simon C. Andrews. 2007. "EfeUOB (YcdNOB) Is a Tripartite, Acid-Induced and CpxAR-Regulated, Low-pH Fe²⁺ Transporter That Is Cryptic in Escherichia Coli K-12 but Functional in E. Coli O157:H7." *Molecular Microbiology* 65 (4): 857–75. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05802.x.
- Casino, Patricia, Vicente Rubio, and Alberto Marina. 2010. "The Mechanism of Signal Transduction by Two-Component Systems." *Current Opinion in Structural Biology* 20 (6). Elsevier Ltd: 763–71. doi:10.1016/j.sbi.2010.09.010.
- Changela, Anita, Kui Chen, Yi Xue, Jackie Holschen, Caryn E Outten, Thomas V O'Halloran, and Alfonso Mondragón. 2003. "Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR." *Science (New York, N.Y.)* 301 (5638): 1383–87. doi:10.1126/science.1085950.
- Chatelle, Claire, Stéphanie Kraemer, Guoping Ren, Hannah Chmura, Nils Marechal, Dana Boyd, Caroline Roggemans, y col.2015. "Converting a Sulfenic Acid Reductase into a Disulfide Bond Isomerase." *Antioxidants y Redox Signaling* 23 (12). Mary Ann Liebert, Inc.: 945–57. doi:10.1089/ars.2014.6235.
- Chaturvedi, Kaveri S., and Jeffrey P. Henderson. 2014. "Pathogenic Adaptations to Host-Derived Antibacterial Copper." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (February): 1–12. doi:10.3389/fcimb.2014.00003.

- Checa, Susana K., Martín Espariz, María E. Pérez Audero, Pablo E. Botta, Silvana V. Spinelli, and Fernando C. Soncini. 2007. "Bacterial Sensing of and Resistance to Gold Salts." *Molecular Microbiology* 63 (5): 1307–18. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05590.x.
- Chen, P.-L., C.-M. Chang, C.-J. Wu, N.-Y. Ko, N.-Y. Lee, H.-C. Lee, H.-I. Shih, C.-C. Lee, R.-R. Wang, and W.-C. Ko. 2007. "Extraintestinal Focal Infections in Adults with Nontyphoid Salmonella Bacteraemia: Predisposing Factors and Clinical Outcome." *Journal of Internal Medicine* 261 (1). Blackwell Publishing Ltd: 91–100. doi:10.1111/j.1365-2796.2006.01748.x.
- Cherepanov, Peter P., and Wilfried Wackernagel. 1995. "Gene Disruption in Escherichia Coli: TcR and KmR Cassettes with the Option of Flp-Catalyzed Excision of the Antibiotic-Resistance Determinant." *Gene* 158 (1): 9–14. doi:10.1016/0378-1119(95)00193-A.
- Chillappagari, Shashi, Andreas Seubert, Hein Trip, Oscar P Kuipers, Mohamed A Marahiel, and Marcus Miethke. 2010. "Copper Stress Affects Iron Homeostasis by Destabilizing Iron-Sulfur Cluster Formation in Bacillus Subtilis." *Journal of Bacteriology* 192 (10). American Society for Microbiology: 2512–24. doi:10.1128/JB.00058-10.
- Cho, S.-H., D. Parsonage, C. Thurston, R. J. Dutton, L. B. Poole, J.-F. Collet, and J. Beckwith. 2012. "A New Family of Membrane Electron Transporters and Its Substrates, Including a New Cell Envelope Peroxiredoxin, Reveal a Broadened Reductive Capacity of the Oxidative Bacterial Cell Envelope." *mBio* 3 (2). American Society for Microbiology: e00291-11-e00291-11. doi:10.1128/mBio.00291-11.
- Cho, Seung-Hyun, and Jean-Francois Collet. 2013. "Many Roles of the Bacterial Envelope Reducing Pathways." *Antioxidants y Redox Signaling* 18 (13): 1690–98. doi:10.1089/ars.2012.4962.
- Coburn, Bryan, Guntram a Grassl, and B B Finlay. 2007. "Salmonella, the Host and Disease: A Brief Review." *Immunology and Cell Biology* 85 (2): 112–18. doi:10.1038/sj.icb.7100007.
- Danese, Paul N., and Thomas J. Silhavy. 1997. "The $\sigma(E)$ and the Cpx Signal Transduction Systems Control the Synthesis of Periplasmic Protein-Folding Enzymes in Escherichia Coli." *Genes and Development* 11 (9): 1183–93. doi:10.1101/gad.11.9.1183.
- Datsenko, K a, and B L Wanner. 2000. "One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in Escherichia Coli K-12 Using PCR Products." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12): 6640–45. doi:10.1073/pnas.120163297.
- Davies, Michael J. 2005. "The Oxidative Environment and Protein Damage." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1703 (2): 93–109. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.007.
- de Jong, Hanna K., Chris M. Parry, Tom van der Poll, and W. Joost Wiersinga. 2012. "Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis." Edited by Chetan E. Chitnis. *PLoS Pathogens* 8 (10). Public Library of Science: e1002933. doi:10.1371/journal.ppat.1002933.
- De Wulf, Peter, Ohsuk Kwon, and E. C C Lin. 1999. "The CpxRA Signal Transduction System of Escherichia Coli: Growth-Related Autoactivation and Control of Unanticipated Target Operons." *Journal of Bacteriology* 181 (21): 6772–78.
- De Wulf, Peter, and E. C C Lin. 2000. "Cpx Two-Component Signal Transduction in Escherichia Coli: Excessive CpxR-P Levels Underlie CpxA* Phenotypes." *Journal of Bacteriology* 182 (5): 1423–26. doi:10.1128/JB.182.5.1423-1426.2000.
- De Wulf, Peter, Abigail M. McGuire, Xueqiao Liu, and E. C C Lin. 2002. "Genome-Wide Profiling of Promoter Recognition by the Two-Component Response Regulator CpxR-P in Escherichia Coli." *Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26652–61. doi:10.1074/jbc.M203487200.
- Delhaye, Antoine, Jean-François Collet, and Géraldine Laloux. 2016. "Fine-Tuning of the Cpx Envelope Stress Response Is Required for Cell Wall Homeostasis in Escherichia Coli." *mBio* 7 (1). American Society for Microbiology: e00047-16. doi:10.1128/mBio.00047-16.
- Denoncin, Katleen, Didier Vertommen, Isabelle S Arts, Camille V Goemans, Sophie Rahuel-Clermont, Joris Messens, and Jean-François Collet. 2014. "A New Role for Escherichia Coli DsbC Protein in Protection against Oxidative Stress." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (18): 12356–64. doi:10.1074/jbc.M114.554055.

- Denoncin, Katleen, Didier Vertommen, Eunok Paek, and Jean-François Collet. 2010. "The Protein-Disulfide Isomerase DsbC Cooperates with SurA and DsbA in the Assembly of the Essential β -Barrel Protein LptD." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (38). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 29425–33. doi:10.1074/jbc.M110.119321.
- Depuydt, Matthieu, Stephen E. Leonard, Didier Vertommen, Katleen Denoncin, Pierre Morsomme, Khadija Wahni, Joris Messens, Kate S. Carroll, and Jean-François Collet. 2009. "A Periplasmic Reducing System Protects Single Cysteine Residues from Oxidation." *Science* 326 (2009): 1109–11. doi:10.1038/nmat2382.
- Desideri, a, and M Falconi. 2003. "Prokaryotic Cu,Zn Superoxide Dismutases." *Biochemical Society Transactions* 31 (Pt 6): 1322–25. doi:10.1042/.
- DiGiuseppe, Patricia a, and Thomas J Silhavy. 2003. "Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System." *J. Bacteriol.* 185 (8): 2432–40. doi:10.1128/JB.185.8.2432.
- Dong, J, S Iuchi, H S Kwan, Z Lu, and E C Lin. 1993. "The Deduced Amino-Acid Sequence of the Cloned cpxR Gene Suggests the Protein Is the Cognate Regulator for the Membrane Sensor, CpxA, in a Two-Component Signal Transduction System of Escherichia Coli." *Gene* 136 (1–2): 227–30.
- Dupont, CL, G Grass, and C. Rensing. 2011. "Copper Toxicity and the Origin of Bacterial Resistance--New Insights and Applications." *Metallomics*. 3 (11): 1109–18.
- Dutton, R. J., D. Boyd, M. Berkmen, and J. Beckwith. 2008. "Bacterial Species Exhibit Diversity in Their Mechanisms and Capacity for Protein Disulfide Bond Formation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (33): 11933–38. doi:10.1073/pnas.0804621105.
- El-Aziz, Doaa M Abd. 2013. "Detection of Salmonella Typhimurium in Retail Chicken Meat and Chicken Giblets." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3 (9). China Humanity Technology Publishing House: 678–81. doi:10.1016/S2221-1691(13)60138-0.
- Espariz, Martín, Susana K. Checa, María E Pérez Audero, Lucas B. Pontel, and Fernando C. Soncini. 2007. "Dissecting the Salmonella Response to Copper." *Microbiology* 153 (9): 2989–97. doi:10.1099/mic.0.2007/006536-0.
- Fang, F C, M a DeGroot, J W Foster, a J Bäuml, U Ochsner, T Testerman, S Bearson, y col.1999. "Virulent Salmonella Typhimurium Has Two Periplasmic Cu, Zn-Superoxide Dismutases." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (13): 7502–7. doi:10.1073/pnas.96.13.7502.
- Fang, Ferric C., Elaine R. Frawley, Timothy Tapscott, and Andrés Vázquez-Torres. 2016. "Discrimination and Integration of Stress Signals by Pathogenic Bacteria." *Cell Host y Microbe* 20 (2): 144–53. doi:10.1016/j.chom.2016.07.010.
- Fang, Ferric C. 2004. "Antimicrobial Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Concepts and Controversies." *Nature Reviews Microbiology* 2 (10): 820–32. doi:10.1038/nrmicro1004.
- Fiedler, U, and V Weiss. 1995. "A Common Switch in Activation of the Response Regulators NtrC and PhoB: Phosphorylation Induces Dimerization of the Receiver Modules." *The EMBO Journal* 14 (15). European Molecular Biology Organization: 3696–3705.
- Finiay, B. B., and S. Falkow. 1989. "Salmonella as an Intracellular Parasite." *Molecular Microbiology* 3 (12). Blackwell Publishing Ltd: 1833–41. doi:10.1111/j.1365-2958.1989.tb00170.x.
- Franke, Sylvia, Gregor Grass, Christopher Rensing, and Dietrich H Nies. 2003. "Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of Escherichia Coli Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of Escherichia Coli" 185 (13): 3804–12. doi:10.1128/JB.185.13.3804.
- Fu, Yue, Feng Ming James Chang, and David P. Giedroc. 2014. "Copper Transport and Trafficking at the Host-Bacterial Pathogen Interface." *Accounts of Chemical Research* 47 (12): 3605–13. doi:10.1021/ar500300n.
- Galas, D J, and a Schmitz. 1978. "DNase Footprinting: A Simple Method for the Detection of Protein-

- DNA Binding Specificity." *Nucleic Acids Research* 5 (9): 3157–70. doi:10.1093/nar/5.9.3157.
- Gao, Rong, and Ann M Stock. 2010. "Molecular Strategies for Phosphorylation-Mediated Regulation of Response Regulator Activity." *Current Opinion in Microbiology* 13 (2): 160–67. doi:10.1016/j.mib.2009.12.009.
- Garai, Preeti, Divya Prakash Gnanadhas, and Dipshikha Chakravorty. 2012. "Salmonella Enterica Serovars Typhimurium and Typhi as Model Organisms: Revealing Paradigm of Host-Pathogen Interactions." *Virulence* 3 (4): 377–88. doi:10.4161/viru.21087.
- Gebreyes, W A, C Altier, and S Thakur. 2006. "Molecular Epidemiology and Diversity of Salmonella Serovar Typhimurium in Pigs Using Phenotypic and Genotypic Approaches." *Epidemiology and Infection* 134 (1). Cambridge University Press: 187–98. doi:10.1017/S0950268805004723.
- Gee, Jason M, Michelle Wright Valderas, Michael E Kovach, Vanessa K Grippe, Gregory T Robertson, Wai-leung Ng, John M Richardson, Malcolm E Winkler, and Martin R Roop II. 2005. "The Brucella Abortus Cu, Zn Superoxide Dismutase Is Required for Optimal Resistance to Oxidative Killing by Murine Macrophages and Wild-Type Virulence in Experimentally Infected Mice." *Infection and Immunity* 73 (5): 2873–80. doi:10.1128/IAI.73.5.2873.
- Gennaris, Alexandra, Benjamin Ezraty, Camille Henry, Rym Agrebi, Alexandra Vergnes, Emmanuel Oheix, Julia Bos, y col.2015. "Repairing Oxidized Proteins in the Bacterial Envelope Using Respiratory Chain Electrons." *Nature* 528 (7582). Europe PMC Funders: 409–12. doi:10.1038/nature15764.
- Gong, Hao, Gia Phong Vu, Yong Bai, Edward Yang, Fenyong Liu, and Sangwei Lu. 2010. "Differential Expression of Salmonella Type III Secretion System Factors InvJ, PrgJ, SipC, SipD, SopA and SopB in Cultures and in Mice." *Microbiology* 156: 116–27. doi:10.1099/mic.0.032318-0.
- Gonzalez-Escobedo, Geoffrey, and John S. Gunn. 2013. "Gallbladder Epithelium as a Niche for Chronic Salmonella Carriage." *Infection and Immunity* 81 (8): 2920–30. doi:10.1128/IAI.00258-13.
- Grass, G, and C Rensing. 2001. "CueO Is a Multi-Copper Oxidase That Confers Copper Tolerance in Escherichia Coli." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286 (5): 902–8. doi:10.1006/bbrc.2001.5474.
- Grass, Gregor, Keshari Thakali, Phillip E Klebba, Daniel Thieme, Axel Müller, Günter F Wildner, and Christopher Rensing. 2004. "Linkage between Catecholate Siderophores and the Multicopper Oxidase CueO in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 186 (17): 5826–33. doi:10.1128/JB.186.17.5826-5833.2004.
- Guest, Randi L., and Tracy L. Raivio. 2016. "The Cpx Inner Membrane Stress Response." In *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, 1015–24. Hoboken, NJ, USA: John Wiley y Sons, Inc. doi:10.1002/9781119004813.ch99.
- Gupta, S. D., B. T O Lee, J. Camakaris, and H. C. Wu. 1995. "Identification of cutC and cutF (nlpE) Genes Involved in Copper Tolerance in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 177 (15): 4207–15.
- Gupta, S D, H C Wu, and P D Rick. 1997. "A Salmonella Typhimurium Genetic Locus Which Confers Copper Tolerance on Copper-Sensitive Mutants of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 179 (16): 4977–84.
- Hebrard, M., J. P. M. Viala, S. Meresse, F. Barras, and L. AusSEL. 2009. "Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to Salmonella Virulence and Oxidative Stress Resistance." *Journal of Bacteriology* 191 (14). American Society for Microbiology: 4605–14. doi:10.1128/JB.00144-09.
- Hébrard, Magali, Julie P M Viala, Stéphane Méresse, Frédéric Barras, and Laurent AusSEL. 2009. "Redundant Hydrogen Peroxide Scavengers Contribute to Salmonella Virulence and Oxidative Stress Resistance." *Journal of Bacteriology*. doi:10.1128/JB.00144-09.
- Heldwein, Ekaterina E. Zheleznova, and Richard G. Brennan. 2001. "Crystal Structure of the Transcription Activator BmrR Bound to DNA and a Drug." *Nature* 409 (6818): 378–82. doi:10.1038/35053138.
- Hensel, M, J E Shea, S R Waterman, R Mundy, T Nikolaus, G Banks, A Vazquez-Torres, C Gleeson, F C

- Fang, and D W Holden. 1998. "Genes Encoding Putative Effector Proteins of the Type III Secretion System of Salmonella Pathogenicity Island 2 Are Required for Bacterial Virulence and Proliferation in Macrophages." *Molecular Microbiology* 30 (1): 163–74.
- Heras, B., M. A. Edeling, H. J. Schirra, S. Raina, and J. L. Martin. 2004. "Crystal Structures of the DsbG Disulfide Isomerase Reveal an Unstable Disulfide." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (24): 8876–81. doi:10.1073/pnas.0402769101.
- Hiniker, A., and J. C. A. Bardwell. 2004. "In Vivo Substrate Specificity of Periplasmic Disulfide Oxidoreductases." *Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 12967–73. doi:10.1074/jbc.M311391200.
- Hiniker, Annie, Jean Francois Collet, and James C a Bardwell. 2005. "Copper Stress Causes an in Vivo Requirement for the Escherichia Coli Disulfide Isomerase DsbC." *Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 33785–91. doi:10.1074/jbc.M505742200.
- Hirakawa, Hidetada, Yoshihiko Inazumi, Takeshi Masaki, Takahiro Hirata, and Akihito Yamaguchi. 2005. "Indole Induces the Expression of Multidrug Exporter Genes in Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 55 (4): 1113–26. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04449.x.
- Hirano, Yu, Md Motarab Hossain, Kazuki Takeda, Hajime Tokuda, and Kunio Miki. 2007. "Structural Studies of the Cpx Pathway Activator NlpE on the Outer Membrane of Escherichia Coli." *Structure* 15 (8): 963–76. doi:10.1016/j.str.2007.06.014.
- Hobman, Jon L., Kaneyoshi Yamamoto, and Taku Oshima. 2007. "Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress." In *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, 73–115. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/7171_2006_074.
- Hoch, J a. 2000. "Two-Component and Phosphorelay Signal Transduction." *Current Opinion in Microbiology* 3 (2): 165–70.
- Hoch, James A, and K I Varughese. 2001. "Keeping Signals Straight in Phosphorelay Signal Transduction." *Journal of Bacteriology* 183 (17): 4941–49. doi:10.1128/JB.183.17.4941.
- Hood, M Indriati, and Eric P Skaar. 2012. "Nutritional Immunity: Transition Metals at the Pathogen-Host Interface." *Nature Reviews. Microbiology* 10 (8). NIH Public Access: 525–37. doi:10.1038/nrmicro2836.
- Horst, Sarah A, Timo Jaeger, Luisa A Denk, Syed Fazle Rouf, Mikael Rhen, and Franz-Christoph Bange. 2010. "Thiol Peroxidase Protects Salmonella Enterica from Hydrogen Peroxide Stress in Vitro and Facilitates Intracellular Growth." *Journal of Bacteriology* 192 (11): 2929–32. doi:10.1128/JB.01652-09.
- Humbert, M. V., R. M. Rasia, S. K. Checa, and F. C. Soncini. 2013. "Protein Signatures That Promote Operator Selectivity among Paralog MerR Monovalent Metal Ion Regulators." *Journal of Biological Chemistry* 288 (28): 20510–19. doi:10.1074/jbc.M113.452797.
- Humphreys, Sue, Gary Rowley, Andrew Stevenson, F Muna, Martin J Woodward, Stephen Gilbert, Mark Roberts, Muna F Anjum, and Jan Kormanec. 2004. "Role of the Two-Component Regulator CpxAR in the Virulence of Salmonella Enterica Serotype Typhimurium Role of the Two-Component Regulator CpxAR in the Virulence of Salmonella Enterica Serotype Typhimurium." *Infection and Immunity* 72 (8): 4654–4661. doi:10.1128/IAI.72.8.4654.
- Ibáñez, María M, Susana K Checa, and Fernando C Soncini. 2015. "A Single Serine Residue Determines Selectivity to Monovalent Metal Ions in Metalloregulators of the MerR Family." *Journal of Bacteriology* 197 (9). American Society for Microbiology (ASM): 1606–13. doi:10.1128/JB.02565-14.
- Imlay, JA, SM Chin, and S Linn. 1988. "Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide through the Fenton Reaction in Vivo and in Vitro." *Science* 240 (4852): 640–42.
- Inaba, Kenji, and Koreaki Ito. 2008. "Structure and Mechanisms of the DsbB–DsbA Disulfide Bond Generation Machine." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783 (4): 520–29. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.11.006.

- Isaac, Daniel D, Jerome S Pinkner, Scott J Hultgren, and Thomas J Silhavy. 2005. "The Extracytoplasmic Adaptor Protein CpxP Is Degraded with Substrate by DegP." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (49): 17775–79. doi:10.1073/pnas.0508936102.
- Ito, Koreaki, and Kenji Inaba. 2008. "The Disulfide Bond Formation (Dsb) System." *Current Opinion in Structural Biology* 18 (4): 450–58. doi:10.1016/j.sbi.2008.02.002.
- Jain, Sudeep, and Jinru Chen. 2007. "Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of Salmonella as Influenced by Cellulose Production and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis." *Journal of Food Protection* 70 (11): 2473–79.
- Jang, S., and J. a. Imlay. 2007. "Micromolar Intracellular Hydrogen Peroxide Disrupts Metabolism by Damaging Iron-Sulfur Enzymes." *Journal of Biological Chemistry* 282 (2): 929–37. doi:10.1074/jbc.M607646200.
- Jones, C H, P N Danese, J S Pinkner, T J Silhavy, S J Hultgren, E. Bullitt, CH. Jones, y col.1997. "The Chaperone-Assisted Membrane Release and Folding Pathway Is Sensed by Two Signal Transduction Systems." *The EMBO Journal* 16 (21). EMBO Press: 6394–6406. doi:10.1093/emboj/16.21.6394.
- Kadokura, H., Hongping Tian, Thomas Zander, James C A Bardwell, and Jon Beckwith. 2004. "Snapshots of DsbA in Action: Detection of Proteins in the Process of Oxidative Folding." *Science* 303 (5657): 534–37. doi:10.1126/science.1091724.
- Kammann, M, J Laufs, J Schell, and B Gronenborn. 1989. "Rapid Insertional Mutagenesis of DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR)." *Nucleic Acids Research* 17 (13): 5404. doi:10.1016/j.biochi.2011.05.022.
- Katzen, F, and J Beckwith. 2000. "Transmembrane Electron Transfer by the Membrane Protein DsbD Occurs via a Disulfide Bond Cascade." *Cell* 103 (5): 769–79.
- Keseler, I. M., a. Mackie, M. Peralta-Gil, a. Santos-Zavaleta, S. Gama-Castro, C. Bonavides-Martinez, C. Fulcher, y col.2013. "EcoCyc: Fusing Model Organism Databases with Systems Biology." *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D605–12. doi:10.1093/nar/gks1027.
- Kiaune, Lina, and Nan Singhasemanon. 2011. "Pesticidal Copper (I) Oxide: Environmental Fate and Aquatic Toxicity." *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213: 1–26. doi:10.1007/978-1-4419-9860-6_1.
- Kim, Jin Sook, Mi Hwa Kim, Min Ho Joe, Sang Sun Song, In Soo Lee, and Soon-Yong Choi. 2002. "The sctR of Salmonella Enterica Serova Typhimurium Encoding a Homologue of MerR Protein Is Involved in the Copper-Responsive Regulation of cuiD." *FEMS Microbiology Letters* 210 (1): 99–103.
- Klein, Adam H., Ana Shulla, Sylvia A. Reimann, David H. Keating, and Alan J. Wolfe. 2007. "The Intracellular Concentration of Acetyl Phosphate in Escherichia Coli Is Sufficient for Direct Phosphorylation of Two-Component Response Regulators." *Journal of Bacteriology* 189 (15): 5574–81. doi:10.1128/JB.00564-07.
- Korshunov, Sergei, and James a. Imlay. 2006. "Detection and Quantification of Superoxide Formed within the Periplasm of Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 188 (17): 6326–34. doi:10.1128/JB.00554-06.
- Krell, Tino, Jesús Lacal, Andreas Busch, Hortencia Silva-Jiménez, María-Eugenia Guazzaroni, and Juan Luis Ramos. 2010. "Bacterial Sensor Kinases: Diversity in the Recognition of Environmental Signals." *Annual Review of Microbiology* 64 (January): 539–59. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134054.
- Kroger, C., S. C. Dillon, a. D. S. Cameron, K. Papenfort, S. K. Sivasankaran, K. Hokamp, Y. Chao, y col.2012. "PNAS Plus: The Transcriptional Landscape and Small RNAs of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (20): E1277–86. doi:10.1073/pnas.1201061109.
- Lane, D, P Prentki, and M Chandler. 1992. "Use of Gel Retardation to Analyze Protein-Nucleic Acid

- Interactions." *Microbiological Reviews* 56 (4): 509–28.
- Lee, K., T. Iwata, M. Shimizu, T. Taniguchi, A. Nakadai, Y. Hirota, and H. Hayashidani. 2009. "A Novel Multiplex PCR Assay for *Salmonella* Subspecies Identification." *Journal of Applied Microbiology* 107 (3). Blackwell Publishing Ltd: 805–11. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04263.x.
- Lee, Lucy J, Jason a Barrett, and Robert K Poole. 2005. "Genome-Wide Transcriptional Response of Chemostat-Cultured" 187 (3): 1124–34. doi:10.1128/JB.187.3.1124.
- Lee, W. S., S. D. Puthuchery, and N. Parasakthi. 2000. "Extra-Intestinal Non-Typhoidal *Salmonella* Infections in Children." *Annals of Tropical Paediatrics* 20 (2). Taylor y Francis: 125–29. doi:10.1080/02724936.2000.11748121.
- Leichert, Lars I, Ursula Jakob, F Aslund, M Zheng, J Beckwith, G Storz, LM Baker, y col.2004. "Protein Thiol Modifications Visualized In Vivo." Edited by Joan Valentine. *PLoS Biology* 2 (11). Public Library of Science: e333. doi:10.1371/journal.pbio.0020333.
- Lejona, Sergio, María Eugenia Castelli, María Laura Cabeza, Linda J Kenney, Eleonora García Véscovi, and Fernando C Soncini. 2004. "PhoP Can Activate Its Target Genes in a PhoQ-Independent Manner." *Journal of Bacteriology* 186 (8). American Society for Microbiology: 2476–80. doi:10.1128/JB.186.8.2476-2480.2004.
- Leoni, Livia, Paolo Ascenzi, Alessio Bocedi, Giordano Rampioni, Laura Castellini, and Elisabetta Zennaro. 2003. "Styrene-Catabolism Regulation in *Pseudomonas Fluorescens* ST: Phosphorylation of StyR Induces Dimerization and Cooperative DNA-Binding." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 303 (3): 926–31.
- Leverrier, Pauline, Jean-Paul Declercq, Katleen Denoncin, Didier Vertommen, Annie Hiniker, Seung-Hyun Cho, and Jean-François Collet. 2011. "Crystal Structure of the Outer Membrane Protein RcsF, a New Substrate for the Periplasmic Protein-Disulfide Isomerase DsbC." *Journal of Biological Chemistry* 286 (19): 16734–42. doi:10.1074/jbc.M111.224865.
- Lim, Sung-Young, Min-Ho Joe, Sang-Sun Song, Mun-Hee Lee, John W Foster, Yong-Keun Park, Soon-Yong Choi, and In-Soo Lee. 2002. "CuiD Is a Crucial Gene for Survival at High Copper Environment in *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium." *Molecules and Cells* 14 (2): 177–84.
- Lima, Bruno P., Haike Antelmann, Katrin Gronau, Bui Khanh Chi, Dörte Becher, Shaun R. Brinsmade, and Alan J. Wolfe. 2011. "Involvement of Protein Acetylation in Glucose-Induced Transcription of a Stress-Responsive Promoter." *Mol Microbiol* 81 (5).
- Lima, Bruno P., Christopher W. Lennon, Wilma Ross, Richard L. Gourse, and Alan J. Wolfe. 2016. "In Vitro Evidence That RNA Polymerase Acetylation and Acetyl Phosphate-Dependent CpxR Phosphorylation Affect CpxP Transcription Regulation." *FEMS Microbiology Letters* 363 (5): 1–7. doi:10.1093/femsle/fnw011.
- Lin, Zhidong, Lynnette C Johnson, Herbert Weissbach, Nathan Brot, Mark O Lively, and W Todd Lowther. 2007. "Free Methionine-(R)-Sulfoxide Reductase from *Escherichia Coli* Reveals a New GAF Domain Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (23). National Academy of Sciences: 9597–9602. doi:10.1073/pnas.0703774104.
- Los, Apel D E, Esiduos De, N a E N La, and D E Las. 2003. "E P R c E F P." *Lares*, no. 1: 2–10.
- Lund, P a, S J Ford, and N L Brown. 1986. "Transcriptional Regulation of the Mercury-Resistance Genes of Transposon Tn501." *Journal of General Microbiology* 132 (2): 465–80. doi:10.1099/00221287-132-2-465.
- MacKenzie, Keith D., Yejun Wang, Dylan J. Shivak, Cynthia S. Wong, Leia J. L. Hoffman, Shirley Lam, Carsten Kröger, y col.2015. "Bistable Expression of CsgD in *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium Connects Virulence to Persistence." Edited by A. J. Bämler. *Infection and Immunity* 83 (6): 2312–26. doi:10.1128/IAI.00137-15.
- Macomber, Lee, and James a Imlay. 2009. "The Iron-Sulfur Clusters of Dehydratases Are Primary Intracellular Targets of Copper Toxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20): 8344–49. doi:10.1073/pnas.0812808106.

- Macomber, Lee, Christopher Rensing, and James a. Imlay. 2007. "Intracellular Copper Does Not Catalyze the Formation of Oxidative DNA Damage in Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 189 (5): 1616–26. doi:10.1128/JB.01357-06.
- Magnani, David, and Marc Solioz. 2007. "How Bacteria Handle Copper." In *Molecular Microbiology of Heavy Metals*, edited by D. H. Nies y S. Silver (Eds.), 260–85. Heidelberg, Springer. doi:10.1007/7171.
- Manon, Rosselin, Abed Nadia, Virlogeux-payant Isabelle, and Velge Philippe. 2008. *The Different Strategies Used by Salmonella to Invade Host Cells*. doi:10.5772/29979.
- Martell, Danya J., Chandra P. Joshi, Ahmed Gaballa, Ace George Santiago, Tai-Yen Chen, Won Jung, John D. Helmann, and Peng Chen. 2015. "Metalloregulator CueR Biases RNA Polymerase's Kinetic Sampling of Dead-End or Open Complex to Repress or Activate Transcription." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201515231. doi:10.1073/pnas.1515231112.
- Mascher, Thorsten, John D Helmann, and Gottfried Uden. 2006. "Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR 70 (4): 910–38. doi:10.1128/MMBR.00020-06.
- Mastroeni, Pietro, Sanja Ugrinovic, Anita Chandra, Calman MacLennan, Rainer Doffinger, and Dinakantha Kumararatne. 2003. "Resistance and Susceptibility to Salmonella Infections." *Reviews in Medical Microbiology* 14 (2): 53–62. doi:10.1097/00013542-200304000-00002.
- McCarthy, A A, P W Haebel, A Törrönen, V Rybin, E N Baker, and P Metcalf. 2000. "Crystal Structure of the Protein Disulfide Bond Isomerase, DsbC, from Escherichia Coli." *Nature Structural Biology* 7 (3): 196–99. doi:10.1038/73295.
- Medardus, Julius J., Bayleyegn Z. Molla, Matthew Nicol, W. Morgan Morrow, Paivi J. Rajala-Schultz, Rudovick Kazwala, and Wondwossen A. Gebreyes. 2014. "In-Feed Use of Heavy Metal Micronutrients in U.S. Swine Production Systems and Its Role in Persistence of Multidrug-Resistant Salmonellae." *Applied and Environmental Microbiology* 80 (7): 2317–25. doi:10.1128/AEM.04283-13.
- Metcalf, Peter, Andrew A. McCarthy, Peter W. Haebel, Anneli Törrönen, Vladimir Rybin, and Edward N. Baker. 2000. "Crystal Structure of the Protein Disulfide Bond Isomerase, DsbC, from Escherichia Coli." *Nature Structural Biology* 7 (3): 196–99. doi:10.1038/73295.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor.
- Mishra, Surabhi, and James Imlay. 2012. "Why Do Bacteria Use so Many Enzymes to Scavenge Hydrogen Peroxide?" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525 (2): 145–60. doi:10.1016/j.abb.2012.04.014.
- Missiakas, Dominique, Costa Georgopoulos, and Satish Raina. 1993. "Identification and Characterization of the Escherichia Coli Gene dsbB, Whose Product Is Involved in the Formation of Disulfide Bonds in Vivo." *Genetics* 90: 7084–88.
- Mitrophanov, Alexander Y Ay, and Ea Eduardo a Groisman. 2008. "Signal Integration in Bacterial Two-Component Regulatory Systems." *Genes y Development* 22 (19): 2601–11. doi:10.1101/gad.1700308.response.
- Nakamoto, Hitoshi, and James C.A. Bardwell. 2004. "Catalysis of Disulfide Bond Formation and Isomerization in the Escherichia Coli Periplasm." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1694 (1): 111–19. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.02.012.
- Nelson, Jeffrey W., and Thomas E. Creighton. 1994. "Reactivity and Ionization of the Active Site Cysteine Residues of DsbA, a Protein Required for Disulfide Bond Formation in Vivo." *Biochemistry* 33 (19). American Chemical Society: 5974–83. doi:10.1021/bi00185a039.
- Newberry, Kate J., and Richard G. Brennan. 2004. "The Structural Mechanism for Transcription Activation by MerR Family Member Multidrug Transporter Activation, N Terminus." *Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 20356–62. doi:10.1074/jbc.M400960200.
- Nies, D. 2007. "Bacterial Transition Metal Homeostasis." In *Molecular Microbiology of Heavy Metals*,

- edited by D. Nies y S. Silver (Eds.). Heidelberg, Springer.
- Nies, Dietrich H. 2016. "The Biological Chemistry of the Transition Metal 'transportome' of *Cupriavidus Metallidurans*." *Metallomics* 8 (5). Royal Society of Chemistry: 481–507. doi:10.1039/C5MT00320B.
- Nigel J. Robinson, 1 and Dennis R. Winge. 2010. "Copper Metallochaperones." *Annual Review of Biochemistry* 79: 537–62.
- Nordberg, J, and E S Arnér. 2001. "Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System." *Free Radical Biology y Medicine* 31 (11): 1287–1312.
- O'Halloran, T, and C Walsh. 1987. "Metalloregulatory DNA-Binding Protein Encoded by the merR Gene: Isolation and Characterization." *Science* 235 (4785): 211–14.
- Ochman, H, F C Soncini, F Solomon, and E A Groisman. 1996. "Identification of a Pathogenicity Island Required for *Salmonella* Survival in Host Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (15). National Academy of Sciences: 7800–7804.
- Osman, Deenah, and Jennifer S. Cavet. 2008. "Copper Homeostasis in Bacteria." In *Advances in Applied Microbiology*, 217–47. Elsevier Inc.
- Osman, Deenah, Carl J. Patterson, Kathryn Bailey, Karl Fisher, Nigel J. Robinson, Stephen E. J. Rigby, and Jennifer S. Cavet. 2013. "The Copper Supply Pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-Superoxide Dismutase (SodCII) Involves P1B-Type ATPase Copper Efflux and Periplasmic CueP." *Molecular Microbiology* 87 (3): 466–77.
- Osman, Deenah, Kevin J. Waldron, Harriet Denton, Clare M. Taylor, Andrew J. Grant, Pietro Mastroeni, Nigel J. Robinson, and Jennifer S. Cavet. 2010. "Copper Homeostasis in *Salmonella* Is Atypical and Copper-CueP Is a Major Periplasmic Metal Complex." *Journal of Biological Chemistry* 285 (33): 25259–68. doi:10.1074/jbc.M110.145953.
- Otto, Karen, and Thomas J Silhavy. 2002. "Surface Sensing and Adhesion of *Escherichia Coli* Controlled by the Cpx-Signaling Pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (4): 2287–92. doi:10.1073/pnas.042521699.
- Outten, Caryn E., F. Wayne Outten, and Thomas V. O'Halloran. 1999. "DNA Distortion Mechanism for Transcriptional Activation by ZntR, a Zn(II)-Responsive MerR Homologue in *Escherichia Coli*." *Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 37517–24. doi:10.1074/jbc.274.53.37517.
- Outten, F. Wayne, David L. Huffman, Jeremy a. Hale, and Thomas V. O'Halloran. 2001. "The Independent Cue and Cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia Coli*." *Journal of Biological Chemistry* 276 (33): 30670–77. doi:10.1074/jbc.M104122200.
- Padilla-Benavides, Teresita, Alayna M. George Thompson, Megan M. McEvoy, and José M. Argüello. 2014. "Mechanism of ATPase-Mediated Cu⁺ Export and Delivery to Periplasmic Chaperones." *Journal of Biological Chemistry* 289 (30): 20492–501. doi:10.1074/jbc.M114.577668.
- Palmer, Lauren D., and Eric P. Skaar. 2016. "Transition Metals and Virulence in Bacteria." *Annual Review of Genetics* 50 (1): annurev-genet-120215-035146. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035146.
- Pasmans, Frank, An Martel, Filip Boyen, Dominique Vandekerchove, Ingrid Wybo, Filip Van Immerseel, Marc Heyndrickx, Jean Marc Collard, Richard Ducatelle, and Freddy Haesebrouck. 2005. "Characterization of *Salmonella* Isolates from Captive Lizards." *Veterinary Microbiology* 110 (3–4): 285–91. doi:10.1016/j.vetmic.2005.07.008.
- Perego, M, and J a Hoch. 1996. "Protein Aspartate Phosphatases Control the Output of Two-Component Signal Transduction Systems." *Trends in Genetics* : TIG 12 (3): 97–101.
- Pezza, A. 2016. "Rol de la proteína periplásmica CueP en la homeostasis de cobre en *Salmonella*. Tesis Doctoral, Fac Cs B y F UNR.
- Pezza, Alejandro, Lucas B. Pontel, Carolina López, and Fernando C. Soncini. 2016. "Compartment and Signal-Specific Codependence in the Transcriptional Control of *Salmonella* Periplasmic Copper

- Homeostasis." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201603192. doi:10.1073/pnas.1603192113.
- Philips, S. J., M. Canalizo-Hernandez, I. Yildirim, G. C. Schatz, a. Mondragon, and T. V. O'Halloran. 2015. "Allosteric Transcriptional Regulation via Changes in the Overall Topology of the Core Promoter." *Science* 349 (6250): 877–81. doi:10.1126/science.aaa9809.
- Piddington, Debra L, Ferric C Fang, Tracey Laessig, M Cooper, Ian M Orme, Nancy a Buchmeier, and Andrea M Cooper. 2001. "Cu , Zn Superoxide Dismutase of Mycobacterium Tuberculosis Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst Cu , Zn Superoxide Dismutase of Mycobacterium Tuberculosis Contributes to Survival in Activated Macrophages." *Infection and Immunity* 69 (8): 4980–87. doi:10.1128/IAI.69.8.4980.
- Pogliano, J, a S Lynch, D Belin, E C Lin, and J Beckwith. 1997. "Regulation of Escherichia Coli Cell Envelope Proteins Involved in Protein Folding and Degradation by the Cpx Two-Component System." *Genes y Development* 11 (9): 1169–82. doi:10.1101/gad.11.9.1169.
- Poh, John, Charlotte Odendall, Ad Spanos, Cliona Boyle, Mei Liu, Paul Freemont, and David W Holden. 2008. "SteC Is a Salmonella Kinase Required for SPI-2-Dependent F-Actin Remodelling." *Cellular Microbiology* 10 (1): 20–30. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01010.x.
- Pontel, Lucas B., Susana K. Checa, and Fernando C. Soncini. 2015. "Bacterial Copper Resistance and Virulence." In *Bacteria-Metal Interactions*, 1–19. Springer International Publishing.
- Pontel, Lucas B., Nadia L. Scampoli, Steffen Porwollik, Susana K. Checa, Michael McClelland, and Fernando C. Soncini. 2014. "Identification of a Salmonella Ancillary Copper Detoxification Mechanism by a Comparative Analysis of the Genome-Wide Transcriptional Response to Copper and Zinc Excess." *Microbiology (United Kingdom)* 160 (PART 8): 1659–69. doi:10.1099/mic.0.080473-0.
- Pontel, Lucas B., and Fernando C. Soncini. 2009. "Alternative Periplasmic Copper-Resistance Mechanisms in Gram Negative Bacteria." *Molecular Microbiology* 73 (2): 212–25. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06763.
- Pontel, Lucas B. 2009. "Caracterización de factores específicos de resistencia a metales de transición en *Salmonella enterica*". Tesis Doctoral, Fac Cs B y F UNR.
- Porcheron, Gaëlle, Amélie Garénaux, Julie Proulx, Mourad Sabri, and Charles M Dozois. 2013. "Iron, Copper, Zinc, and Manganese Transport and Regulation in Pathogenic Enterobacteria: Correlations between Strains, Site of Infection and the Relative Importance of the Different Metal Transport Systems for Virulence." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3 (December): 90. doi:10.3389/fcimb.2013.00090.
- Price, N. L., and T. L. Raivio. 2009. "Characterization of the Cpx Regulon in Escherichia Coli Strain MC4100." *Journal of Bacteriology* 191 (6): 1798–1815. doi:10.1128/JB.00798-08.
- Price, Nancy L., and Tracy L. Raivio. 2009. "Characterization of the Cpx Regulon in Escherichia Coli Strain MC4100." *Journal of Bacteriology* 191 (6): 1798–1815. doi:10.1128/JB.00798-08.
- Raivio, Tracy L. 2014. "Everything Old Is New Again: An Update on Current Research on the Cpx Envelope Stress Response." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (8): 1529–41.
- Raivio, Tracy L., Daniel L. Popkin, and Thomas J. Silhavy. 1999. "The Cpx Envelope Stress Response Is Controlled by Amplification and Feedback Inhibition." *Journal of Bacteriology* 181 (17): 5263–72.
- Raivio, Tracy L., and Thomas J. Silhavy. 1997. "Transduction of Envelope Stress in Escherichia Coli by the Cpx Two- Component System." *Journal of Bacteriology* 179 (24): 7724–33.
- Ren, Guoping, Matthew M Champion, and Jason F Huntley. 2014. "Identification of Disulfide Bond Isomerase Substrates Reveals Bacterial Virulence Factors." *Molecular Microbiology* 94 (4): 926–44. doi:10.1111/mmi.12808.
- Rensing, C, B Fan, R Sharma, B Mitra, and B P Rosen. 2000. "CopA: An Escherichia Coli Cu(I)-Translocating P-Type ATPase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America* 97 (2): 652–56. doi:10.1073/pnas.97.2.652.
- Rensing, Christopher, and Gregor Grass. 2003. "Escherichia Coli Mechanisms of Copper Homeostasis in a Changing Environment." *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2–3): 197–213. doi:10.1016/S0168-6445(03)00049-4.
- Rensing, Christopher, Bharati Mitra, and Barry P Rosen. 1997. "Insertional Inactivation of dsbA Produces Sensitivity to Cadmium and Zinc in Escherichia Coli." *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 179 (8): 2769–71.
- Rietsch, A, D Belin, N Martin, and J Beckwith. 1996. "An in Vivo Pathway for Disulfide Bond Isomerization in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23). National Academy of Sciences: 13048–53.
- Roberts, Sue a, Andrzej Weichsel, Gregor Grass, Keshari Thakali, James T Hazzard, Gordon Tollin, Christopher Rensing, and William R Montfort. 2002. "Crystal Structure and Electron Transfer Kinetics of CueO, a Multicopper Oxidase Required for Copper Homeostasis in Escherichia Coli." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (5): 2766–71. doi:10.1073/pnas.052710499.
- Robinson, V L, D R Buckler, and a M Stock. 2000. "A Tale of Two Components: A Novel Kinase and a Regulatory Switch." *Nature Structural Biology* 7 (8): 626–33. doi:10.1038/77915.
- Roche, Béatrice, Laurent Aussel, Benjamin Ezraty, Pierre Mandin, Béatrice Py, and Frédéric Barras. 2013. "Iron/sulfur Proteins Biogenesis in Prokaryotes: Formation, Regulation and Diversity." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827 (3): 455–69. doi:10.1016/j.bbabi.2012.12.010.
- Römling, U. 2005. "Characterization of the Rdar Morphotype, a Multicellular Behaviour in Enterobacteriaceae." *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (11). Birkhäuser-Verlag: 1234–46. doi:10.1007/s00018-005-4557-x.
- Ross, Wilma, and Richard L Gourse. 2009. "Analysis of RNA Polymerase-Promoter Complex Formation." *Methods (San Diego, Calif.)* 47 (1). NIH Public Access: 13–24. doi:10.1016/j.jymeth.2008.10.018.
- Rowley, Gary, Michael Spector, Jan y Kormanec, and Mark Roberts. 2006. "Pushing the Envelope: Extracytoplasmic Stress Responses in Bacterial Pathogens." *Nature Reviews Microbiology* 4: 383–94.
- Ruiz-Albert, Javier, Xiu-Jun Yu, Carmen R Beuzón, Abigail N Blakey, Edouard E Galyov, and David W Holden. 2002. "Complementary Activities of SseJ and SifA Regulate Dynamics of the Salmonella Typhimurium Vacuolar Membrane." *Molecular Microbiology* 44 (3): 645–61.
- Ruiz, Natividad, Shu-Sin Chng, Annie Hiniker, Daniel Kahne, and Thomas J Silhavy. 2010. "Nonconsecutive Disulfide Bond Formation in an Essential Integral Outer Membrane Protein." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (27). National Academy of Sciences: 12245–50. doi:10.1073/pnas.1007319107.
- Sakurai, T, and K. Kataoka. 2007. "Basic and Applied Features of Multicopper Oxidases, CueO, BilirubinOxidase, and Laccase." *Chem Rec* 7 (4): 220–29.
- Saleh, Malek, Sergio G Bartual, Mohammed R Abdullah, Inga Jensch, Tauseef M Asmat, Lothar Petruschka, Thomas Pribyl, y col.2013. "Molecular Architecture of Streptococcus Pneumoniae Surface Thioredoxin-Fold Lipoproteins Crucial for Extracellular Oxidative Stress Resistance and Maintenance of Virulence." *EMBO Molecular Medicine* 5 (12). EMBO Press: 1852–70. doi:10.1002/emmm.201202435.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, no. Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sem, XiaoHui, Mikael Rhen, A Schikora, I Virlogeux-Payant, E Bueso, AV Garcia, T Nilau, y col.2012. "Pathogenicity of Salmonella Enterica in Caenorhabditis Elegans Relies on Disseminated Oxidative Stress in the Infected Host." Edited by Dipshikha Chakravorty. *PLoS ONE* 7 (9). Public Library of Science: e45417. doi:10.1371/journal.pone.0045417.

- Shepherd, Mark, Begoña Heras, Maud E S Achard, Gordon J King, M Pilar Argente, Fabian Kurth, Samantha L Taylor, y col. 2013. "Structural and Functional Characterization of ScsC, a Periplasmic Thioredoxin-like Protein from Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Antioxidants y Redox Signaling* 19 (13): 1494–1506. doi:10.1089/ars.2012.4939.
- Silhavy, Thomas J, Daniel Kahne, and Suzanne Walker. 2010. "The Bacterial Cell Envelope." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5): a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414.
- Singh, Satish K, Gregor Grass, Christopher Rensing, and William R Montfort. 2004. "Cuprous Oxidase Activity of CueO from Escherichia Coli Cuprous Oxidase Activity of CueO from Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 186 (22): 7815–17. doi:10.1128/JB.186.22.7815.
- Skaar, Eric P, Deborah M Tobiasson, J Quick, Ralph C Judd, Herbert Weissbach, Frantzy Etienne, Nathan Brot, and H Steven Seifert. 2002. "The Outer Membrane Localization of the Neisseria Gonorrhoeae MsrA/B Is Involved in Survival against Reactive Oxygen Species." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15). National Academy of Sciences: 10108–13. doi:10.1073/pnas.152334799.
- Slamti, Leyla, and Matthew K Waldor. 2009. "Genetic Analysis of Activation of the Vibrio Cholerae Cpx Pathway." *Journal of Bacteriology* 191 (16). American Society for Microbiology: 5044–56. doi:10.1128/JB.00406-09.
- Slauch, James M. 2011. "How Does the Oxidative Burst of Macrophages Kill Bacteria? Still an Open Question." *Molecular Microbiology* 80 (3): 580–83. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x.
- Snyder, W. B., L. J B Davis, P. N. Danese, C. L. Cosma, and T. J. Silhavy. 1995. "Overproduction of nlpE, a New Outer Membrane Lipoprotein, Suppresses the Toxicity of Periplasmic lacZ by Activation of the Cpx Signal Transduction Pathway." *Journal of Bacteriology* 177 (15): 4216–23.
- Soncini, F. C., E. G. Vescovi, and E. a. Groisman. 1995. "Transcriptional Autoregulation of the Salmonella Typhimurium phoPQ Operon." *Journal of Bacteriology* 177 (15): 4364–71.
- Stadtman, Earl R., Jakob Moskovitz, and Rodney L. Levine. 2003. "Oxidation of Methionine Residues of Proteins: Biological Consequences." *Antioxidants y Redox Signaling* 5 (5): 577–82. doi:10.1089/152308603770310239.
- Stoyanov, J. V., J. L. Hobman, and N. L. Brown. 2001. "CueR (YbbI) of Escherichia Coli Is a MerR Family Regulator Controlling Expression of the Copper Exporter CopA." *Molecular Microbiology* 39 (2): 502–11. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02264.x.
- Suntharalingam, P, H Spencer, C V Gallant, and N L Martin. 2003. "Salmonella Enterica Serovar Typhimurium rdoA Is Growth Phase Regulated and Involved in Relaying Cpx-Induced Signals." *Journal of Bacteriology* 185 (2): 432–43.
- Thacker, Philip A. 2013. "Alternatives to Antibiotics as Growth Promoters for Use in Swine Production: A Review." *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4 (1): 35. doi:10.1186/2049-1891-4-35.
- Thieme, Daniel, Peter Neubauer, Dietrich H. Nies, and Gregor Grass. 2008. "Sandwich Hybridization Assay for Sensitive Detection of Dynamic Changes in mRNA Transcript Levels in Crude Escherichia Coli Cell Extracts in Response to Copper Ions." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (24): 7463–70. doi:10.1128/AEM.01370-08.
- Thomassin, Jenny-Lee, Natalia Giannakopoulou, Lei Zhu, Jeremy Gross, Kristiana Salmon, Jean-Mathieu Leclerc, France Daigle, Hervé Le Moual, and Samantha Gruenheid. 2015. "The CpxRA Two-Component System Is Essential for Citrobacter Rodentium Virulence." *Infection and Immunity* 83 (5). American Society for Microbiology: 1919–28. doi:10.1128/IAI.00194-15.
- Tschauner, Karolin, Patrick Hö rnschemeyer, Volker Steffen Mü ller, and Sabine Hunke. 2014. "Dynamic Interaction between the CpxA Sensor Kinase and the Periplasmic Accessory Protein CpxP Mediates Signal Recognition in E. Coli." doi:10.1371/journal.pone.0107383.
- Uchiya, K, Ma Barbieri, K Funato, a H Shah, P D Stahl, and E a Groisman. 1999. "A Salmonella Virulence Protein That Inhibits Cellular Trafficking." *The EMBO Journal* 18 (14): 3924–33. doi:10.1093/emboj/18.14.3924.

- Uzzau, S, N Figueroa-Bossi, S Rubino, and L Bossi. 2001. "Epitope Tagging of Chromosomal Genes in Salmonella." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26): 15264–69. doi:10.1073/pnas.261348198.
- van der Velden, a W, S W Lindgren, M J Worley, and F Heffron. 2000. "Salmonella Pathogenicity Island 1-Independent Induction of Apoptosis in Infected Macrophages by Salmonella Enterica Serotype Typhimurium." *Infection and Immunity* 68 (10): 5702–9. doi:10.1128/IAI.68.10.5702-5709.2000.Updated.
- van Rensburg, Julia J, Kate R Fortney, Lan Chen, Andrew J Krieger, Bruno P Lima, Alan J Wolfe, Barry P Katz, Zhong-Yin Zhang, and Stanley M Spinola. 2015. "Development and Validation of a High-Throughput Cell-Based Screen to Identify Activators of a Bacterial Two-Component Signal Transduction System." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (7). American Society for Microbiology: 3789–99. doi:10.1128/AAC.00236-15.
- Verbrugghe, Elin, Filip Boyen, Wim Gaastra, Leonie Bekhuis, Bregje Leyman, Alexander Van Parys, Freddy Haesebrouck, and Frank Pasmans. 2012. "The Complex Interplay between Stress and Bacterial Infections in Animals." *Veterinary Microbiology* 155 (2–4): 115–27. doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.012.
- Verbrugghe, Elin, Maarten Dhaenens, Bregje Leyman, Filip Boyen, Neil Shearer, Alexander Van Parys, Roel Haesendonck, y col.2016. "Host Stress Drives Salmonella Recrudescence." *Scientific Reports* 6 (February). Nature Publishing Group: 20849. doi:10.1038/srep20849.
- Vertommen, Didier, Matthieu Depuydt, Jonathan Pan, Pauline Leverrier, Laurent Knoops, Jean-Pierre Szikora, Joris Messens, James C A Bardwell, and Jean-Francois Collet. 2008. "The Disulphide Isomerase DsbC Cooperates with the Oxidase DsbA in a DsbD-Independent Manner." *Molecular Microbiology* 67 (2). NIH Public Access: 336–49. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06030.x.
- Volkman, B F, D Lipson, D E Wemmer, and D Kern. 2001. "Two-State Allosteric Behavior in a Single-Domain Signaling Protein." *Science (New York, N.Y.)* 291 (March): 2429–33. doi:10.1126/science.291.5512.2429.
- Wackett, Lawrence P, Anthony G Dodge, B M Lynda, and Lynda B M Ellis. 2004. "Microbial Genomics and the Periodic Table MINIREVIEW Microbial Genomics and the Periodic Table." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 647–55. doi:10.1128/AEM.70.2.647.
- Waldner, Landon L, Keith D Mackenzie, Wolfgang Köster, Aaron P White, Wolfgang Kö, Aaron P White, Wolfgang Köster, and Aaron P White. 2012. "From Exit to Entry: Long-Term Survival and Transmission of Salmonella." *Pathogens* 1: 128–55. doi:10.3390/pathogens1020128.
- Wayne Outten, F., and George P. Munson. 2013. "Lability and Liability of Endogenous Copper Pools." *Journal of Bacteriology* 195 (20): 4553–55. doi:10.1128/JB.00891-13.
- West, A H, and A M Stock. 2001. "Histidine Kinases and Response Regulator Proteins in Two-Component Signaling Systems." *Trends in Biochemical Sciences* 26 (6): 369–76.
- Winfield, Mollie D, and Eduardo A Groisman. 2003. "Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of Salmonella and Escherichia Coli." *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7). American Society for Microbiology: 3687–94. doi:10.1128/AEM.69.7.3687-3694.2003.
- Winyard, Paul G, Christopher J Moody, Claus Jacob, C. Jacob, et al., T. Finkel, N.J. Holbrook, y col.2005. "Oxidative Activation of Antioxidant Defence." *Trends in Biochemical Sciences* 30 (8). Elsevier: 453–61. doi:10.1016/j.tibs.2005.06.001.
- Wolfe, Alan J., Niyati Parikh, Bruno P. Lima, and Bozena Zemaitaitis. 2008a. "Signal Integration by the Two-Component Signal Transduction Response Regulator CpxR." *Journal of Bacteriology* 190 (7): 2314–22. doi:10.1128/JB.01906-07.
- Wolfe, Alan J, Niyati Parikh, Bruno P Lima, and Bozena Zemaitaitis. 2008b. "Signal Integration by the Two-Component Signal Transduction Response Regulator CpxR." *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 190 (7): 2314–22. doi:10.1128/JB.01906-07.
- Wolschendorf, Frank, David Ackart, Tej B Shrestha, Laurel Hascall-Dove, Scott Nolan, Gyanu Lamichhane, Ying Wang, Stefan H Bossmann, Randall J Basaraba, and Michael Niederweis. 2011.

- "Copper Resistance Is Essential for Virulence of Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (4): 1621–26. doi:10.1073/pnas.1009261108.
- Wu, Junzhu, Fabrice Neiers, Sandrine Boschi-Muller, and Guy Branlant. 2005. "The N-Terminal Domain of PILB from Neisseria Meningitidis Is a Disulfide Reductase That Can Recycle Methionine Sulfoxide Reductases." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (13). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 12344–50. doi:10.1074/jbc.M500385200.
- Yadavalli, Srujana S., Jeffrey N. Carey, Rachel S. Leibman, Annie I. Chen, Andrew M. Stern, Manuela Roggiani, Andrew M. Lippa, and Mark Goulian. 2016. "Antimicrobial Peptides Trigger a Division Block in Escherichia Coli through Stimulation of a Signalling System." *Nature Communications* 7 (July): 12340. doi:10.1038/ncomms12340.
- Yamamoto, Kaneyoshi, Kiyo Hirao, Taku Oshima, Hirofumi Aiba, Ryutaro Utsumi, and Akira Ishihama. 2005. "Functional Characterization in Vitro of All Two-Component Signal Transduction Systems from Escherichia Coli." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (2): 1448–56. doi:10.1074/jbc.M410104200.
- Yamamoto, Kaneyoshi, and Akira Ishihama. 2005. "Transcriptional Response of Escherichia Coli to External Copper." *Molecular Microbiology* 56 (1): 215–27. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04532.x.
- Yamamoto, Kaneyoshi, and Akira Ishihama. 2006. "Characterization of Copper-Inducible Promoters Regulated by CpxA/CpxR in Escherichia Coli." *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (7): 1688–95. doi:10.1271/bbb.60024.
- Yang, Wenyan, Jianguo Wang, Lei Liu, Xiaoyan Zhu, Xiaoxu Wang, Zhaoxi Liu, Zhe Wang, Lianyu Yang, and Guowen Liu. 2011. "Effect of High Dietary Copper on Somatostatin and Growth Hormone-Releasing Hormone Levels in the Hypothalamus of Growing Pigs." *Biological Trace Element Research* 143 (2). Humana Press Inc: 893–900. doi:10.1007/s12011-010-8904-x.
- Yoon, Bo-Young, Jin-Sik Kima, Si-Hyeon Umb, Inseong Job, Jin-Wook Yooa, Kangseok Leec, Yong-Hak Kimd, and Nam-Chul Hab. 2014. "Periplasmic Disulfide Isomerase DsbC Is Involved in the Reduction of Copper Binding Protein CueP from Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 446 (4): 971–76.
- Yoon, Bo-Young, Ji-Hyun Yeom, Jin-Sik Kim, Si-Hyeon Um, Inseong Jo, Kangseok Lee, Yong-Hak Kim, and Nam-Chul Ha. 2014. "Direct ROS Scavenging Activity of CueP from Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Molecules and Cells* 37 (2): 100–108. doi:10.14348/molcells.2014.2238.
- Yoon, Bo Young, Yong Hak Kim, Nahee Kim, Bo Young Yun, Jin Sik Kim, Joon Hee Lee, Hyun Soo Cho, Kangseok Lee, and Nam Chul Ha. 2013. "Structure of the Periplasmic Copper-Binding Protein CueP from Salmonella Enterica Serovar Typhimurium." *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 69 (10): 1867–75. doi:10.1107/S090744491301531X.
- Zeller, Tanja, and Gabriele Klug. n.d. "Bacterial Thioredoxins -Genes and Regulation."

