


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**

# "Caracterización funcional de sistemas de tolerancia y resistencia a metales monovalentes en *Salmonella enterica*"

**Presentada por: Lic. Sebastián Cerminati**

**Directora: Susana K. Checa**

**Rosario, Argentina**

**2014**

# “**Caracterización funcional de sistemas de tolerancia y resistencia a metales monovalentes en *Salmonella enterica***”

Sebastián Cerminati
Licenciado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

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, área Biología Molecular de Microorganismos Patógenos, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2009 y el 20 de Noviembre de 2013, bajo la dirección de la Dra. Susana K. Checa.

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis han sido publicados en las siguientes patentes, revistas y reuniones científicas.

**Patentes**

María Marta Ibáñez, **Sebastián Cerminati**, Susana Karina Checa, Fernando Carlos Soncini. 2013. Polipéptido mutado, cepa de bacterias que lo comprende y métodos para detectar diferentes cationes metálicos simultaneamente. Número de aplicación: 20130100873, Marzo 2013.

**Trabajos publicados**

María M. Ibáñez, **Sebastián Cerminati**, Susana K. Checa, Fernando C. Soncini. Dissecting the metal-selectivity of MerR monovalent metal ion sensors in *Salmonella*. J Bacteriol. 2013. 195:13 3084-3092.

**Cerminati S**, Soncini FC, Checa SK. Selective detection of gold using genetically engineered bacterial reporters. Biotechnol Bioeng. 2011. Nov; 108(11): 2553-60.

**Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas**

Aldana David, **Sebastián Cerminati**, Susana K. Checa and Fernando C. Soncini. "Complex regulation of the *Salmonella*-specific CBAefflux pump *gesABC"*. IX Congreso Argentino de de Microbiología General (SAMIGE). Agosto 2013. Rosario. Argentina.

**Sebastián Cerminati**, Susana K. Checa, Fernando C. Soncini. "A consortium of regulatory systems controls the expression of a *Salmonella*-specific efflux complex". XLVIII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Mendoza. Argentina. Noviembre, 2012. Biocell 36 (Suppl.), pp. 53.

**Sebastián Cerminati**, Fernando C. Soncini, Susana K. Checa. "Desing and construction of gold-selective bacterial biosensors". VII Congreso Argentino de de Microbiología General (SAMIGE). Mayo 2011. San Miguel de Tucumán. Argentina.

Soncini FC, Checa SK, Ibañez MM, Zafra M, Humbert MV, **Cerminati S** and Perez Audero ME. "Operator discrmination between paralog MerR regulators in Salmonella".

7th International Biometals Symposium, Tucson, Arizona, EEUU, Julio 2010.

Ibañez, María M.; Humbert, María V.; Zafra, Milagros; **Cerminati, Sebastián**; Checa, Susana K. y Soncini, Fernando C. “Molecular bases of metal/operator selectivity in MerR monovalent metal ion sensors” XLV Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. San Miguel de Tucumán. Argentina. Noviembre 2009. Biocell 33 (Supl.), pp. 112.

# Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Susana Checa por todos estos años de enseñanza continua y por haberme dirigido siempre transmitiendo su experiencia y pasión por la ciencia. Muchísimas gracias, Susana.

Al Dr. Fernando Soncini, por haberme dado la posibilidad de realizar esta Tesis en su laboratorio y por haberme transmitido siempre el entusiasmo por los nuevos experimentos y la actividad científica.

A la Dra. Eleonora García Véscovi, por su amplia disponibilidad para discutir los resultados y sugerir nuevos experimentos en el trabajo diario, así como sus consejos y experiencias.

De la misma manera a Maru, Euge y Lucas. Ellos estuvieron en algún momento durante estos años ayudando, aconsejando, proponiendo, discutiendo, y ofreciendo su afecto.

A mis compañeros del laboratorio que todos estos años contribuyeron en la discusión y ejecución de experimentos e hicieron que los días de trabajo sean más divertidos. Gracias Ale, Caro, Gastón, Tati, Juli, Griselda, Rober, Aldi, Vicky, Sut, Tama, Nana, Mili, Mauri, Gabriela, Nico, Javier, Yiya y Martina. A todos en el subsuelo de sala 9, especialmente a Pame y Julia por los consejos.

A todas las amistades que me acompañaron durante todos estos años: A Seba, Yani y Allo. A Juanma, Flor, Uciel, Piqui, Flaca, Pollo, Sole, Juan y Juani. A Ire por las tardes de charlas y delirios. A los siempre estuvieron conmigo: Joaco, Richard, Anto. A los que me acompañan todos los días: Lau, Mati, Thiago, Alejo, Meli y Mariano.

A mi familia. Siempre a mi familia. Por todo, gracias Elsa, Juancho, Juanpe, Maru, Juanma, Nico y Flor. Gracias.

# Índice

**Abreviaturas y símbolos.** 11

**Resumen.** 13

**1. Introducción.** 14

**1.1.** Los metales de transición**.** 15

**1.1.1.** Rol de los metales de transición en los sistemas biológicos 15

**1.1.2.** Toxicidad de los metales. 15

**a.** La biodisponibilidad del ión metálico. 16

**b.** La interacción entre metales y diferentes ligandos y las consecuencias de esta interacción. 16

**c.** La capacidad de participar en reacciones de óxido-reducción. 17

**1.1.3.** Los metales en el medio ambiente. 18

**a.** Mercurio. 19

**b.** Plomo. 19

**c.** Cadmio. 20

**d.** Oro. 20

**e.** Cobre. 21

**f.** Plata. 22

**1.2.** Mecanismos de resistencia bacteriana a metales**.** 23

**1.2.1.** Transportadores de metales. 23

**a.** ATPasas tipo P. 23

**b.** Sistemas de eflujo de metales CBA. 23

**c.** Otras familias de transportadores de metales. 24

**1.2.2.** Detoxificación de metales por quelado. 24

**1.2.3.** Detoxificación de metales por modificación enzimática. 25

**1.2.4.** Sistemas de monitoreo del metal. 25

**a.** Reguladores citoplasmáticos. 26

**b.** Sistemas de dos componentes. 29

**1.3.** Mecanismos de resistencia a metales pesados en *Salmonella*

Typhimurium 30
**1.3.1.** Resistencia a iones metálicos monovalentes. 31
**1.3.2.** Resistencia a iones metálicos divalentes. 35
**1.4.** Mecanismos no específicos de resistencia a metales. 36
**1.4.1.** Sistema de dos componentes CpxAR. 36
**1.5.** Detección de contaminación por metales. 41
**1.5.1.** Métodos analíticos 41
**1.5.2.** Biosensores. 42
**1.5.2.1.** Biosensores bacterianos para la detección de metales. 44

**2. Objetivos** 49

**3. Materiales y métodos** 51
**3.1.** Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos. 52
**3.2.** Medios de cultivo, antibióticos y condiciones de crecimiento 57
**3.3.** Técnicas moleculares 57
**3.3.1**. Ácidos nucleicos. 57
**3.3.1.1**. Extracción de ADN genómico. 57
**3.3.1.2**. Preparación de ADN plasmídico. 58
**3.3.1.3.** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 59
**3.3.1.4.** Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (*Colony*-PCR). 59
**3.3.1.5.** Electroforesis de ADN en geles de agarosa. 59
**3.3.1.6.** Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**.** 60
**3.3.1.7.** Digestión de ADN con enzimas de restricción. 60
**3.3.1.8.** Reacciones de ligación de fragmentos de ADN. 60
**3.3.1.9**. Mutagénesis sitio dirigida mediante las técnicas de megaprimer y SOE-PCR. 61
**3.3.1.10.** Construcción de plásmidos reporteros. 62
**3.4**. Preparación de células competentes. 63
**3.5.** Transformación y selección. 63
**3.6.** Manipulación genética. 64

**3.6.1.** Construcción de mutantes polares y no polares en *Salmonella y E. coli.* 65
**3.6.2.** Generación de cepas portadoras de los alelos mutantes de *golS en Salmonella*. 66
**3.6.3.** Construcción de mutantes transgénicas en *Escherichia coli.* 68
**3.6.4.** Utilización del bacteriófago P22. 70
**3.6.4.1.** Obtención de lisado en medio semisólido. 70
**3.6.4.2.** Obtención de lisado en medio líquido. 71
**3.6.4.3.** Transducción generalizada. 71
**3.6.5.** Utilización del bacteriófago P1. 71
**3.6.5.1.** Obtención de lisados en medio semisólido. 71
**3.6.5.2.** Transducción. 72
**3.7.** Determinación de fluorescencia. 72
**3.7.1.** Determinación de fluorescencia en medio líquido. 73
**3.7.2**. Determinación de fluorescencia en medio sólido. 74
**3.8.** Ensayos de actividad β-galactosidasa. 74
**3.9.** Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). 75
**3.10.** Curvas de crecimiento**.** 75
**3.11.** Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína. 75
**3.11.1.** Fosforilación de oligonucleótidos 75
**3.11.2.** Cuantificación de ADN marcado radiactivamente. 76
**3.11.3.** Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. 76
**3.11.4.** Ensayos de protección a la digestión por ADNasa I o ADN "*footprinting*". 77
**3.11.5.** Secuenciación del ADN. 78
**3.12.** Expresión y purificación de GolS y CpxR nativas 79
**3.12.1**. Purificación de GolS. 79
**3.12.2.** Purificación de CpxR. 79
**3.13.** Determinación de la concentración de proteínas**.** 80
**3.14.** Electroforesis de proteínas. 81
**3.15.** Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana

de nitrocelulosa (*Western blot*). 81

**3.16.** Herramientas bioinformáticas. 82

**3.17.** Modelado matemático y ajuste de datos. 82

**4. Capítulo I. Diseño y construcción de biosensores bacterianos selectivos para la detección de oro.** 84

**4.1**. Introducción 85

**4.2.** Resultados y discusión 86

**4.2.1.** Evaluación de un bioreportero fluorescente específico para oro en *Salmonella*. 86

**4.2.2.** Comparación del desempeño del bioreportero fluorescente con otros bioreporteros . 88

**4.2.3.** El bioreportero fluorescente en *Salmonella* detecta un amplio rango de concentraciones de oro. 90

**4.2.4.** Transferencia del sistema bioreportero a *E. coli.* 93

**4.2.4.1.** Biosensores que expresan el sensor/regulador GolS a partir plásmidos. 93

**4.2.4.2.** Biosensores que expresan el sensor/regulador GolS a partir del cromosoma de *E. coli.* 97

**4.2.5.** Calibración del biosensor fluorescente EC-GolTSB. 100

**4.2.5.1**. Optimización de las condiciones de cultivo: medio de cultivo. 100

**4.2.5.2.** Optimización de las condiciones de cultivo: fase de crecimiento de las bacterias. 102

**4.2.5.3.** Determinación de los rangos y límite de detección. 103

**4.2.6.** Comparación de los biosensores fluorescentes. 105

**4.3.** Conclusiones Capítulo I 106

**5. Capítulo II. Desarrollo de bisensores no selectivos para la detección De un amplio espectro de metales de transición.** 109

**5.1**. Introducción. 110

**5.2.** Resultados y discusión. 112

**5.2.1.** Construcción de un bioreportero fluorescente basado

en $GolS_{S77C}$ utilizando como bacteria residente a *Salmonella*. 112

**5.2.2.** Calibración del bioreportero fluorescente basado en $GolS_{S77C}$. 113

**5.2.3**. Transferencia del sistema bioreportero basado en $GolS_{S77C}$ a *Escherichia coli.* 116

**5.2.3.1** Construcción y calibración del biosensor Bacteriano no selectivo. 118

**5.2.4.** Análisis de muestras aditivadas con metales utilizando las herramientas biotecnológicas desarrolladas. 121

**5.2.5.** Generación de una variante del sensor GolS que detecta un mayor espectro de metales 125

**5.3.** Conclusiones Capítulo II 126

**6. Capítulo III: Caracterización del sistema de eflujo GesABC de *Salmonella*.** 128

**6.1.** Introducción. 129

**6.2.** Resultados y discusión 131

**6.2.1.** Análisis bioinformático de la región promotora de *gesABC* 131

**6.2.2**. El sistema de dos componentes CpxAR activa la expresión de *gesABC* . 132

**6.2.3.** CpxR se une a la región promotora de *gesAB.* 138

**6.2.4.** Determinación del sitio de unión de CpxR. 139

**6.2.5.** La regulación mediada por CpxR de GesABC es importante para la resistencia a Au y a drogas orgánicas. 142

**6.2.6.** GesABC exporta un compuesto capaz de disminuir la concentración efectiva de oro en medio extracelular. 147

**6.3.** Conclusiones Capítulo III. 148

**7. Conclusiones generales.** 150

**8. Referencias bibliográficas.** 154

# Abreviaturas y símbolos

| | |
|---|---|
| Abs | Absorbancia |
| 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 |
| DNasa I | Desoxirribonucleasa I |
| DO | Densidad óptica |
| DTT | Ditiotreitol |
| ε | Coeficiente de extinción molar |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Ácido etilenglicol bis(β-aminoetil éter) N,N,N’,N’-tetraacético |
| EROS | Especies reactivas del oxígeno |
| g | gramo |
| h | Horas |
| His | Histidina |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta presión |
| IPTG | Isopropil β-D-tiogalactopiranósido |
| kDa | Kilodalton |
| Km | Kanamicina |
| kpb | Kilopares de bases |
| l | Litro |
| LB | Luria Bertani |
| mA | Miliamperios |
| ME | Membrana externa |
| MES | Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico |
| MI | Membrana interna |
| min | Minutos |
| MOPS | Ácido 4-morfolin- propansulfónico |
| nm | Nanometro |
| N-terminal | Amino terminal |
| ONPG | o-nitrofenil-galactopiranósido |
| P | Promotor |
| p/V | Peso en volúmen |

| | |
|---|---|
| pb | Pares de bases |
| ppb | Partes por billón |
| PPi | Pirofosfato |
| ppm | Partes por millón |
| $^{R}$ | Resistente |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundos |
| SD | Desviación estándar |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio |
| Ser | Serina |
| Tc | Tetraciclina |
| Tris | N-tris-(hidroximetil) aminometano |
| U | Unidad |
| UEF | Unidades específicas de fluorescencia |
| URF | Unidades relativas de fluorescencia |
| ufp | Unidades formadoras de placas |
| UV | Ultravioleta |
| v | Voltio |
| V/V | Volumen en volumen |

# Resumen

Los elementos metálicos están involucrados en todas las fases de la existencia microbiana y juegan roles primordiales en el crecimiento celular y el funcionamiento metabólico pero pueden ser tóxicos cuando su concentración supera un umbral determinado. Por ello, las bacterias han desarrollado sistemas que permiten monitorear estas especies y modular la expresión de factores involucrados en la remoción de los mismos para mantener la homeostasis y prevenir el estrés. *Salmonella entérica* serov. typhimurium, una enterobacteria capaz de sobrevivir tanto en el medio ambiente como en el hospedador dispone de sistemas de detoxificación/resistencia específicos, controlados por reguladores transcripcionales que monitorean la concentración intracelular del metal, como CueR y GolS, que reconocen iones de metales monovalentes. Además, la bacteria dispone de sistemas no específicos que son importantes moduladores de las respuesta global al estrés celular producido por metales, como el sistema de dos componente CpxAR. En este trabajo, utilizamos al sistema *gol* de resistencia a Au controlado por GolS como plataforma en el desarrollo del primer biosensor bacteriano fluorescente específico para este metal, utilizando como bacteria residente del sistema de detección tanto *Salmonella*, como cepas no patógenas de *Escherichia coli*. En condiciones de laboratorio, estos biosensores demostraron ser eficaces para detectar Au específicamente en un rango de concentraciones adecuado para la detección del metal en muestras del ambiente. Este desarrollo tecnológico y variantes no selectivas del sensor GolS previamente desarrolladas en el laboratorio fueron utilizados para la generación de nuevos biosensores bacterianos para la detección de una amplia variedad de metales tóxicos, incluyendo Au, Cu, Ag, Hg, Cd y Pb, metales que son altamente nocivos para el ecosistema. Estos dispositivos, ensayados en condiciones de laboratorio, sirven de prueba de concepto para la utilización de los mismos en monitoreo ambiental de muestras acuosas. Por otro lado, y como parte de la caracterización del sistema de eflujo GesABC, perteneciente al regulón *gol* de resistencia a Au de *S.* typhimurium, demostramos la participación del sistema de dos componentes CpxAR de respuesta a estrés periplasmático como co-regulador y evidenciamos la relevancia de esta regulación adicional para la sobrevida en condiciones de estrés.

# 1. Introducción

## 1.1. Los metales de transición.

### 1.1.1. Rol de los metales de transición en los sistemas biológicos.

Los elementos metálicos están involucrados en todas las fases de la existencia microbiana y juegan roles primordiales en el crecimiento celular y el funcionamiento metabólico (Tottey y col., 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 (Barton y col., 2007), 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 volframio (W), son requeridos en cantidades mucho menores (Hobman y col., 2007). Estos elementos, también denominados micronutrientes, se requieren principalmente para la transferencia de electrones y la formación de metaloenzimas (Wackett y col., 2004). A pesar de ser esenciales, el correcto funcionamiento celular requiere mantener un fino balance en la concentración intracelular de estos elementos, ya que se ha visto que tanto niveles insuficientes o excesivos de los mismos resultan perjudiciales y son factores desencadenantes de estrés (Nies, 1999).

Además de los elementos mencionados, en la naturaleza existen otros metales pesados, tales como aluminio (Al), oro (Au), plata (Ag), bismuto (Bi), cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg), plomo (Pb), estaño (Sn) y talio (Tl), para los que no se le ha podido asignar ningún rol biológico y que por lo tanto resultan tóxicos aún en mínimas cantidades (Hobman y col., 2007). Otros elementos metálicos como berilio (Be), cesio (Cs), litio (Li) y estroncio (Sr) para los que hasta el momento se conoce muy poco acerca de sus implicancias biológicas, también pueden ser tóxicos para la mayoría de las bacterias (Silver y Phung, 2005; Wackett y col., 2004).

### 1.1.2. Toxicidad de los metales.

El efecto tóxico de los metales es producto de su química inorgánica y bioinorgánica, y siempre es el ión metálico el causante de toxicidad y no el metal en

sí. La toxicidad que es capaz de generar determinado ion metálico depende de los siguientes factores:

**a. La biodisponibilidad del ión metálico.**

La definición genérica de la biodisponibilidad es la posibilidad de que organismos vivos tomen sustancias químicas desde el medio y que estas sustancias químicas alcancen una concentración tal que pueden participar en el metabolismo del organismo. Para que un compuesto (por ejemplo, un metal) sea biodisponible, éste tiene que estar en contacto con el organismo y tiene que tener un estado químico particular, es decir, debe ser accesible químicamente (Bolan y col., 2013; Collins y Stotzky, 1992). Por esto, esta propiedad está estrechamente relacionada con factores ambientales tales como pH, potencial de óxido-reducción, temperatura, la presencia de otros iones inorgánicos o de compuestos orgánicos. Si bien puede considerarse que la biodisponibilidad de muchos de los metales tóxicos es baja debido a que estos se encuentran principalmente secuestrados como depósitos de minerales, con la industrialización y otras actividades ligadas con las actividades del hombre como la agricultura o la explotación minera, grandes cantidades de estos metales han sido extraídos, liberados y dispersados en la superficie terrestre; acumulándose, de manera persistente, en nuevos sectores del medio ambiente (Bolan y col., 2013).

**b. La interacción entre metales y diferentes ligandos y las consecuencias de esta interacción.**

Muchos componentes celulares como agua, cadenas polipeptídicas, ácidos nucleicos y cofactores orgánicos son capaces de actuar como ligandos de metales. El poder de un ión metálico para acomplejar ligandos depende de su relación carga/radio, también conocida como capacidad polarizante y, por lo tanto, este concepto ha sido utilizado para explicar de qué manera los metales interactúan con las moléculas biológicas. Un metal con una gran relación carga/radio, interaccionará más fuerte con un ligando determinado que un metal con una relación carga/radio menor (Hughes y Poole, 1989). El radio iónico de un metal disminuye a medida que la carga nuclear aumenta desde la izquierda a la derecha en la tabla periódica. Para un ligando hipotético, la preferencia por un catión individual sigue la serie de Irwing-Williams (Fraústo da Silva y Williams, 1991), que para la primera fila de metales de transición

de la tabla periódica es la siguiente:

$$Ca^{+2} < Mg^{+2} < Mn^{+2} < Fe^{+2} < Co^{+2} < Ni^{+2} < Cu^{+2}/(Cu^{+1} > Zn^{+2}$$

En general, cuanto más polarizable es la estructura atómica, el ión es más "blando" y puede interaccionar más fuerte con los ligandos. Los iones de metales tóxicos como $Ag^{+1}$, $Au^{+1}$, $Cd^{+2}$, $Hg^{+2}$ y $Pb^{+2}$ poseen una estructura atómica grande y polarizable, y contienen electrones desapareados en sus capas electrónicas. Esto hace que actúen como ácidos de Lewis débiles, es decir, que sean capaces de formar complejos estables con las bases de Lewis débiles que tienen un átomo capaz de ceder electrones (Pearson, 1963). En general, estos ácidos de Lewis débiles coordinan átomos de azufre de grupos sulfidrilo de cisteínas (SH) o tioeter de metioninas, nitrógeno de histidinas y oxígeno de otras moléculas con mayor afinidad que los ácidos de Lewis intermedios como $Cu^{+2}$ o $Zn^{+2}$. Cuando los ácidos de Lewis débiles ingresan a la célula generan efectos adversos tales como: bloqueo de grupos funcionales, desplazamiento de metales esenciales con menor afinidad por sus ligandos, o modificación de la estructura proteica a través de la formación de puentes disulfuros erróneos. Estos metales también pueden unirse a tioles de bajo peso molecular como glutatión y cisteína, reduciendo la disponibilidad celular de estos compuestos (Hobman y col., 2007); interaccionar con otras moléculas biológicas como ADN y lípidos comprometiendo su función, o bien intervenir en reacciones químicas que generan productos nocivos para la célula. Estos daños que interfieren con las funciones celulares normales, pueden conducir a la muerte (Hobman y col., 2007; Nies, 2003).

**c. La capacidad de participar en reacciones de óxido-reducción.**

Las células producen especies reactivas del oxígeno (EROS) como producto de la utilización de la molécula de oxígeno ($O_2$) en diversos procesos metabólicos. El oxígeno molecular forma el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) al aceptar un electrón, o peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) cuando este último se reduce (González-Flecha y Demple, 2000; Storz y col., 1990). Los metales de transición pueden causar estrés oxidativo por acumulación de EROS ya sea en forma directa o indirecta.

Los denominados metales "redox" como el Fe, Cu, Cr, Co y V, entre otros,

pueden reaccionar con el anión superóxido o con el peróxido de hidrógeno en la reacciones de Fenton, o bien con ambos en la reacción de Haber-Weiss, formando el radical hidroxilo (OH*) (Figura 1.1). Este radical es altamente reactivo y puede causar la ruptura de una hebra por depurinación u oxidación de bases en el ADN. También puede causar peroxidación de lípidos, reduciendo la fluidez de la membrana y perturbando la función de proteínas de la envoltura. Además, un incremento en los radicales libres lleva a la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, formando derivados tóxicos que conducen a un daño celular generalizado. El estrés oxidativo inducido por metales de transición también puede causar oxidación de aminoácidos libres o proteínas, conduciendo a su fragmentación o a entrecruzamientos que pueden involucrar a proteínas (inter e intramolecular), o incluso otras biomoléculas, como por ejemplo ácidos nucleicos (Shi y col., 2004; Valko y col., 2005).

| | | | |
|---|---|---|---|
| Reacción de fenton | $M^{n+} + H_20_2$ | $\longrightarrow$ | $M^{(n+1)+} + OH^- + OH^*$ |
| | $M^{(n+1)+} + O_2^{*-}$ | $\longrightarrow$ | $M^{n+} + O_2$ |
| Reacción de Haber-Weiss | $H_20_2 + O_2^{*-}$ | $\longrightarrow$ | $OH^- + OH^* + O_2$ |

**Figura 1.1. Generación de especies reactivas del oxígeno mediante el poder reductor de los iones metálicos.** Reacción de Fenton y reacción de Haber-Weiss. Los iones metálicos se representan como $M^{n+}$ o $M^{(n+1)+}$ de acuerdo a la valencia (n) que tengan.

Aquellos metales que no tienen propiedades de óxido-reducción, pero si la capacidad de desplazar a un metal "redox" del sitio donde se encuentra unido, pueden aumentar la biodisponibilidad de éste último y, por lo tanto, la capacidad reactiva de este catión (Hobman y col., 2007).

### 1.1.3. Los metales en el medio ambiente

La mayoría de los metales se encuentran naturalmente en los suelos, aguas y el aire y se distribuyen sobre la superficie terrestre por numerosas vías geológicas naturales, pero además, como consecuencia de la industrialización y otras actividades del hombre, muchos han comenzado a concentrarse tanto en zonas urbanas como rurales. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales persisten en el medio ambiente ya que no se degradan químicamente, potenciando su toxicidad sobre el ecosistema (Bolan y col., 2013). A continuación se describen las características

principales de algunos metales pesados de interés para esta Tesis.

**a. Mercurio.**

El Hg es uno de los metales más tóxicos para el hombre. Existe en la naturaleza en tres estados de oxidación $Hg^0$ , $Hg^{+1}$, y $Hg^{+2}$ y puede formar complejos tanto orgánicos como inorgánicos. Se encuentra distribuido en la naturaleza tanto en fase sólida como líquida y gaseosa. En la corteza terrestre la cantidad de mercurio presente va desde 21 a 56 ppb principalmente en su forma elemental o formando complejos como HgS (Barnes y Seward, 1997). Las fuentes antropogénicas de mercurio, o sea las derivadas de la actividad del hombre, incluyen la entrada a la atmósfera como resultado de la quema de combustibles fósiles o por incineración o disposición de productos que lo contienen, tales como lámparas fluorescentes, baterías, y electrodos. Se ha estimado que las actividades antropogénicas mundiales son responsables de la entrada del 75% del mercurio al medio ambiente (Fitzgerald y col., 1998). La química ambiental del mercurio es muy compleja y pequeños cambios en las condiciones químicas, físicas, hidrológicas y biológicas pueden cambiar el estado fisicoquímico del metal, así como su biodisponibilidad (Morel y col., 1998).

**b. Plomo.**

El Pb es un metal no esencial y altamente tóxico que causa efectos perjudiciales en los sistemas biológicos. La concentración promedio en la corteza terrestre es de 16 ppb en el suelo, por lo que es un metal relativamente raro (Boutron y Patterson, 1983). Existen complejos de Pb ($Pb^{+2}$ y $Pb^{+4}$) tanto orgánicos como inorgánicos, siendo el componente importante de más de 200 minerales (Nriagu, 1978).

Pequeñas cantidades de plomo se liberan en el medio ambiente por procesos naturales, incluyendo la erosión de las rocas, la actividad volcánica, y el decaimiento radiactivo.

El plomo es uno de los metales más fáciles de extraer por lo que ha sido aprovechado por los seres humanos desde hace milenios. Su utilización por parte del hombre, especialmente en el último siglo, ha alterado la disponibilidad y distribución de este metal, tanto en el suelo como en el agua. Las altas emisiones de plomo de los

centros urbanos han dado lugar a concentraciones de plomo urbanas varios miles de veces más altas que en los tiempos pretecnológicas, y las pequeñas partículas del metal presentes en la mayoría de las emisiones a la atmósfera pueden ser transportados a nivel mundial por los vientos. En consecuencia, los entornos rurales también tienen niveles elevados niveles de plomo (Patte y Pain, 2003).

**c. Cadmio.**

El cadmio es otro elemento raro en la naturaleza y se encuentra generalmente en combinación con zinc en una relación 1:100. La concentración promedio de este metal en la corteza terrestre es de 0,15 ppm, mientras que en el agua es 1 millón de veces menor y en el aire es menor a 1 ppb (Gong y col., 1977). El cadmio se encuentra enriquecido en sedimentos ricos en materia orgánica debido a la capacidad de este metal de adsorberse y/o acomplejarse formando principalmente sulfuros. Su principal estado de oxidación en la naturaleza es $Cd^{+2}$, aunque puede formar algunos complejos como $Cd^{+1}$. Las fuentes antropogénicas de este metal, provienen principalmente de la agricultura, en donde es componente de varios fertilizantes. Esto constituye un gran problema, ya que este metal puede alcanzar fácilmente la cadena alimentaria (Bolan y col., 2013; Mookherjee, 1962).

**d. Oro.**

El oro es uno de los 10 elementos más raros de la corteza terrestre con una concentración promedio de 4 ppb (material sólido), y concentraciones que varían desde 0,0197 a 0,197 ppm en aguas naturales (Goldschmidt, 1954). Sin embargo, el oro no se encuentra uniformemente distribuido y se acumula en zonas mineralizadas. El oro nativo se encuentra comúnmente presente en aleaciones con Ag, Cu, Al, Fe, Bi, Pb, Zn, Pd (paladio) o Pt (platino), dónde la concentración de este metal precioso varía entre el 50 al 80 %p/V (Reith y col., 2007).

La demanda mundial por este metal es constante, tanto económicamente, como unidad de cambio monetario, como por la industria debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas que lo hacen apropiado para muchas aplicaciones, en especial como parte de componentes electrónicos (Butt y Hough, 2009).

En la naturaleza, el oro puede existir en su forma metálica pero también en

seis estados de oxidación diferentes, siendo los estados de oxidación +1 ($Au^{+1}$) y +3 ($Au^{+3}$) los más abundantes en el medio ambiente. Como el potencial rédox de ambos cationes $Au^{+1}$ y $Au^{+3}$ excede al del agua, la existencia de iones de oro libre en medio acuoso es termodinámicamente desfavorable pero pueden estabilizarse formando complejos orgánicos o inorgánicos (Reith y col., 2007).

Dentro del ambiente reductor del citoplasma celular, el estado monovalente $Au^{+1}$ se predice como la especie dominante. $Au^{+1}$ funciona como un ácido de Lewis débil y como tal forma complejos estables con ligandos que tienen electrones libres desapareados (bases de Lewis débiles), como grupos que contienen átomos de azufre presentes en grupos sulfidrilos de cisteínas y metioninas (Nies, 2007; Shaw, 1999). Así, a través de modificaciones químicas inducidas por el ión o por desplazamiento de metales esenciales, puede causar una disrupción en el equilibrio rédox de la célula, incrementar la permeabilidad celular e interferir en diferentes vías metabólicas, desencadenando eventualmente la muerte celular (Carotti y col., 2000; Reith y col., 2007).

**e. Cobre.**

El cobre es un elemento común en la naturaleza y se distribuye naturalmente 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 ($Cu_2CO_3(OH)_2$) (Magnani y Solioz, 2007). Por otra parte, el cobre es un elemento ampliamente utilizado en la industria con diferentes propósitos, y en la agricultura como fungicida y antibacteriano; y su producción mundial se incrementa día a día, lo que conlleva a aumentos en la cantidad de cobre tanto en el aire, como en el suelo y el agua (Kiaune y Singhasemanon, 2011).

Si bien el cobre es un metal esencial, su alta reactividad hace que sea tóxico a concentraciones relativamente bajas. El cobre existe en dos estados de oxidación como ión, la forma cúprica $Cu^{+2}$ y la especie cuprosa $Cu^{+1}$. Ambas especies poseen prácticamente la misma tendencia a formar complejos con bases de Lewis débiles como tioles, hidruros, cianuros y fosfinas (Magnani y Solioz, 2007).

En las cuproproteínas el cobre puede actuar como un aceptor/dador de electrones alternando entre sus estados $Cu^{+1}/Cu^{+2}$ con un potencial redox 0,15 V, que es muy cercano al valor rédox del citoplasma (Karlin, 1993). Esta propiedad del cobre lo convierte en un metal peligroso una vez que ingresó a la célula, porque es fácil que realice su ciclo rédox generando radicales hidroxilos (Magnani y Solioz, 2007; Nies, 2007). Además puede desplazar otros metales esenciales de sus sitios de unión en proteínas, de hecho uno de los blancos más sensibles al desplazamiento por cobre son los centros Fe-S, tanto en la biogénesis de los mismos como en la disrupción de las metaloenzimas que los contienen (Chillappagari y col., 2010; Macomber y Imlay, 2009). El $Cu^{+1}$ es la forma preferida y más abundante de cobre dentro del ambiente reductor del citoplasma donde generalmente se encuentra formando complejos con glutatión u otras moléculas pequeñas (Waldron y Robinson, 2009).

**f . Plata.**

La plata es un metal blanco y dúctil que en la naturaleza se encuentra tanto como Ag elemental como formando parte de minerales. Algunos compuestos de plata son extremadamente fotosensibles y son estables en aire y agua, pero precipitan en presencia de compuestos de azufre por lo que en la naturaleza se encuentra principalmente en la forma de sulfuro ($Ag_2S$) o está íntimamente asociado con otros sulfuros metálicos, especialmente los de plomo, cobre, hierro, y oro (Bell y Kramer, 1999). Además, la plata forma fácilmente compuestos con antimonio, arsénico, selenio, y telurio (Smith y Carson, 1977). En general, la concentración promedio en la corteza terrestre no supera 0,01 ppm, pero puede ser de hasta 10000 veces mayor en áreas industrializadas. Las fuentes antropogénicas de este metal provienen de las emisiones de operaciones de fundición, fabricación y comercialización de determinados productos fotográficos y eléctricos y de la combustión del carbón. Los movimientos biogeoquímicos globales de la plata se caracterizan por la liberación a la atmósfera, el agua y la tierra por fuentes naturales y antropogénicas, transporte a larga distancia de partículas finas en la atmósfera, y la adsorción en los suelos y sedimentos (Eisler, 2000).

Desde la antigüedad, la plata ha sido utilizada como un compuesto antibacteriano. Es un ácido de Lewis débil y tiene una alta afinidad por los grupos

sulfidrilos de las proteínas, lo que conduce a cambios conformacionales e inactivación de enzimas (Roat-Malone, 2007).

## 1.2. Mecanismos de resistencia bacteriana a metales.

Para defenderse del estrés metálico, las bacterias han desarrollado mecanismos específicos de resistencia que tienen como objetivo eliminar o neutralizar estas especies tóxicas del citoplasma o del periplasma en el caso de las bacterias Gram negativas. Para ello, se requiere detectar la presencia del metal tóxico y montar una respuesta adecuada para asegurar la supervivencia. Esta respuesta específica, en general involucra el transporte activo hacia al exterior celular, el secuestro intracelular mediante proteínas de unión a metales y la alteración enzimática hacia una forma menos tóxica. Estos mecanismos específicos se complementan con otros mecanismos globales o inespecíficos dedicados a contrarrestar o mitigar el daño producido por el metal tóxico (Nies, 1999).

### 1.2.1. Transportadores de metales.

#### a. ATPasas tipo P.

Las ATPasas tipo P son una superfamilia de transportadores de membrana interna en bacterias que dirigen el transporte de sus sustratos mediante la hidrólisis de ATP y se encuentran distribuidos en todos los dominios de la vida. Los miembros de esta superfamilia que transportan metales de transición conforman el subgrupo de ATPasas tipo P1B (Argüello y col., 2007). Además, dentro de las ATPasas tipo P1B hay dos grupos, uno de ellos formado por las que transportan iones metálicos divalentes como $Cd^{+2}$, $Zn^{+2}$, $Pb^{+2}$ y $Co^{+2}$, y otro que incluye los transportadores de $Cu^{+1}$ y $Ag^{+1}$ (Argüello, 2003). Al primer grupo pertenece el transportador de Zn/Cd/Pb ZntA (Rensing y col., 1997) y al segundo grupo, los transportadores de cationes monovalentes CopA de *Escherichia coli* y GolT de *Salmonella* typhimurium (Checa y col., 2007; Rensing y col., 2000).

#### b. Sistemas de eflujo de metales CBA.

Estos complejos de proteínas de bacterias Gram negativas transportan iones metálicos, drogas o xenobióticos desde el citoplasma o el periplasma al exterior celular

acoplando el transporte del sustrato a la fuerza protomotriz que dirige protones hacia el citoplasma. Las tres subunidades que los componen se localizan formando un canal que conecta la membrana plasmática con la membrana externa. La subunidad localizada en la membrana plasmática, denominada proteína RND, es el componente central de estos complejos y además es la responsable de la especificidad del sustrato (Blair y Piddock, 2009). Los otros componentes de los sistemas de eflujo tipo CBA son una proteína de membrana externa (OMP) y una proteína periplasmática accesoria también denominada proteína de fusión a membranas (PAP o MFP) (Nikaido y Takatsuka, 2009). En el caso particular de transportadores de metales puede haber un cuarto componente periplasmático que cumple funciones de chaperón (Bagai y col., 2008; Loftin y col., 2005).

Los componentes RND de las bombas de eflujo CBA han sido clasificados en dos grupos según el sustrato transportado: HME si transportan metales y HAE1 si transportan drogas o xenobióticos (Nies, 2003; Saier y col., 1994). Al primer grupo pertenecen CusA de *E. coli*, que transporta $Cu^{+1}$ y $Ag^{+1}$ (Franke y col., 2003), y CzcA y CnrB de *Cupriavidus metallidurans*, que transportan $Zn^{+2}$, $Co^{+2}$ y $Cd^{+2}$, $Co^{+2}$ y $Ni^{+2}$, respectivamente (Legatzki y col., 2003). La proteína AcrB de *E. coli*, involucrada en el transporte de diversos compuestos como acriflavina, fluoroquinolonas, tetraciclina, cristal violeta, azul de metileno, bromuro de etidio, SDS (Nikaido y Takatsuka, 2009) y MexB de *Pseudomonas aeuronginosa* son los factores mejor caracterizados del grupo HAE1 (Sennhauser y col., 2009).

**c. Otras familias de transportadores de metales.**

Además de los transportadores ya mencionados, miembros de otras familias de transportadores como CDF (facilitadores de la difusión de cationes) y MFS (superfamilia de facilitadores principales) participan detoxificando metales como $Zn^{+2}$, $Ni^{+2}$ y $Co^{+2}$ en algunas bacterias como *C. metallidurans* (Grosse y col., 2004).

### 1.2.2. Detoxificación de metales por quelado.

Un mecanismo de resistencia a metales pesados alternativo o complementario al eflujo es el secuestro del metal tóxico, ya sea en el periplasma o en el citoplasma por unión a proteínas pequeñas. Este mecanismo puede resultar eficaz cuando las bacterias

están expuestas a bajas concentraciones de metales pesados (Nies, 1999). Varias evidencias indican que estas proteínas pueden acoplarse a los transportadores de metales o a otros sistemas de detoxificación a fin de hacer más eficiente la eliminación del metal (Bagai y col., 2008; Barkay y col., 2003; Loftin y col., 2005; Pontel y Soncini, 2009), por lo que se los conoce también como chaperones de metales.

### 1.2.3. Detoxificación de metales por modificación enzimática.

La resistencia a mercurio y compuestos orgánicos que contienen este metal fue el primer sistema de detoxificación de metales tóxicos estudiado (Bruins y col., 2000; Nies, 1999). La detoxificación enzimática de mercurio inorgánico se logra mediante la reductasa de mercurio MerA que cataliza la reducción del $Hg^{+2}$ a la forma elemental monoatómica relativamente inerte, $Hg^{0}$, siendo la principal forma de eliminación para este metal (Barkay y col., 2003). Algunos organismos también son resistentes a las formas orgánicas del mercurio. Esta capacidad está mediada por la organomercurio liasa, codificada en el gen *merB*, que cataliza la ruptura del enlace entre el metal y un átomo de carbono formando un aducto con grupos tioles que son intercambiados por glutatión (Bruins y col., 2000).

Por su parte, la detoxificación enzimática de Cu es llevada a cabo por la multicobre oxidasa CueO (Grass y Rensing, 2001; Lim y col., 2002). Esta enzima periplasmática oxida el ión $Cu^{+1}$ a $Cu^{+2}$, disminuyendo así la cantidad de la forma más tóxica del metal (Grass y Rensing, 2001; Singh y col., 2004).

### 1.2.4. Sistemas de monitoreo del metal.

La expresión de los sistemas de resistencia está controlada principalmente a nivel transcripcional, de modo tal de asegurar la respuesta rápida en condiciones de estrés. Para ello, las bacterias cuentan con un arsenal de sistemas que monitorean los niveles de diferentes metales para posibilitar su rápida eliminación cuando están en exceso o son tóxicos. Estos sistemas se pueden dividir en dos grandes grupos: (a) sensores citoplasmáticos en los que la misma proteína tiene actividad de sensor y regulador transcripcional y (b) sistemas de dos componentes que detectan el metal o los daños que este produce en la envoltura celular y transmiten esa señal a un regulador transcripcional citoplasmático acoplado (Hobman y col., 2007).

**a. Reguladores citoplasmáticos.**

Se conocen varias familias de reguladores transcripcionales citoplásmáticos involucradas en la resistencia a metales en procariotas: MerR; ArsR/SmtB; CsoR; CopY; Fur; DtxR y NikR. Estas familias cubren la detección de los seis elementos de transición biológicamente esenciales de la primera línea de la tabla periódica: Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn, así como también los metales pesados del Grupo IB y IIA, Ag/Au y Cd/Hg, respectivamente. Además, las familias ArsR y MerR detectan metales pesados del grupo IVA como $Pb^{+2}$; e iones trivalentes del grupo VA, como $As^{+3}/Sb^{+3}$. Las primeras cuatro familias están involucradas en la resistencia a metales y sus reguladores actúan como activadores de la expresión de genes involucrados en la detoxificación, quelado y eflujo de metales. Las otras tres familias reprimen la expresión de los sistemas de adquisición en respuesta a exceso de metal (Giedroc y Arunkumar, 2007). En este trabajo sólo se hará referencia a la familia de reguladores MerR que son objeto de estudio de esta Tesis y cuyas características se discuten a continuación.

Los metalo-reguladores de la familia MerR forman parte de una gran familia de reguladores transcripcionales bacterianos capaces de responder a una variedad de estímulos ambientales que incluyen, además de metales pesados, estrés oxidativo, antibióticos y drogas (Brown y col., 2003; Chen y He, 2008; Hobman y col., 2005; Hobman y col., 2007). El paradigma de esta familia es MerR, el sensor de $Hg^{+2}$ que controla la expresión del sistema de detoxificación enzimática para este metal transportado en el transposón Tn21 de *E. coli* (O'Halloran y Walsh, 1987). Es presencia del metal, MerR controla su propia expresión y la del operón *merTPAD* que participa en la captación y reducción de $Hg^{+2}$ a $Hg^{0}$ (Barkay y col., 2003).

Además de MerR, se han descripto reguladores de esta familia involucrados en la detoxificación de otros metales tales como CueR, que responde a $Cu^{+1}$, $Ag^{+1}$ y $Au^{+1}$ (Kim y col., 2002; Stoyanov y col., 2001); GolS de *S.* Typhimurium y CupR de *C. metallidurans* (Checa y col., 2007; Jian y col., 2009) que detectan $Au^{+1}$; ZntR que responde a $Zn^{+2}$, $Cd^{+2}$ y $Pb^{+2}$ (Brocklehurst y col., 1999); PbrR de *C. metallidurans* que detecta $Pb^{+2}$ (Borremans y col., 2001); CoaR de *Synechocystis* PCC 6803 que sensa $Co^{+2}$ (Rutherford y col., 1999); CadR de *Pseudomonas aeruginosa* que detecta $Cd^{+2}$, $Zn^{+2}$ y $Hg^{+2}$ (Rutherford y col., 1999) y, NimR de *Haemophilus influenzae* que responde a $Ni^{+2}$ (Kidd y col., 2011).

Los metaloreguladores de esta familia presentan una gran similitud estructural (Brown y col., 2003). Están constituidos por un dominio N-terminal con un motivo hélice-giro-hélice (HTH) alado de unión al ADN conservado entre todos los integrantes de la familia MerR, fundamentalmente en los primeros 60-100 residuos aminoacídicos. Esta región se continúa con una hélice superenrollada tipo "*coiled coil*", responsable de la dimerización, seguida del extremo carboxilo terminal que contiene dos residuos de cisteína (Cys) conservados involucrados en la coordinación del ión metálico y que definen el denominado "rulo de unión a metal" (Figura 1.2) (Changela y col., 2003). Estos reguladores actúan como homodímeros, interaccionando con el ADN en repeticiones invertidas que forman una diada simétrica que se superponen con los elementos -35 y -10 de promotores dependientes del complejo ARN polimerasa-$\sigma^{70}$ o ARN polimerasa-$\sigma^{A}$/$\sigma^{54}$ en bacterias Gram negativas o positivas, respectivamente (Newberry y Brennan, 2004). Además, en estos promotores los elementos -35 y -10 se encuentran separados por 19 o 20 pb (siendo la separación óptima en los reguladores donde actúa $\sigma^{70}$ de 17 ± 1 pb) (Brown y col., 2003).

En general, los reguladores de la familia MerR actúan como activadores transcripcionales. Según el modelo vigente, el regulador interacciona con su sitio blanco tanto en ausencia como en presencia del inductor. En ausencia del inductor, la unión del dímero de MerR curva el ADN, y por lo tanto la subunidad α de la polimerasa permanece unida al elemento -35, pero no logra interaccionar productivamente con el elemento -10, impidiéndose así el inicio de la transcripción (Ansari y col., 1992; Heldwein y Brennan, 2001). La unión del inductor metálico provoca un cambio conformacional en el regulador, resultando en la relajación y desenrollamiento del ADN en la secuencia operadora, a la vez que se reacomodan las cajas -10 y -35 para quedar en una orientación adecuada para ser reconocidas por la ARN polimerasa y dar inicio a la transcripción (Heldwein y Brennan, 2001). Se ha propuesto que la unión permanente del regulador al ADN determina que la respuesta sea rápida frente a variaciones en las concentraciones del inductor (Outten y col., 2001).

Los datos de la estructura cristalográfica de CueR y ZntR unidos al metal efector (Changela y col., 2003) indicaron que estos reguladores unen el metal en la interface del dímero y revelaron que tanto los residuos que componen el rulo de unión al metal de un monómero como los residuos ubicados al inicio de la hélice de dimerización del otro

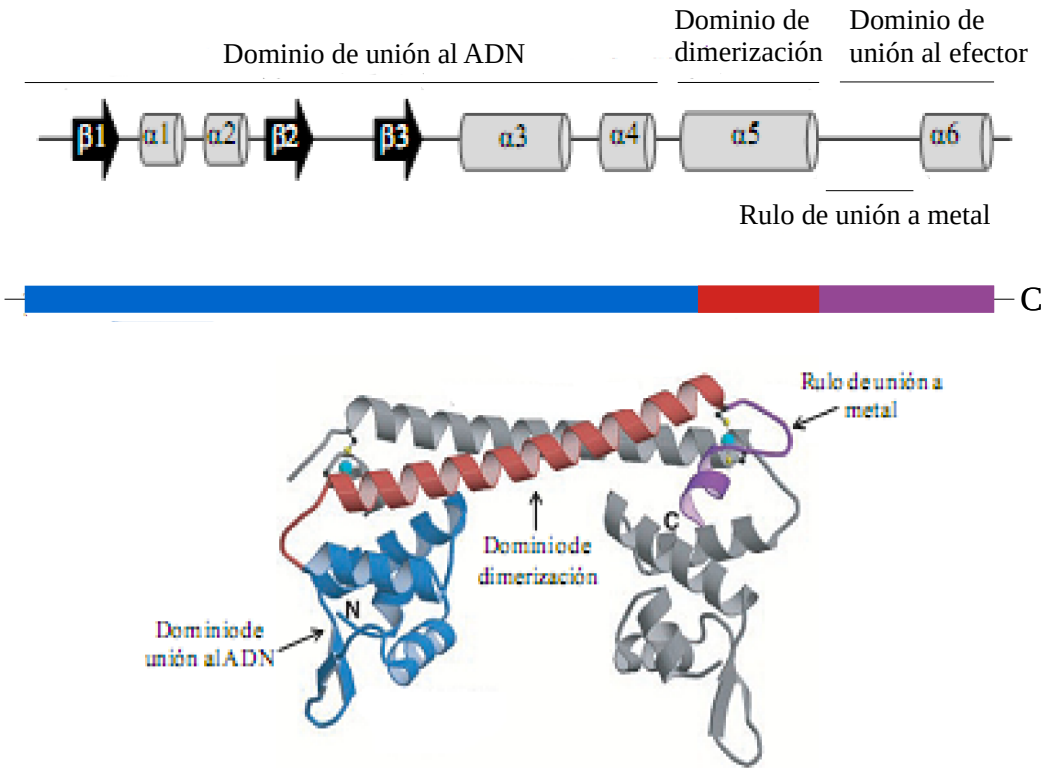



**Figura 1.2. Arquitectura de los reguladores MerR**. Se indican los dominios de unión al ADN, de dimerización y de unión al efector conteniendo el rulo de unión a metal. Con la letra alfa (α) y cilindros se representan las hélices alfa, mientras que flechas con la letra beta (β) a las láminas beta. Se esquematiza con color azul el dominio de unión al ADN, con color rojo el de dimerización y con violeta el de unión al metal. En la figura inferior se esquematiza la estructura del dímero del regulador de cobre CueR de *E. coli* (en color gris se destaca el segundo monómero) unido al ión de cobre (pequeñas esferas azules) (Figura adaptada de Changela y col., 2003).

monómero se encuentran dentro del entorno de coordinación del metal. En CueR solamente los residuos de Cys112 y Cys120, que definen el rulo de unión al metal, coordinan del ión $Cu^{+1}$ en un arreglo linear S-$Cu^{+1}$-S (Changela y col., 2003; Chen y col., 2003). Por el contrario, ZntR utiliza residuos de Cys en posiciones equivalentes a los de CueR (Cys114 y Cys124) y un tercer residuo de Cys al inicio de la hélice de dimerización (Cys79) para coordinar dos atomos de $Zn^{+2}$ en el sitio de unión (Changela y col., 2003). Un análisis comparativo a partir de alineamiento de secuencias de reguladores homólogos a CueR, ZntR y al sensor de mercurio MerR demostraron que aquellos reguladores caracterizados como responsivos a cationes monovalentes, poseen un residuo conservado de serina al inicio de la hélice de dimerización, en la posición 77, mientras que los caracterizados como responsivos a metales divalentes, poseen un

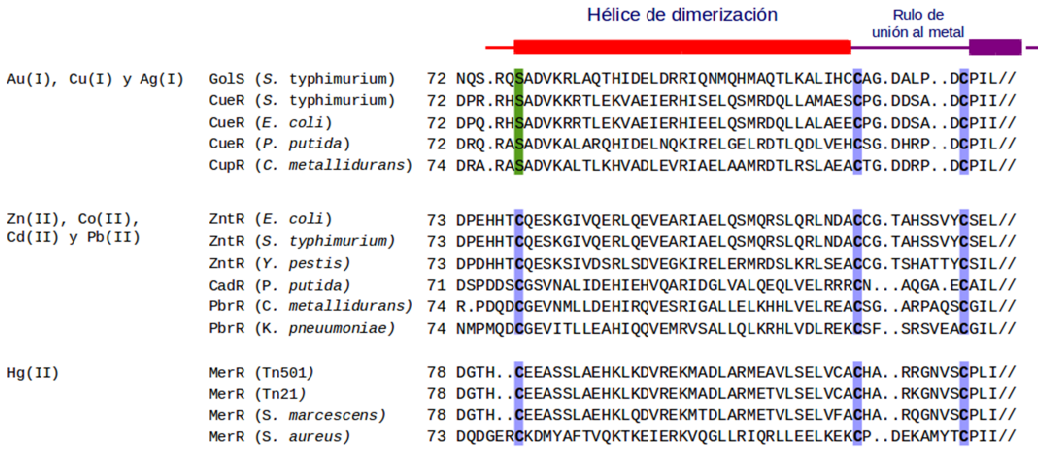



**Figura 1.3.** Alineamiento de las secuencias que abarcan el dominio de dimerización y el rulo de unión de unión al metal de las proteínas reguladoras de la familia MerR. Se resaltan los residuos más significativos para cada grupo. Adaptado de Changela y col., 2003

residuo de cisteína conservado en esta posición (figura 1.3). En base a estos datos y los datos estructurales de CueR y ZntR se postuló que el residuo de Ser77 en CueR y sus homólogos podría jugar un rol crítico en la especificidad hacia cationes monovalentes (Changela y col., 2003). Este residuo que se encuentra en el entorno de coordinación del metal sin participar directamente en la interacción con el mismo, tendría como función primordial estabilizar la coordinación linear S-$Cu^{+1}$-S y conformar un ambiente hidrofóbico propicio para el ión $Cu^{+1}$. Por el contrario, la Cys79 de ZntR provee de un ligando adicional óptimo para la unión de cationes divalentes. En consecuencia, sería la disposición particular del ligandos del sitio de unión al efector lo que determina la especificidad metálica del sensor (Changela y col., 2003).

### b. Sistemas de dos componentes

Los sistemas de dos componentes son ampliamente utilizados por las bacterias para controlar la expresión de genes en respuesta a diferentes señales del medio ambiente y los metales no son la excepción (Galperin, 2006; Wolanin y col., 2002). Estos sistemas constan de una proteína histidina quinasa de membrana interna, que actúa como un sensor y un regulador transcripcional citoplasmático. Cuando la señal se detecta a nivel de la membrana plasmática o el periplasma, el componente sensor se autofosforila en un residuo de histidina conservado utilizando ATP, y transfiere el grupo fosforilo a un residuo de aspartato conservado en el regulador de respuesta. El estado de

fosforilación del regulador afecta a su afinidad por sus promotores blanco, controlando así la expresión génica (Dorel y col., 2006; Ruiz y Silhavy, 2005).

La participación de los sistemas de dos componentes en la regulación de la resistencia o la homeostasis de metales tóxico se conoce desde hace tiempo, en particular, en la regulación de bombas de eflujo del tipo CBA (Mergeay y col., 2003; Nies, 2004), aunque la mayoría de ellos han sido pobremente caracterizados. Tal es el caso del sistema CusRS y PcoRS de detección de cobre de *E. coli* (Munson y col., 2000; Nies, 1999) y el sistema de detección de Ag de *Salmonella*, SilRS (Gupta y col., 1999). En *C. metallidurans* CH34, una bacteria que forma biopelículas sobre gránulos de Au, se han identificado más de 40 quinasas de sensores y reguladores de respuesta putativos, de los cuales se ha caracterizado el sistema de resistencia a Ni y Co, CzcRS (Mergeay y col., 2003; van der Lelie y col., 1997).

Los sistemas de dos componentes no sólo participan en la respuesta específica a determinados metales sino que también son importantes moduladores de las respuesta global al estrés celular producido por metales (Yamamoto y Ishihama, 2005). Tal es el caso de los sistemas BaeSR y CpxRA que se discute en la sección 1.4.1

## 1.3. Mecanismos de resistencia a metales pesados en *Salmonella* Typhimurium.

*Salmonella enterica* subespecie *entericae* serotipo Typhimurium (en adelante *S.* Typhimurium) es un bacilo Gram negativo móvil y anaerobio facultativo que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, que puede causar infecciones tanto en el hombre como en animales (Scaria y col., 2008; Scherer y Miller, 2001). Esta bacteria, junto con *E. coli*, ha servido por años como modelo de estudio de bacterias Gram negativas en general y de patógenos en particular por su capacidad invadir y persistir en células eucariotas (Fàbrega y Vila, 2013; Groisman y Saier 1990). Dado de que se dispone del genoma secuenciado y de una amplia variedad de técnicas genéticas simples para manipularla (McClelland y col., 2001; Ochman y Groisman, 1994), el ciclo infectivo de esta enterobacteria ha sido ampliamente caracterizado a nivel fisiológico y molecular (Fàbrega y Vila, 2013). A diferencia de otras bacterias patógenas, *S. enterica* es capaz de persistir y proliferar en el medio ambiente desarrollando un estilo de vida en el que cicla entre el hospedador- ambiente externo- hospedor (Winfield y Groisman,

2003). En el medio ambiente, esta bacteria es capaz de sobrevivir en cursos de agua, suelos y sedimentos y de adherirse a superficie inertes. Incluso, se han aislado bacterias pertenecientes a esta especie de suelos ricos en metales pesados como Hg, Pb, Co y Cr entre otros (Olukoya y col., 1997). Estos ambientes se caracterizan por una elevada variabilidad térmica, alta osmolaridad, fluctuaciones de pH, baja disponibilidad de nutrientes y la presencia de especies tóxicas (Winfield y Groisman, 2003). La bacteria no sólo encuentra estos cambios drásticos cuando sobrevive en el medio ambiente sino también dentro del hospedador animal. En los últimos años son crecientes las evidencias que indican que sobre todo durante la sobrevida en células fagocíticas la bacteria no sólo es sometida a cambios abruptos de pH y hambreado, sino también a incrementos abruptos en la concentración de Cu dentro de la vacuola que la contiene (Achard y col., 2010; Osman y Cavet, 2011). Estas observaciones evidencian la gran capacidad adaptativa de *Salmonella*, capacidad que debe estar reflejada en su repertorio genético (Winfield y Groisman, 2003).

Se han identificado en *Salmonella* diferentes sistemas de regulación involucrados en la resistencia a metales pesados y metaloides, aunque sólo algunos han sido caracterizados. A continuación se detallan solamente aquellos sistemas involucrados en la resistencia a iones metálicos monovalentes o divalentes que son relevantes para el desarrollo de esta Tesis: aquellos controlados por los metalo-reguladores GolS, CueR y ZntR, todos ellos miembros de la familia MerR detallada en el punto 1.2.4.a

### 1.3.1. Resistencia a iones metálicos monovalentes

Al igual que otras enterobacterias, *Salmonella* emplea los productos del regulón ancestral *cue* controlado por CueR para sobrevivir el estrés por exceso de cobre (Figura 1.4). En presencia de $Cu^{+1}$ en el citoplasma, el regulador CueR activa la expresión de la multicobreoxidasa periplasmática CueO (Kim y col., 2002; Lim y col., 2002) y de la ATPasa de tipo P1B CopA (Espariz y col., 2007), como en la mayoría de las enterobacterias, pero además, de una proteína de unión a Cu de localización periplasmática específica de *Salmonella* denominada CueP (Pontel y Soncini, 2009). CopA contribuye a la eliminación del metal desde el citoplasma hacia el periplasma (Espariz y col., 2007; Osman y col., 2010). Dentro del periplasma, CueO es responsable de la oxidación del catión $Cu^{+1}$ a la forma menos tóxica $Cu^{+2}$ (Espariz y col., 2007; Lim

y col., 2002). Principalmente en anaerobiosis, cuando la oxidasa CueO está inactiva, CueP contribuye a disminuir la toxicidad del metal en el periplasma, actuando como un homólogo funcional del sistema CBA CusABC, ausente en *Salmonella* (Pontel y Soncini, 2009). Si bien se comprobó que CueP es capaz de unir Cu, siendo la principal proteína de unión a Cu en el periplasma (Osman y col., 2010), el mecanismo de detoxificación aún no ha sido dilucidado.

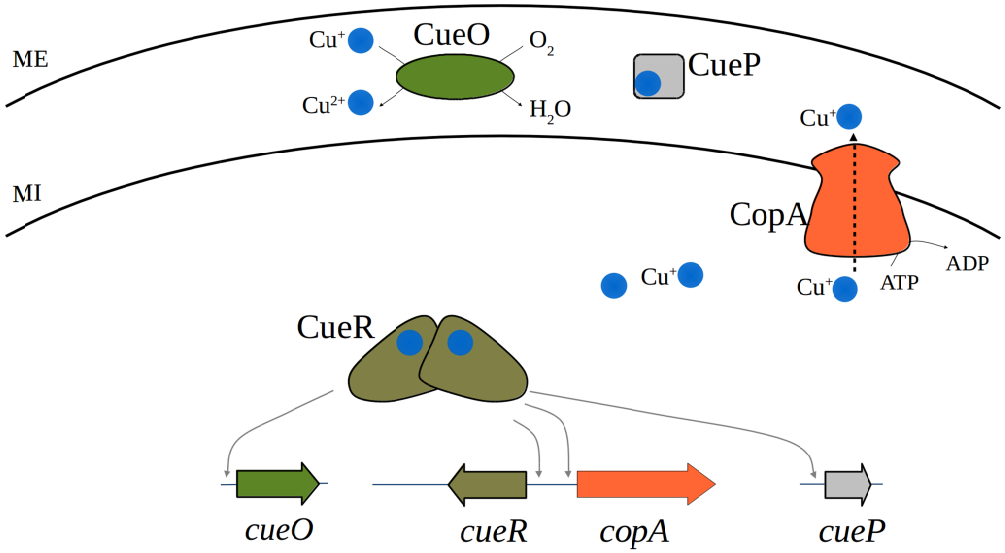



**Figura 1.4. Sistema *cue* de resistencia a cobre en *Salmonella*.** CopA es una ATPasa de tipo PIB que transloca $Cu^{+1}$ desde el citoplasma al periplasma, CueO una multicobre oxidasa que oxida el $Cu^{+1}$ a $Cu^{+2}$ en el espacio periplasmático y CueP es una proteína periplasmática de unión a cobre que confiere resistencia en anaerobiosis. CueR es el regulador citoplasmático que regula la expresión los genes *cueR* y *copA*, que están organizados en orientaciones opuestas en la misma región del genoma, y *cueO* y *cueP* que se encuentran en otras regiones del genoma.

A diferencia de *E. coli* y otras enterobacterias, *S.* Typhimurium cuenta con otro sistema de detección/respuesta a metales monovalentes análogo a CueR, pero que a diferencia de éste, responde selectivamente a oro. Este sistema caracterizado íntegramente en nuestro laboratorio fue el primer sistema de resistencia a sales de oro reportado en bacterias (Checa y col., 2007). El regulador maestro del sistema es GolS, un ortólogo de CueR que es capaz de discriminar $Au^{+1}$ de $Cu^{+1}$ o $Ag^{+1}$ (Checa y col., 2007; Ibáñez y col., 2013; Pérez Audero y col., 2010). GolS se encuentra codificado junto con sus genes regulados en una región genómica de 45 kb presente exclusivamente en *Salmonella*, y que probablemente fue adquirida por transferencia

horizontal de genes (Checa y Soncini, 2011).

El locus *gol* está compuesto por tres unidades transcripcionales organizadas en un divergón, en los operones *gesABC* y *golTS*, y un gen monocistrónico separado, *golB* (Figura 1.5). El operón *gesABC* codifica para el sistema de eflujo tipo CBA, GesABC; el operón *golTS*, para la ATPasa tipo P1B, GolT y el propio regulador del sistema; y *golB*, para una pequeña proteína de unión a metal, aún no caracterizada a la que se denominó GolB. Todos los componentes de este regulón en mayor o menor medida son esenciales para la resistencia a sales de Au (Checa y col., 2007; Pontel y col., 2007).

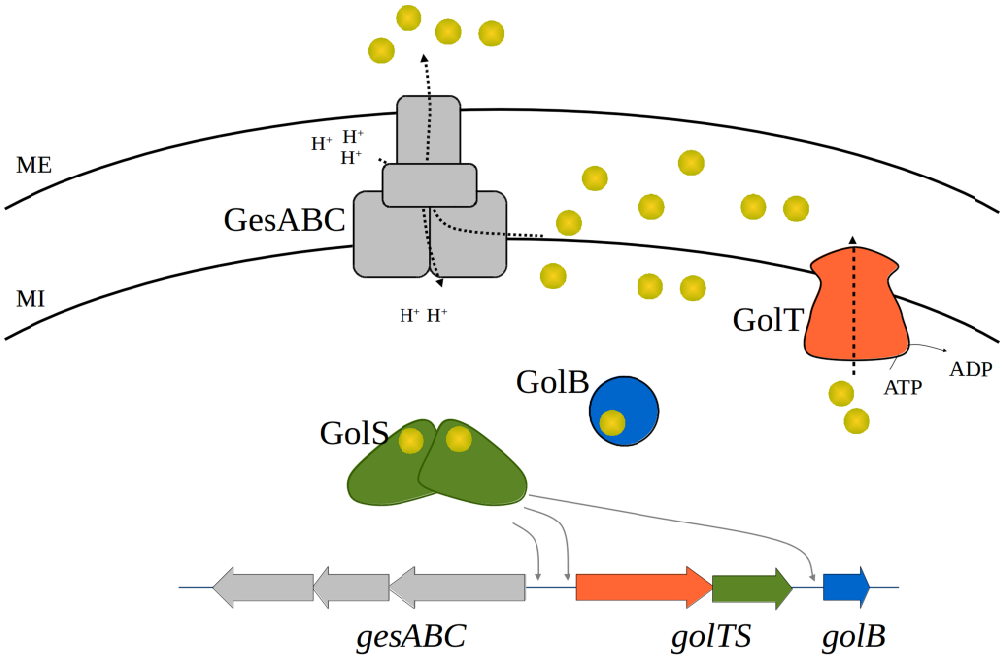



**Figura 1.5. Sistema de resistencia a oro en *Salmonella* Typhimurium.** Representación esquemática de los componentes del sistema *gol* de resistencia a sales de oro. Se muestra el regulador citoplasmático GolS que activa la transcripción de los genes *gesABC*, *golTS* y *golB* en presencia de concentraciones inductoras de oro; la proteína de unión a metal GolB, la ATPasa de tipo PIB GolT y el sistema de eflujo de tipo CBA denominado GesABC que utiliza el gradiente de protones para el eflujo del sustrato (indicado por flechas punteadas)

GolT y GolB, pero no el sistema GesABC, contribuyen también a la resistencia a Cu, aunque este fenotipo sólo se observa en una mutante que carece del transportador CopA (Checa y col., 2007; Espariz y col., 2007; Pontel y col., 2007). De hecho, en el laboratorio se demostró que los genes controlados por GolS se expresan de manera jerárquica, lo que podría tener relación con su función. El operón *golTS* y el gen *golB* se

expresan a muy bajas concentraciones de $Au^{+1}$ en tanto que *gesABC* lo hace sólo a concentraciones más elevadas del metal tóxico (Pontel y col., 2007). Esto nos ha llevado a proponer que GolT y GolB constituyen la primera línea de defensa, eliminado el metal tóxico del citoplasma, en tanto que GesABC sería requerido para la detoxificación en condiciones más extremas (Pontel y col., 2007).

Otra característica llamativa de este sistema de eflujo es que el componente RND, GesB, que es el que determina la especificidad de sustrato de la bomba, comparte mayores niveles de homología con proteínas del grupo HAE1, involucradas en el transporte de drogas y xenobióticos, que con transportadores de metales como CusB de *E. coli*, involucrado en la detoxificación de $Cu^{+1}$ del periplasma (sección 1.2.1.b.). De hecho, en una cepa de *Salmonella* donde el principal transportador de drogas (AcrAB) ha sido delecionado, GesABC puede mediar la resistencia a diferentes agentes antimicrobianos y compuestos químicos cuando es inducido por oro de manera dependiente de GolS o cuando el sistema de eflujo se sobreexpresa desde un plásmido multicopia (Nishino y col., 2006; Pontel y col., 2007).

En *Salmonella*, tanto GolS como CueR controlan promotores que presentan un espaciamiento de 19 pb entre los elementos promotores -35 y -10 con regiones operadoras muy similares sobre todo hacia la región -35. Sin embargo, cada regulador activa selectivamente la expresión de sus genes blanco (Pérez Audero y col., 2010). Por ello, en el laboratorio se investigaron cuáles son las bases nucleotídicas en los operadores así como los residuos de aminoácidos en el dominio de unión al ADN de estas proteínas que determinan esta regulación selectiva (Humbert y col., 2013; Pérez Audero y col., 2010). Por otro lado, se analizaron las bases moleculares que determinan la capacidad de GolS de discriminar $Au^{+1}$ de $Cu^{+1}$ y $Ag^{+1}$ (Checa y col., 2007; Ibáñez y col., 2013). Mediante mutagénesis sitio dirigida, se logró inicialmente acotar a los residuos de aminoácidos que componen el rulo de unión a metal entre la Cys112 y la Cys120, como la región de la proteína responsable de la selectividad metálica (Checa y col., 2007) y posteriormente identificar aquellos residuos que son determinantes de la selectividad (Ibáñez y col., 2013). Como resultado de estos estudios se concluyó que la identidad de los residuos en posición 113 y 118 de GolS son esenciales para que el sensor pueda discriminar $Au^{+1}$ de $Cu^{+1}$ y $Ag^{+1}$. El reemplazo de toda la región del rulo de unión a metal de GolS por el de CueR o solamente el intercambio de los residuos en

posición 113 y 118 genera un sensor no selectivo que responde a cobre de manera similar al sensor CueR (Ibáñez y col., 2013).

Como se mencionó anteriormente, los sensores de cationes monovalentes como GolS y CueR poseen un residuo conservado de serina en la posición 77, mientras que los caracterizados como sensores de cationes divalentes, poseen un residuo de cisteína conservado en esta posición. En nuestro laboratorio, se demostró que el reemplazo del residuo de Ser77 en GolS y CueR por cisteína, contrario a lo esperado, no sólo no afectó la capacidad de reconocer $Au^{+1}$ y $Cu^{+1}$, sino que los sensores mutantes fueron capaces de activar la expresión de sus genes blanco en presencia de $Hg^{+2}$. Más aún, en una mutante que tiene delecionado *zntA*, el gen que codifica para el transportador de $Zn^{+2}$, $Pb^{+2}$ y $Cd^{+2}$, ZntA (Pérez y col., 2006), los sensores mutantes, denominados $GolS_{S77C}$ y $CueR_{S77C}$, fueron capaces de responder también a $Pb^{+2}$, $Cd^{+2}$ y $Zn^{+2}$ (Ibáñez, 2012). Además se observó que la modificación del residuo Ser77 por alanina resultó inocua, pero si se reemplaza por prolina, treonina, ácido glutámico o lisina los sensores son inactivos, indicando que la naturaleza del residuo en esta posición es importante para la funcionalidad de estos reguladores transcripcionales. En base a estos resultados se concluyó que la presencia de un residuo de serina o alanina en posición 77 de GolS y CueR es esencial para la exclusión de los cationes divalentes del sitio de unión al metal, probablemente por un impedimento estérico o de balance de cargas. Sin embargo la presencia de un residuo de cisteína en esta posición llamativamente no modifica la interacción con cationes monovalentes, como sería de esperar. Esto hallazgos conducen a la formulación de nuevas preguntas demostrando que las bases moleculares de la interacción de los metales con los sensores proteicos aún no están completamente dilucidadas (Ibáñez, 2012). Además, el hecho de contar con sensores de metales con un espectro de detección de metales único, ya que no se han identificado sensores que respondan a cationes mono- y divalentes con afinidades aparentemente similares, como los sensores desarrollados, nos posibilitó la concreción de desarrollos tecnológicos que se detallan en el Capítulo II de esta Tesis.

### 1.3.2. Resistencia a iones metálicos divalentes.

*Salmonella* posee genes que codifican para homólogos del regulador ZntR y la ATPasa tipo P1B ZntA, al igual que en otras enterobacterias como *E. coli*. En presencia de exceso de Zn, el regulador ZntR de *E. coli* activa la expresión de la ATPasa ZntA

(Binet y Poole, 2000; Brocklehurst y col., 1999) que además de $Zn^{+2}$ transporta otros metales como $Cd^{+2}$ y $Pb^{+2}$ desde el citoplasma al periplasma (Pérez y col., 2006).

## 1.4. Mecanismos no específicos de resistencia a metales.

Como se mencionó anteriormente, los metales pesados como consecuencia de su reactividad química o por desplazamiento de metales esenciales de sus sitios de unión pueden dañar diferentes componentes celulares. Estos daños pueden ser detectados por sistemas de respuesta al estrés global como aquellos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo como SoxR o al estrés de envoltura como CpxAR (Chiang y Schellhorn, 2012; Yamamoto y col., 2008). A continuación describiremos en detalle el sistema CpxAR por ser objeto de estudio durante esta Tesis (Capítulo III).

### 1.4.1. Sistema de dos componentes CpxAR.

Este sistema de regulación de dos componentes modula la expresión de genes en respuesta al estrés periplasmático (Pogliano y col., 1997). El componente CpxA es la histidina quinasa sensora y CpxR, el regulador de respuesta citoplasmático. Si bien no se han identificado la naturaleza de la señal o las señales detectadas por CpxA, se han identificados varias condiciones que activan al sistema como lo son el pH alcalino a neutro, la sobreexpresión de proteínas de la envoltura tales como NlpE o subunidades P del pilus, alteraciones en la membrana y/o en la síntesis del antígeno común de enterobacterias (Vogt y Raivio, 2012). Además, varios reportes indican que algunos metales como el Cu y el Zn también activan el sistema por mecanismos que aún no ha sido dilucidados (Yamamoto y Ishihama, 2006).

La evidencia acumulada hasta el presente indica que CpxAR controla la expresión de más de 50 genes en *E. coli* (Raivio, 2013). Los primeros miembros descriptos del regulón Cpx codifican para proteínas involucradas en el plegamiento o la degradación de proteínas en la envoltura celular como *degP*, una serina endoproteasa periplasmática; *dsbA,* una disdulfuro oxidoreductasa; y *ppiA*, una peptidil isomerasa A periplasmática (Danese y Silhavy, 1997; Pogliano y col., 1997). Posteriormente otros estudios, condujeron a la identificación de otros miembros del regulón que pueden ser activados o reprimidos por el sistema 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; Jubelin y col., 2005; 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 histidina quinasa, sino también al regulador de respuesta o proteínas accesorias (Buelow y Raivio, 2010). En el caso del sistema de Cpx en *E. coli*, al menos cuatro proteínas en diferentes compartimentos celulares participan en la detección de las diferentes señales: en la membrana externa, la lipoproteína 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 (Fig.1.6).

NlpE se identificó por primera vez como un supresor de la toxicidad de la proteína de fusión de la envoltura LamB-LacZ-PhoA (Snyder y col., 1995), y su expresión está regulada por CpxR (Danese y Silhavy, 1997). En el año 2002, Otto y Silhavy demostraron que NlpE activa el sistema CpxR en respuesta a la adhesión a superficies hidrofóbicas (Otto y Silhavy, 2002). Estudios posteriores indicaron que esta proteína accesoria no está implicada en la detección de otras señales que activan el sistema Cpx como pH alcalino o el estrés generado por la sobreexpresión de la subunidad de P del pilus (DiGiuseppe y Silhavy, 2003). Si bien, estos estudios indican que NlpE está implicado en la detección de señales, cómo la señal detectada por NlpE se transmite a CpxA es aún es motivo de discusión.

La proteína periplasmática CpxP inhibe la actividad de la vía Cpx cuando se sobreexpresa, 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

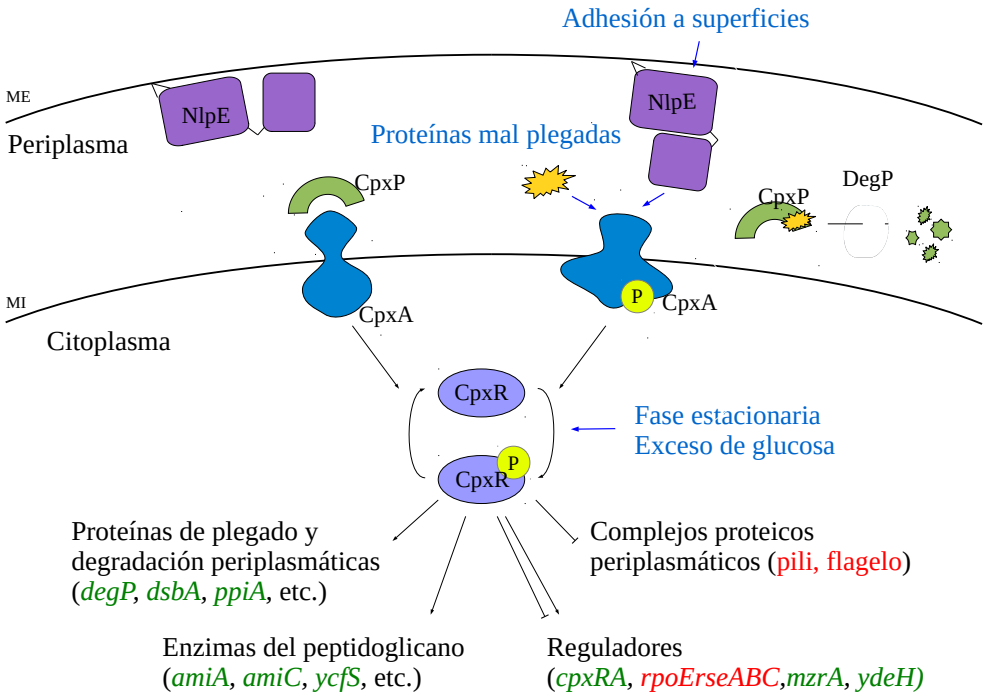



**Figura 1.6. Descripción general de la vía de Cpx en *Escherichia coli.*** En condiciones no inductoras (lado izquierdo del diagrama), la histidina quinasa de membrana interna (MI) CpxA actúa como una fosfatasa del regulador de respuesta CpxR, manteniéndolo desfosforilado y por lo tanto inactivo. CpxP 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 autoquinsa 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.

papel de CpxP en la señalización es poco conocido. De hecho, mutantes en *cpxP* conservan su capacidad de detectar señales tales como la sobreexpresión NlpE, el pH alcalino, la sobreexpresión de PapE y PapG, y otros tipos de estrés (DiGiuseppe y Silhavy, 2003; Raivio y col., 1999).

El dominio periplasmático de la histidina quinasa CpxA, si bien actúa como sensor de algunas señales como pH alcalino y la sobreexpresión de PapE y PapG (DiGiuseppe y Silhavy, 2003), es también el punto de integración de señales detectadas a través NlpE (Raivio y Silhavy, 1997) y CpxP (Raivio y col., 1999). Si bien la forma en que este motivo detecta las distintas señales se desconoce, al igual que en otros sistemas de dos componentes, la detección de la señal es traducida a través de la

membrana interna al dominio quinasa que lleva a cabo la transferencia de un grupo fosfato al regulador de respuesta CxpR (Fleischer y col., 2007). El regulador CpxR también puede activarse independientemente de CpxA en respuesta a señales relacionadas con el crecimiento y el metabolismo central. Por ejemplo, se ha reportado que la expresión de *cpxR* en *E. coli* se activa al inicio de la fase estacionaria (De Wulf y col., 1999), y que esta activación relacionada con la fase de crecimiento es dependiente de CpxR pero independiente de CpxA (DiGiuseppe y Silhavy, 2003). CpxR también se puede activar de forma independiente de CpxA cuando las células se cultivan en presencia de exceso de fuentes de carbono, tal como la glucosa o la piruvato (Wolfe y col., 2008). Se postula que esta activación está mediada por la vía Pta-ackA, que genera acetil fosfato a partir de acetil-CoA (Wolfe y col., 2008). De hecho, el acetil fosfato puede fosforilar CpxR *in vitro* (Pogliano y col., 1997; Raivio y Silhavy, 1997) y, bajo determinadas condiciones de crecimiento, *in vivo* (Lima y col., 2011; Wolfe y col., 2008).

Dependiendo del gen blanco, CpxR puede actuar como activador o represor (Price y Raivio, 2009). En un estudio comparativo realizado por Price y Raivio en 2009, en donde se caracterizó una biblioteca de expresión de genes regulados putativamente por CpxA/R en *E. coli*, se demostró que la orientación con respecto al sitio de inicio de la transcripción y el grado de consenso del sitio de unión CpxR, previamente determinado como GTAAA-$N_{4-8}$-GTAAA (Yamamoto y Ishihama, 2006), no influyen en la regulación. Sin embargo, la ubicación del sitio de unión de CpxR, si es importante. 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 CpxAR. Así, la mitad de los promotores que mostraron una fuerte regulación CpxAR-dependiente, contiene un sitio de unión CpxR consenso que se orienta en una dirección directa en relación con la transcripción GTAAA-$N_{4-8}$-GTAAA, mientras que la otra mitad tienen sitios de unión CpxR orientadas en la orientación inversa, TTTAC-$N_{4-8}$-TTTAC. Además, varios de estos genes tienen sitios de unión 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 al sitio de unión consenso CpxR, GTAAA-$N_{(4-8)}$-GTAAA, tampoco parece ser predictivo (Price y Raivio, 2009).

En la mayoría de los casos, CpxR actúa como un modulador transcripcional actuando en conjunto con otros reguladores para controlar la expresión de los genes. Por ejemplo, se ha demostrado que para la expresión de los transportadores del tipo CBA *mdtA* y *acrD* y para la porina *ompC*, CpxR actúa como corregulador. 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). Ensayos de protección a la digestión por ADNasa I sobre estos genes, indican que CpxR se unen a grandes regiones corriente arriba de los sitios de inicio de la transcripción y en todos los casos el sitio de unión se superpone parcialmente con el de activador principal. Por otro lado, se ha demostrado que CpxR es capaz de afectar negativamente la transcripción de *csgB*, *csgD*, *ompF* y *papB*. CpxR se une cooperativamente a múltiples sitos de la región promotora de *csgB* y *csgF* (Ogasawara y col., 2010). En el caso de *csgD*, el activador OmpR se une a un único sitio en el promotor, mientras que CpxR se une cooperativamente a múltiples sitios formando un complejo ADN-proteína de muy poca movilidad electroforética. Se desconoce si en este caso el efecto negativo de CpxR sobre la expresión de *csgD* se debe a que previene el reclutamiento de la ARN polimerasa o genera una perturbación en la unión de OmpR (Ogasawara y col., 2010). Para el caso de *ompF*, los ensayos de protección a la digestión por ADNasa I indican que en el promotor de este gen, CpxR cubre una amplia región del mismo, superponiéndose con los cuatro sitios de unión de OmpR. Estas evidencias sugieren que en algunos casos CpxR se une a grandes regiones de ADN a través de múltiples sitios y que modula la acción de otros reguladores, sean estos activadores o represores.

En relación al papel de sistema CpxAR en la resistencia a metales, se demostró que una mutante delecionada en el operón *cpxRA*, es más sensible a cobre y zinc que una cepa silvestre de *E. coli* (Yamamoto y Ishihama, 2006). Además, estudios de transcriptómica global revelaron la activación de al menos 14 genes de *E. coli* pertenecientes al regulón CpxAR (*aroG*, *cpxP*, *ftnB*, *htrA*, *ppiA*, *spy*, *ybaJ*, *yccA*, *ycdN*, *ycfS*, *ydeH*, *yebE*, *yihE* e *yqjA*, la mayoría de función desconocida) en presencia de Cu y que esta activación depende de CpxRA (Pogliano y col., 1997; Yamamoto y Ishihama, 2005; Yamamoto y Ishihama, 2006). Por otro lado, la observación de que una mutante de *E. coli* deficiente en NlpE es más sensible a Cu que la cepa silvestre (Gupta y col.,

1995) y que el dominio N-terminal de NlpE contiene un motivo CXXC, característico de proteínas de unión a Cu (Robinson y Winge, 2010) sugiere que esta proteína podría estar implicada en la activación del sistema Cpx en presencia de Cu (Hirano y col., 2007). Por su parte también se ha demostrado la inducción de *cpxP* así como también el sistema de eflujo *mdtABC*, que se encuentra modulado por el sistema CpxAR, mediante análisis de transcriptómica global de *E. coli* en presencia de Zn (Lee y col., 2005)

## 1.5. Detección de contaminación por metales.

### 1.5.1. Métodos analíticos.

El análisis químico de la contaminación debida a metales es un enfoque directo con alta sensibilidad (en el rango de ppb o ppm), selectividad, exactitud y reproducibilidad (Robbens y col., 2010). Dependiendo de la matriz de la que proviene la muestra (suelo, agua, etc.), técnicas analíticas tales como espectroscopía de gas acoplado a espectroscopía de masa (GC-MS), cromatografía líquida acoplado a espectroscopía de masa (LC-MS), espectroscopía de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), espectrometría de absorción atómica (AAS), y espectroscopía de fluorescencia atómica (AFS), entre otras, son exitosas a la hora de detectar e identificar distintas especies metálicas en concentraciones de relevancia ambiental (Leopold y col., 2010). Sin embargo, y sobre todo si se quieren utilizar para determinar el riesgo real sobre el ecosistema, estos métodos adolecen de una serie de desventajas. En primer lugar, el análisis químico sólo determina la cantidad total de un contaminante presente en una muestra, pero no indica la fracción biodisponible y/o su efecto biológico sobre los sistemas vivos. Además, estas técnicas analíticas requieren instrumental costoso y personal especializado. Por esta razón, surge la necesidad de desarrollar nuevos métodos para la detección de contaminantes que sean más accesibles, pero que sobre todo tengan en cuenta no sólo la biodisponibilidad, sino también los posibles efectos sinérgicos o antagónicos entre múltiples contaminantes presentes en la muestra, ofreciendo así una mejor estimación de la toxicidad real de una muestra. En los últimos años se ha comenzado a desarrollar una serie de dispositivos basados en los sistemas de resistencia a metales de bacterias que se adaptan muy bien a estos requerimientos (Robbens y col., 2010).

### 1.5.2. Biosensores.

Un biosensor es un sistema de detección biológico capaz de reconocer un compuesto químico o un cambio físico, y producir una señal fácilmente medible (Wilson y Ammam, 2007). Desde el primer biosensor reportado hace más 20 años para la detección de naftaleno (King y col., 1990), este tipo de tecnología se ha convertido en un área de investigación y desarrollo que ha crecido mucho en los últimos años (Tecon y Van der Meer, 2008). Se han desarrollado biosensores que detectan una gran variedad analitos estructuralmente diversos, entre ellos metales y metaloides (Tecon y Van der Meer, 2008; Wanekaya y col., 2008; Wilson y Ammam, 2007). De acuerdo al elemento de reconocimiento biológico utilizado, los biosensores se clasifican en celulares, si usan células vivas; o moleculares, si utilizan componentes celulares aislados como proteínas, DNA, antígenos o membranas. Según el método de transducción de la señal acoplado, se clasifican en ópticos, electroquímicos o térmicos (Tecon y Van der Meer, 2008).

Los biosensores moleculares tienen grandes ventajas como su alta especificidad, selectividad y rapidez en el tiempo de reacción. Sin embargo, estos sistemas no proveen información funcional como la toxicidad real sobre los organismos vivos del analito sensado, y son costosos porque requieren el aislamiento y extracción de la macromolécula sensora, que en general posee un tiempo de vida media corto (Daunert y col., 2000). Por su parte, los biosensores celulares son estables y en general toleran variaciones de pH y temperatura. Su mayor ventaja es su capacidad de proveer información fisiológicamente relevante del analito, como la biodisponibilidad y toxicidad del mismo (Gu y col., 2004; Wanekaya y col., 2008). Entre ellos, los biosensores bacterianos son los más comúnmente usados, debido a la posibilidad de manipularlos genéticamente para acoplar la detección de la señal a la producción de una proteína reportera apropiada (Tecon y Van der Meer, 2008).

*Escherichia coli* ocupa un lugar prominente entre los microorganismo utilizados en el diseño de biosensores, no sólo por ser la bacteria mejor estudiada, sino que además porque existe una amplia variedad de cepas de este microorganismo y se dispone de numerosas herramientas genéticas para su manipulación. Además, *E. coli* tiene un crecimiento rápido y alcanza altas densidades en medios artificiales relativamente simples (Buchinger y col., 2010; Robbens y col., 2010). Esto posibilita el desarrollo de ensayos miniaturizados, así como el diseño de instrumentos portátiles (Melamed y col.,

2012; van der Meer y Belkin, 2010). En la última década, la aplicación de conceptos de biología sintética para el diseño de biosensores ha mejorado el desempeño y ampliado el rango de aplicación de estos dispositivos (Khalil y Collins, 2010; Marchisio y Rudolf, 2011; Zhang y Keasling, 2011)

Las proteínas reporteras más comúnmente usadas en el desarrollo de biosensores bacterianos son la proteína verde fluorescente (GFP, del inglés ***g***reen ***f***luoescent ***p***rotein), la luciferasa (tanto bacteriana como de luciérnaga) y la β- galactosidasa (tabla 1.1). La cantidad o la actividad de la proteína indicadora producida debe guardar relación directa con la cantidad de analito presente en la muestra así como con la respuesta celular neta cuando el compuesto alcanza concentraciones tóxicas.

GFP es una proteína de 238 aminoácidos que se ha aislado de coelenterados tal como *Aequoria victoria* (Morin y Hastings, 1971). El fluoróforo que provee la señal se genera internamente en la proteína como resultado de modificaciones postraduccionales en tres aminoácidos internos. Esta proteína fluorescente presenta dos picos de excitación, uno máximo a 395 nm y otro menor a 475 nm; y un pico máximo de emisión a 508 nm (Cubitt y col., 1995).

**Tabla 1.1. Proteínas reporteras**

| Proteína reportera | Reacción catalizada | Método de detección |
|---|---|---|
| Proteína verde fluorescente | Generación postranduccional de un cromóforo interno | Fluorescencia |
| Luciferasa bacteriana | $FMNH_2$ + R-CHO → FMN + $H_2O$ + RCOOH + luz (490 nm) | Bioluminiscencia |
| Luciferasa de luciérnaga | D-luciferina + $O_2$ + ATP → oxiluciferina + AMP + PPi + luz (560 nm) | Bioluminiscencia |
| β-galactosidasa | Hidrólisis de β-galactósidos | Colorimétrico, histoquímico, fluorescencia, electroquímico, quimioluminiscente |

Una gran ventaja de GFP respecto a otros reporteros para la generación de biosensores es que no requiere la adición de sustrato alguno para las determinaciones. Además, es estable a pH biológico y no existen homólogos endógenos en la mayoría de los sistemas. Sin embargo, cuando se la utiliza como reportero para la cuantificación de

un analito, presenta algunos problemas, ya que a bajas concentraciones de analito, la cantidad de reportero producido es baja y la autofluorescencia celular puede interferir con las determinaciones (Hakkila y col., 2002).

Por otra parte, las luciferasas son enzimas que emiten luz como producto de la reacción que catalizan y se encuentran en varios organismos (Meighen y col., 1993). Las luciferasas bacterianas (Lux) como la del genero *Vibrio* catalizan la oxidación de flavina mononcleótido reducida ($FMNH_2$) y un aldehído de cadena larga producido intracelularmente (R-CHO) a FMN y el ácido graso correspondiente (R-COOH) en presencia de oxígeno molecular (Tabla 1.1). Esta reacción da como resultado la emisión de luz verde-azul con un máximo de intensidad a 490 nm (Meighen y Dunlap, 1993). Los genes para la síntesis y el reciclaje del aldehído de cadena larga usado como sustrato se encuentran codificados en el mismo locus génico que los genes que codifican para la enzima, por lo que no se requiere la adición de sustrato externo para generar la señal. La enzima clonada de *Photinus pyralis* (luciérnaga), codificada por el gen *lucFF* (del inglés *f*ire*f*ly luciferase) es otra luciferasa ampliamente utilizada que requiere de la adición del sustrato D-luciferina para generar la señal (Tabla 1.1). Si bien estos reporteros responden en un amplio rango de detección, requieren un ambiente aeróbico y ATP para cumplir su función (Daunert y col., 2000; Naylor, 1999).

Por último, la enzima *β*-galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, ha sido también muy utilizada para el desarrollo de biosensores. Entre las ventajas de esta proteína se encuentran su estabilidad y su aplicabilidad en ambientes anaeróbicos. Sin embargo, su uso requiere la adición de un sustrato para la determinación de actividad, lo que encarece los costos. Hoy existen una variedad de sustratos para esta enzima que proveen señales detectables por métodos colorimétricos, histoquímicos, fluorescentes, luminiscentes, y electroquímicos, aunque la sensibilidad varía según el sustrato utilizado (Daunert y col., 2000).

#### 1.5.2.1 Biosensores bacterianos para la detección de metales.

Para la detección de metales se han desarrollado tanto biosensores bacterianos como moleculares. Muchos de estos diseños se basan en metalo-reguladores de la familia MerR, que son capaces de detectar una amplia variedad de metales con muy buena sensibilidad. En la década anterior, se diseñaron biosensores moleculares basados

en el sensor de $Cu^{+1}$ CueR, el sensor de $Pb^{+2}$ PbrR y el sensor de $Hg^{+2}$ MerR (Chen y col., 2005; Chen y He, 2003). Estos dispositivos acoplan la capacidad de los reguladores MerR de distorsionar el ADN en presencia del metal y romper el apareamiento entre las bases en el centro de la secuencia de reconocimiento del regulador para generar una señal fluorescente a partir de pirrolo-C, una base análoga a citosina, o el colorante pireno, compuestos que emiten fluorescencia cuando el apareamiento de bases del DNA se distorsiona (Chen y He, 2008).

Se han desarrollado además numerosos biosensores bacterianos para detectar metales o metaloides en muestras del medio ambiente que también se basan en los mecanismos que estos microorganismos utilizan para defenderse del estrés metálico en la naturaleza. En la mayoría de los diseños actuales, la bacteria se modifica genéticamente a fin de que la síntesis *de novo* de la proteína reportera esté controlada a nivel transcripcional por un regulador (activador o represor) cuya actividad responde a la señal de interés (Checa y col., 2012). La función de detección de la señal puede ser provista por el mismo factor de transcripción que posee un dominio específico para la unión del efector (figura 1.7) como es el caso de los metaloreguladores MerR; o por otra proteína sensora localizada en la membrana plasmática o el periplasma que transmite la señal a través de una cascada de transducción al regulador transcripcional localizado en el citoplasma (sistemas de dos componentes). Los eventos de sensado son luego traducidos y amplificados en la síntesis de la proteína reportera, cuya actividad o cantidad son las que se determinan (Tecon y Van der Meer, 2008). Si bien estos dispositivos son económicos y fáciles de utilizar y proveen información directa sobre el riesgo sobre el ecosistema y el hombre, ya que reportan sólo la fracción del metal que se encuentra biodisponible (Gu y col., 2004), su uso extensivo se ha visto demorado sobre todo debido a la baja sensibilidad y su difícil aplicación a ciertos tipos de muestra complejas, por lo que se requiere su optimización (Melamed y col., 2012; van der Meer y Belkin, 2010) .

En la tabla 1.2 se resumen los biosensores de metales y metaloides desarrollados a la fecha. La mayoría está dirigido al reconocimiento de Hg o As, aunque también se han desarrollado otros que permiten la determinación de Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn (Harms, 2007). Algunos biosensores son específicos para un determinado metal, mientras que otros detectan también otros metales relacionados. La selectividad del

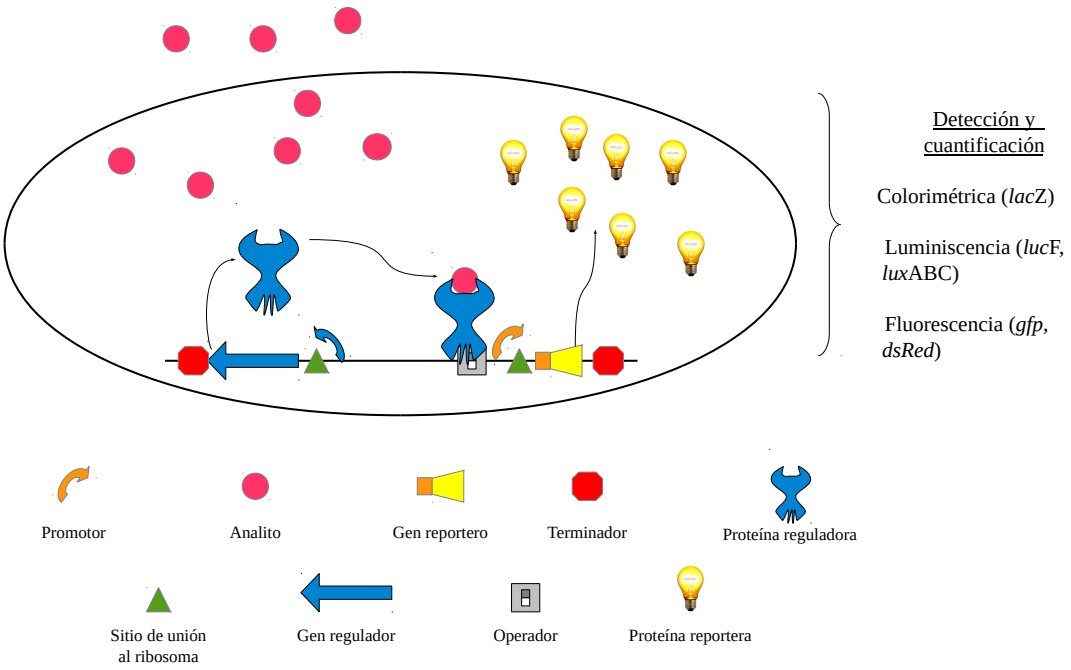



**Figura 1.7. Esquema de un biosensor bacteriano típico.** Sistema en el que la detección de la señal está provista por una proteína regulatoria que se une a su compuesto blanco en el citoplasma e induce expresión de un gen reportero. Se muestran los elementos de ADN y proteínas necesarios para la construcción de un biosensor y los métodos de detección. *Adaptado de Tecon y van der Meer, 2008.*

sistema está en general determinada por el componente sensor del sistema. Por ejemplo, en los biosensores luminiscentes de Cu, en los que la detección de la señal está provista por la proteína CueR de *E. coli* que no es selectiva para cobre, el reportero bajo el control del promotor de *copA* controlado por CueR se induce también en presencia de Ag y Au (Hakkila y col., 2004; Stoyanov y Brown, 2003).

En otros casos, aunque el biosensor es selectivo para un determinado metal, éste se ha construido mediante inserciones al azar de transposones y se desconoce el mecanismo por el cual se detecta el metal (Gu y col., 2004). Tal es el caso de un biosensor bioluminiscente específico de Cu desarrollado en cepas de *Pseudomonas fluorescens* (Nybroe y col., 2008; Tom-Petersen y col., 2004). No obstante estas dificultades, la mayoría de los diseños han demostrado ser útiles en la determinación de metales y metaloides en muestras proveniente de diferentes matrices, como suelo o agua, que han sido modificadas artificialmente (Brandt y col., 2008; Ivask y col., 2009).

**Tabla 1.2**. Biosensores bacterianos que detectan metales

| Metal | Operador | Organismo | Gen reportero | Tiempo de inducción | Concentración | Referencias |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $Al^{3+}$, $Cu^{2+}$, $Fe^{3+}$, $Ni^{2+}$ | ***fliC*** | ***E. coli*** | ***luxAB*** | 20 min | 40–400 μM | (Guzzo y DuBow, 1991; Guzzo y col., 1992) |
| $AsO_2^-$, $AsO_4^{3-}$ | ***Ars*** | ***E.coli*** | ***lacZ*** | | 5–10 μg/ L | (Diorio y col., 1995) |
| $AsO_2^-$, | ***Ars*** | ***E.coli*** | ***luxAB*** | 2 h | ≥ 10 μg/L | (Cai y DuBow, 1996) |
| $AsO_2^-$, $SbO_2^-$, $Cd^{2+}$ | ***Ars*** | ***Staphylococcus*** | ***lucFF*** | 2 h | ≥ 100 nM, ≥ 33 nM, | (Tauriainen y col., 1997) |
| $SbO_2^-$, $AsO_2^-$ | ***Ars*** | ***E. coli*** | ***luxAB*** | 30 min, 3 h | 1 fM – 10 nM, 1 fM – 10 nM | (Ramanathan y col., 1997) |
| $AsO_2^-$, $AsO_4^{3-}$ | ***arsR*** | ***E. coli*** | ***luxAB*** | 1 h | 50 nM – 1 μM | (Stocker y col., 2003) |
| $AsO_2^-$, $AsO_4^{3-}$ | ***arsR*** | ***E. coli*** | ***lacZ*** | 1 h | 100 nM – 1 μM | (Stocker y co***l***., 2003) |
| $AsO_2^-$, $AsO_4^{3-}$ | ***arsR*** | ***E. coli*** | ***gfp*** | 1 h | ≥ 100 μM | (Stocker y co***l***., 2003) |
| $AsO_2^-$, $AsO_4^{3-}$, $SbO_2^-$ | ***arsR*** | ***S. aureus*** | ***gfp*** | 8 h, 8 h, 8 h | ≥ 0,1 μM, ≥ 0,1 μM, ≥ 0,1 μM | (Liao y Ou, 2005) |
| $Cd^{2+}$ | ***cad*** | ***S. aureus, E. coli*** | ***luxAB*** | 60 min - 2 h | 0,5-100 μM | (Corbisier y col., 1993) |
| $Cd^{2+}$, $Pb^{2+}$, $SbO_2^-$, $Sn^{2+}$, $Zn^{2+}$ | ***cadC*** | ***S. aureus*** | ***lucFF*** | 2 h | ≥ 3,3 nM, ≥ 33 nM, ≥ 1 nM, ≥ 100 μM, ≥ 1 μM | (Tauriainen y col., 1998) |
| $CrO_4^{2-}$, $Cr_2O_7^{2-}$, $Cr^{3+}$ | ***chrA*** | ***C. metallidurans CH34*** | ***luxCDABE*** | 60 min – 2 h | 1 – 50 nM | (Peitzsch y col., 1998) |
| $Cu^{2+}$, $Ag^+$, $Au^+$ | ***copA*** | ***E. coli*** | ***luxCDABE*** | 60 -100 min | 1 – 30 μM | (Riether y col., 2001) |
| $Cu^{2+}$, $Ag^+$, $Au^+$ | ***copA*** | ***E. coli*** | ***lucFF*** | 60 -100 min | 0,7 μM– 1mM, 4 – 30 nM | (Hakkila y col., 2004) |
| $Fe^{3+}$ | ***isiAB*** | ***Synechococcus sp*** | ***luxAB*** | 2 h | 10 nM – 1μM | (Durham y col., 2002) |
| Fe | ***alr0397*** | ***Nostoc sp*** PCC 7120 | ***luxAB*** | 12 h | 10-18 – 10-21 M | (Zha y col., 2012) |
| $Hg^{2+}$ | ***mer*** | ***E. coli Tn21*** | ***luxAB*** | 5 min | 50 – 200 nM | (Condee y Summers, 1992) |
| $Hg^{2+}$ | ***merT*** | ***E. coli Tn21*** | ***luxCDABE*** | 100 min | 0,5 nM – 1 μM | (Selifonova y col., 1993) |
| $Hg^{2+}$, $Cd^{2+}$ | ***merT*** | ***E. coli Tn21*** | ***lucFF*** | 60 min | 0,1 fM - 1 μM | (Lampinen y col., 1995) |
| $Hg^{2+}$ | ***mer*** | ***E. coli Tn21*** | ***luxCDABE*** | 80 min | ≥ 0,5 μg/L | (Hansen y Sorensen, 2000) |
| $Hg^{2+}$ | ***merR*** | ***E. coli Tn21*** | ***lacZ*** | 4 h | ≥ 0,5 μg/L | (Hansen y co***l***., 2000) |
| $Hg^{2+}$ | ***merR*** | ***E. coli Tn21*** | ***gfp*** | 16 h | ≥ 25 μg/L | (Hansen y co***l***., 2000) |
| $Ni^{2+}$ | ***celF*** | ***E. coli*** | ***luxAB*** | 3 h | 1 – 50 ppm | (Guzzo y DuBow, 1994) |
| $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$ | ***cnrR*** | ***C. metallidurans*** | ***lacZ*** | 30 min – 2 h | 50 μM | (Grass y col., 2000) |
| $Zn^{2+}$ | ***smtA*** | ***Synechococcus sp*** | ***lacZ*** | 2h | 12 μM | (Huckle y col., 1993) |
| $Zn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Cd^{2+}$ | ***smtA*** | ***Synechococcus sp*** | ***luxCDABE*** | 4 h | 0,5 – 4 μM | (Erbe y col., 1996) |
| $Zn^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Pb^{2+}$ | ***zntA*** | ***E. coli*** | ***luxCDABE*** | 60 – 100 min | 1 – 30 μM, | (Riether y col., 2001) |

De hecho, la mayoría de los biosensores de metales pesados pueden detectar concentraciones por debajo del límite de eguridad en el agua potable (Ripp y col., 2011).

Como parte de mi trabajo de Tesis de Grado de la Licenciatura en Biotecnología en el laboratorio, comenzamos el desarrollo de un biosensor bacteriano específico para la detección de iones oro. Para ello, generamos un plásmido reportero que lleva el gen *gfp* de *Aequorea victoria* bajo el control del promotor del gen *golB*, controlado por GolS, utilizando como vector el plásmido de amplio rango de hospedador y mediano número de copia pPROBE-NT (Miller y col., 2000). Este plásmido, al que denominamos PgolB-gfp, fue introducido en las cepas de *S.* Typhimurium 14028s y mutantes en los reguladores *golS* y *cueR* para verificar la expresión del reportero dependiente de GolS. Verificamos la respuesta específica a la presencia de $AuHCl_4$ tanto en medio líquido a concentraciones fijas de metal como en medio sólido por ensayos de difusión del metal en placas. En presencia de 1 μM AuHCl4, la expresión del reportero se indujo mas de 400 veces, en tanto que la respuesta a metales con propiedades fisicoquímicas similares como Cu o Ag, fue muy pobre, menor de 10 veces), y no se observó inducción en respuesta a otros metales como Hg, Pb, Cd, Zn o Fe. (Cerminati, 2009). Estos resultados sentaron las bases para el desarrollo del primer biosensor bacteriano específico para la detección de iones oro, que se desarrolla en el Capítulo I de esta Tesis.

# 2. Objetivos

En este trabajo de Tesis, nos propusimos como Objetivo General avanzar en la caracterización de los componentes del sistema de resistencia a sales de oro *gol* de *S.* Typhimurium, centrando principalmente nuestra atención en el sensor de metales GolS y el sistema de eflujo GesABC y utilizar este sistema de regulación como plataforma en el desarrollo herramientas biotecnológicas de detección de metales pesados. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la eficiencia de reporteros fluorescentes basados en el sistema de resistencia a Au *gol* construidos previamente para la detección específica de Au en muestras complejas y generar biosensores bacterianos que, calibrados en condiciones de laboratorio, presenten parámetros de detección adecuados para su aplicación potencial en el campo de la minería.

- Evaluar la utilización de variantes del sensor GolS que presentan un amplio espectro para la detección de metales pesados en la generación de biosensores bacterianos y optimizar la utilización de estos dispositivos para el monitoreo rápido de la presencia de metales tóxicos en muestras de agua.

- Evaluar la participación de otros sistemas de regulación para modular la expresión del sistema de eflujo GesABC y su relevancia en la defensa contra el estrés.

# 3. Materiales y Métodos

## 3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos.

Las cepas y plásmidos empleados en esta Tesis se detallan en la Tablas 3.1 y 3.2, respectivamente. La secuencia de todas las cepas y plásmidos fueron confirmadas por secuenciación. Los oligonucleótidos que fueron utilizados para la generación de mutantes, el clonado de las regiones específicas, ensayos de retardo de la movilidad electroforética y de huella dactilar con ADNasa I se detallan en la Tabla 3.3. 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 ºC hasta su utilización. Para las reacciones de PCR se realizaron diluciones de los oligonucleótidos hasta alcanzar una concentración de 5 µM y se guardaron a -20 ºC.

**Tabla 3.1. Cepas utilizadas**

| Cepa | Genotipo relevante | Referencia |
|---|---|---|
| | ***Escherichia coli*** | |
| DH5α | F-Z-(tp8OlacZAM15)*endA*1 *recA*1 *supE*44 *thi*-1 *gyrA*96 *hsdrl*7 *relalA* (*lacZYA-argF*)U169 | (Sambrook y col., 1989) |
| MC1061 | *hsdR*2 *hsd*M$^+$ *hsdS*$^+$ *araD*139 Δ(*ara-leu*)7697 Δ(*lac*)X74 *galE*15 *galK*16 *rpsL* (Str$^R$) *mcrA* *mcrB1* | (Casadaban y Cohen, 1980) |
| W3110 | F- λ- *rph*-1 INV(*rrnD*, *rrnE*) | (Bachmann, 1972) |
| XL1-blue | *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*[F´, *proAB*$^+$, *lacIq*, *lacZ*, Δ*::*Tn10(Tet$^R$)] | Stratagne |
| PB8873 | MC1061 *golS*$^+$ -Cm$^R$ | Este trabajo |
| PB9452 | MC1061 *golTS*$^+$*golB*$^+$-Cm$^R$ | Este trabajo |
| PB10338 | MC1061 *zntA*::Km$^R$ | Este trabajo |
| PB10375 | MC1061 Δ*zntA* | Este trabajo |
| PB10380 | MC1061 *golTS*$_{S77C}$$^+$Cm$^R$ | Este trabajo |
| PB11227 | MC1061 *golTS*$_{S77C}$$^+$Cm$^R$ | Este trabajo |

**Continuación Tabla 3.1.**

| Cepa | Genotipo relevante | Referencia |
|---|---|---|
| | ***Salmonella* Typhimurium** | |
| 14028s | Silvestre | (Fields y col., 1986) |
| 7065 (LB5010) | *metA22 metE551 trpD2 ilv*$^-$*452 leu*$^-$ *pro*$^-$ *hsdSA29 hsdB*$^-$ *strA120 galE*$^-$ | (Bullas y Ryu, 1983) |
| PB6071 | *golSB*::*Km*$^R$ | (Checa y col., 2007) |
| PB5257 | Δ*golS* | (Checa y col., 2007) |
| PB3298 | Δ*golT* | (Checa y col., 2007) |
| PB6716 | Δ*golS* Δ*cueR* | Este trabajo |
| PB4836 | Δ*golTSB* Δ*gesABC* | Este trabajo |
| PB7657 | *golS*$_{S77C}$ *golB*::Cm$^R$ | (Ibáñez, 2012) |
| PB10266 | Δ*zntA golS*$_{S77C}$ *golB*::Cm$^R$ | (Ibáñez, 2012) |
| PB10507 | *golS*$_{S77C+L}$-*golB*::Cm$^R$ | Este trabajo |
| PB4026 | Δ*gesABC* | (Pontel y col., 2007) |
| PB10122 | Δ*cpxR* | Colección del laboratorio |
| PB5508 | *golB*::*lacZ* -Cm$^R$ | (Checa y col., 2007) |
| PB5662 | *gesA*::*lacZ*- Cm$^R$ | (Pontel y col., 2007) |
| PB10019 | Δ*cpxR* *gesA*::*lacZ*- Cm$^R$ | Este trabajo |
| PB10106 | Δ*golS* Δ*cpxR* | Este trabajo |
| PB10575 | Δ*gesABC* Δ*cpxR* | Este trabajo |
| PB11179 | Pges-Cm$^R$ | Este trabajo |
| PB11180 | *ges*Δbox | Este trabajo |
| PB6423 | Δ*acrAB* | (Pontel y col., 2007) |

**Continuación Tabla 3.1.**

| Cepa | Genotipo relevante | Referencia |
|---|---|---|
| PB6600 | Δ*acrAB* Δ*gesABC* | (Pontel y col., 2007) |
| PB10157 | Δ*acrAB* Δ*cpxR* | Este trabajo |
| PB10179 | Δ*acrAB* Δ*gesABC* Δ*cpxR* | Este trabajo |

**Tabla 3.2. Plásmidos utilizados**

| Plásmido | Propiedades relevantes | Referencia |
|---|---|---|
| pKD3 | Ori R6K, $Cm^R$, $Amp^R$ | (Datsenko y Wanner, 2000) |
| pKD4 | Ori R6K, $Km^R$, $Amp^R$ | (Datsenko y Wanner, 2000) |
| pCP20 | *flp*, $Amp^R$ | (Cherepanov y Wackernagel, 1995) |
| pKD46 | $P_{araB\text{-}\gamma\text{-}\beta\text{-}exo}$, $Amp^R$ | Datsenko y Wanner, 2000 |
| pPB1205 (pGolS) | pUH::*golS* | (Checa y col., 2007) |
| pPB1205 (pCpxR) | pQE32::*cpxR*-6xHis | Colección del Laboratorio |
| pPB1429 | pGEM-T-easy::P*golTS-golS* | Este trabajo |
| pPB1430 | pGEM-T-easy::P*golTS-golTS-golB* | Este trabajo |
| pPB1431 | pGEM-T-easy::Pg*olTS-golS*::$Cm^R$ | Este trabajo |
| pPB1432 | pGEM-T-easy::P*golTS-golTS-golB*::$Cm^R$ | Este trabajo |
| pPROBE-NT | $rep_p$ BBR1 $Km^R$ gfp | Miller 2000 |
| pPB1294 (PgolB-gfp) | pPROBE-NT::P*golB* | (Cerminati, 2009) |

**Continuación Tabla 3.2.**

| Plásmido | Propiedades relevantes | Referencia |
|---|---|---|
| pPB1295 (PcopA-GFP) | pPROBE-NT::P*copA* | Este trabajo |
| pPB1296 (pGOLS-GFP) | pPROBE-NT::P*golTS-golS-PgolB* | Este trabajo |
| pPB1321 (pGOLS(R)-GFP) | pPROBE-NT::P*golTS-golS(R)-PgolB* | Este trabajo |
| pSU8 | $Rep_p$15A $Cm^R$, *lacI*$^-$ | (Bartolomé y col., 1991) |
| pPB1322 (pGOLS-Cm) | pSU8::*golS* | Este trabajo |
| pMC1871 | pBR322. $Tet^R$, *lacI*$^-$ | Amersham Pharmacia |
| pPB1222 (PgolB-lacZ) | pMC1871::P*golB* | (Pérez Audero y col., 2010) |
| pPB1224 (Pges-lacZ) | pMC1871::P*gesABC* | (Pérez Audero y col., 2010) |
| pPB1433 (Pges-Δbox-lacZ) | pMC1871::P*gesABC-Δbox* | Este trabajo |
| pPB1223 (PgolTS-lacZ) | pMC1871::PgolTS | (Pérez Audero y col., 2010) |

**Tabla 3.3. Oligonucleótidos utilizados**

| Nombre | Secuencia | Referencia |
|---|---|---|
| PgolB-Fw | CTAGTCTAGATATCCAGAACATGC | Este trabajo |
| PgolB-Rv | GAGGATCCCTGCATAGTGAACTCC | Este trabajo |
| PcopA-Fw | GCTCTAGACAAACCGTCCAGGGTCAGG | Este trabajo |
| PcopA-Rv | CTCCCGGGTAAACCGGTTTTTTTCGC | Este trabajo |
| PgolTS-Fw | GCTCTAGAAATTTTGAATGTTCTAC | Este trabajo |
| golS-Rv | CGCGTCGACAAGGTCAAGCGTAATC | Este trabajo |
| cat-Fw | AAAACTGCAGCATGGGAATTAG | Este trabajo |
| cat-Rv | CGAGCTCGATTACACGTCTTG | Este trabajo |
| P1-gol | CGCCGCATGGACGGAGGTCAATGACGCCGCACACAGCACGAATTTTGAATGTTCTACGCATG | Este trabajo |
| P2-cat | TATGGACACCACCGTTGAAACGTAGTCTGCTTTTTTCTGCATTACACGTCTTGAGCGAT | Este trabajo |
| golS(wt)-F | ATGAGGAGGAGCGTCATGAACATCG | (Checa y col., 2007) |
| $golS_L$-R | GGTTGTCCAAGCGTATGCAGAATGGGGCAATCGGCGCTGTCATCGCCAGGGCAGGCATTCGCCAGC | (Checa y col., 2007) |
| | GCTTTGAGGG | (Checa y col., 2007) |
| RvP1-golB-R | GTGAACTCCTTTTGTGTGGGAACTG | (Checa y col., 2007) |
| golB-P1-F | CACTGGCAAGGTCCAGACTGGCAACAGTTCCCACACAAAAGGAGTTCACTGTGTAGGCTGGAGCTG CTTC | (Checa y col., 2007) |
| golB-P2-R | TGGCTAGCGTATCGCGACCGGCCTGTCGCCAGACCGATCGCCATTGACGACATATGAATATCCTCCT TA | (Checa y col., 2007) |
| zntA-EC-P1 | CTCCGGTTAATGAGAAAATTATCATCAACCGGAGGACGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG | Este trabajo |
| zntA-EC-P2 | GGGATAACCCGGCGACACGACGCCGCCGGGCGGGAGAAGACATATGAATATCCTCCTTA | Este trabajo |
| Pges-Fw | CTCCCGGGAATTTTGAATGTTCTAC | (Pérez Audero y col., 2010) |
| Pges-Rv | TCCCCGGGGCTTATCGTGTCGTGAC | (Pérez Audero y col., 2010) |
| Mp-ges-cpx-box | GCCCCCACTAAACCCCACTGGAACGC | Este trabajo |
| P1-ges-F | CGAAGCAGCTCCAGCCTACACTTATGAGCCATCTCACATTCTCGCCGAACCGTGCAGCC | Este trabajo |
| P2-ges-R | GGGTCGGCATCGTGGCGTAAATGTCTCGCATCATCCTCTTCATATGAATATCCTCCTTA | Este trabajo |
| Pges-foot-rv | CAAGCGTATTCAGGCTGCACGGTTC | (Pontel y col., 2007) |

## 3.2. Medios de cultivo, antibióticos y condiciones de crecimiento.

Las células fueron crecidas en el medio de cultivo Luria-Bertani (LB, Difco), compuesto por 10 g/l peptona de carne, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l NaCl; o, SLB (LB sin NaCl). Cuando se indica, se ajustó el pH del LB a 5,5 o 7,0 mediante el agregado de 100 mM MES y 50 mM MOPS. Los ensayos de determinación de fluorescencia se realizaron en medio mínimo SM9 compuesto por 6 g/l $Na_2HPO_4$, 3 g/l $KH_2PO_4$, 1 g/l $NH_4SO_4$ y 1 mM $MgSO_4$ ajustado a pH 7,4. A este medio se le agregó la concentración 0,5% p/V de casaaminoácidos; tiamina en una concentración de 2 μg/ml; glucosa a una concentración 0,2 % o bien, cuando se indica, se utilizaron una de las siguientes fuentes de carbono en reemplazo de glucosa: 0,2% de glicerol; 0,27% de acetato de sodio, o 0,32% de citato de sodio.

Para la preparación de medios sólidos y semisólidos se agregó agar en una concentración final de 15 g/l y 6 g/l, respectivamente. Los antibióticos empleados fueron: ampicilina (100 μg/ml), cloranfenicol (20 μg/ml), kanamicina (50 μg/ml), tetracilina (12,5 μg/ml) y estreptomicina (100 μg/ml).

## 3.3. Técnicas moleculares.

### 3.3.1. Ácidos nucleicos.

#### 3.3.1.1. 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 ºC con agitación constante. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 2,5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8,25 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 ºC. Se agregaron 300 μl de una solución de 10 % (p/V) de Sarkosyl y 100 μg/ml proteasa K (Invitrogen), y se incubó a 55 ºC 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 y col., 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 y col., 1989). También se analizó el ADN genómico mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, como se indica en la sección 3.3.1.5.

**3.3.1.2. Preparación de ADN plasmídico.**

El ADN plasmídico se preparó a partir de células de *E. coli* previamente transformadas. Las células se crecieron a 37 ºC 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 ºC 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 ºC 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 $H_2O$ destilada estéril. La solución de ADN obtenida se mantuvo a –20 ºC 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.

**3.3.1.3. 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 ºC durante 3 minutos, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94ºC, un anillado entre 50 ºC y 60 ºC (dependiendo del oligonucleótido utilizado) y una elongación a 72 ºC (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 ºC durante 10 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. El volumen final fue de 50 µl conteniendo: *buffer* comercial 1X, 2,5 mM $MgCl_2$, 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).

**3.3.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (*Colony*-PCR).**

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 $MgCl_2$, 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 descripto en el punto anterior.

**3.3.1.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.**

El ADN cromosomal y 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 y col., 1989). Se usó la solución reguladora 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 μg/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).

**3.3.1.6. 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.

**3.3.1.7. 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 3.3.1.5.

**3.3.1.8. 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 temperatura ambiente. 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.

### 3.3.1.9. Mutagénesis sitio dirigida mediante las técnicas de *megaprimer* y SOE-PCR.

Las mutantes puntuales en los distintos genes se realizaron mediante la técnica de *megaprimer* (Sarkar y Sommer, 1990) o por una combinación de las técnicas de *megaprimer* y SOE-PCR (Aiyar y col., 1996) cuando fue necesario. Brevemente, para obtener distintas versiones mutantes se realizaron dos reacciones consecutivas de PCR (PCR I y PCR II). Para estas reacciones se emplearon tres oligonucléotidos, dos que son los "flanqueantes" del fragmento a modificar y un oligonucleótido interno "mutador" que es el que contiene la mutación que se desea introducir. Este oligonucleótido "mutador" tiene cambiadas las bases necesarias para lograr los cambios deseados. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando como molde ADN genómico o plasmídico según se indique. La PCRI consiste en amplificar un fragmento con el oligonucleótido mutador y uno de los oligonucleótidos flanqueantes. El protocolo y los componentes de la reacción de PCR I se muestran en la tabla 3.4.

**Tabla 3.4. Componentes y programas utilizados para la amplificación del megaprimer y de la SOE-PCR**

| **Componentes** | **PCR I** | **PCR II** | **PCR III (SOE-PCR)** |
|---|---|---|---|
| Buffer comercial 10X | 10 µl | 10 µl | 40 µl |
| 50 mM $MgSO_4$ | 2 µl (1 mM) | 2 µl (1 mM) | 8 µl (1 mM) |
| 100mM dNTPs | 1,2µl (300µM c/u) | 1,2µl (300µM c/u) | 4,8µl (300µM c/u) |
| Oligonucleótido Fw | 2 µl (25 pmol) | 10 µl *megaprimer* | 8 µl (25 pmol) |
| Oligonucleótido Rv | 2 µl (25 pmol) | 2 µl (25 pmol) | 8 µl (25 pmol) |
| *Pfx* (2,5 U/µl) | 0,5 µl | 0,5 µl | 2 µl |
| Molde ADN genómico | 1 µl | 1 µl | - |
| $H_2O$ csp. | 100 µl | 100 µl | 400 µl |
| **Programa de PCR** | **PCR I** | **PCR II** | **PCR III (SOE-PCR)** |
| 1. Desnaturalización | 4' a 94ºC | 4' a 94ºC | 4' a 94ºC |
| 2. Desnaturalización | 30'' a 94ºC | 1' 30'' a 94ºC | 1' a 94ºC |
| 3. Hibridación | 30'' a 55ºC | 2' a 55ºC | 2' a 55ºC |
| 4. Elongación | 1' a 68ºC | 1' a 68ºC | 2'30'' a 68ºC |
| 5. Repetir pasos 2 a 4 | 30 veces | 30 veces | 30 veces |
| 6. Elongación final | 5' a 68ºC | 10' a 68ºC | 10' a 68ºC |

Los productos obtenidos a partir de esta reacción de PCR constituyen el *megaprimer*. Éstos fueron purificados y luego utilizados en la reacción de PCR II que

constituye la extensión del *megaprimer*. En los casos que se indique se utilizó el producto mutado de esta PCR en una reacción de SOE-PCR (PCR III) con el fin de fusionarlo a un *cassette* de resistencia a cloranfenicol ($Cm^R$) que permita la posterior selección de las colonias luego de la transformación lineal. El fragmento que contiene el gen de resistencia fue amplificado del plásmido pKD3. Los productos de las PCR II y III fueron purificados y utilizados para la construcción de las cepas que se describen en la sección 3.6, según corresponda. Las cantidades utilizadas para la mezcla de reacción de las tres PCR así también como el programa utilizado se detallan en la tabla 3.4.

**3.3.1.10. Construcción de plásmidos reporteros.**

Para la construcción del plásmido PcopA-gfp (pPB1295, Tabla 3.2) se amplificó mediante PCR un fragmento conteniendo la región promotora del gen *copA* a partir de ADN genómico de *Salmomella* utilizando el par de cebadores PcopA-Fw/PcopA-Rv que llevan los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción XbaI y XmaI (Table 3.2). El producto de PCR se digirió con estas enzimas y se ligó al plásmido pPROBE-NT (Miller y col., 2000) corriente arriba del gen *gfp,* tratado del mismo modo.

Los plásmidos biosensores pGOLS-GFP (pPB1296) y pGOLS(R)-GFP (pPB1321) que expresan GolS a partir de su propio promotor y GFP bajo el control del promotor del gen *golB* (Tabla 3.2) se construyeron de la siguiente manera. Para la construcción del plásmido pGOLS-GFP se amplificó mediante PCR un fragmento de ~1800 pb que contiene el promotor de los genes *golTS* seguido del gen *golS* y el promotor del gen *golB* (P*golTS*-*golS*-P*golB*) a partir de ADN cromosomal obtenido de la cepa *S.* Typhimurium Δ*golT* (PB3298, Checa y col., 2007; Tabla 3.1) utilizando los oligonicleótidos PgolTS-Fw y PgolB-Rv (Tabla 3.3) que llevan sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Xba*I y *BamH*I. El fragmento de PCR obtenido fue luego digerido con estas enzimas y ligado en el plásmido pPROBE-NT tratado de igual manera. Para la construcción del plásmido pGOLS(R)-GFP, se amplificó mediante PCR un fragmento de ~1700 pb que contiene al promotor *golTS* seguido del gen *golS* a partir de ADN cromosomal obtenido de la cepa *S.* Typhimurium Δ*golT* (PB3298, Checa y col., 2007; Tabla 3.1) utilizando los oligonicleótidos PgolTS-Fw y PgolS-Rv (Tabla 3.3) que llevan sitios de reconocimiento para *Xba*I y *Sal*I respectivamente. Posteriormente se digirió el fragmento y se lo ligó al plásmido PgolB-gfp (Cerminati, 2009) digerido con

las mismas enzimas (las partes características de estos plásmidos se esquematizan en la Figura 4.5)

Para generar el plásmido pGOLS-Cm (pPB1322. Tabla 3.2) que expresa GolS bajo el control del promotor P*lac*, inducible por IPTG, se digirió el plásmido pPB1205 (pUH::*golS*) que lleva una fragmento de 490 pb que contiene el marco abierto de lectura del gen *golS* (Checa et al., 2007) con las enzimas *BamH*I e *Hind*III . El producto de digestión de 490 pb se ligó posteriormente en el plásmido pSU8 (Bartolomé y col., 1991) tratado con las mismas enzimas.

Para generar el plásmido P*ges*Δbox-*lacZ* (pPB1433. Tabla 3.2) que contiene la caja de unión a CpxR mutada, se procedió de la siguiente manera. Brevemente, se realizaron dos PCR utilizando la técnica de *megaprimer*. En la primera PCR se generó un fragmento que contiene el sitio de unión a CpxR mutado utilizando los primers Mpges-cpx-box y PgesFw, y el plásmido Pges-lacZ como molde (PCRI). El producto de esta reacción se utilizó en la reacción de extensión del megaprimer (PCRII) junto con el oligonucleótdo Pges-RV y utilizando como molde el mismo plásmido que anteriormente. Los oligoniucleótidos Pges-Fw y Pges-Rv llevan en sus extermos 5' un sitio de reconocimiento para la enzima XmaI, con la que el producto de la PCRII fue tratado para ligarlo en el plásmido pMC1871 tratado de la misma manera.

## 3.4. 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 ºC hasta una $DO_{600nm}$ entre 0,5 y 0,8. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 20 minutos y se centrifugó a 7000 rpm a 4 ºC. El sedimento celular obtenido se lavó dos veces con 500 ml de $H_2O$ 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 ºC hasta el momento de su uso.

## 3.5. Transformación y selección.

Para la transformación celular se colocaron 40 µl 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 µl del plásmido o mezcla de ligación. 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 ºC 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.

## 3.6. Manipulación genética.

### 3.6.1. Construcción de mutantes polares y no polares en *Salmonella y E. coli.*

En la figura 3.1 se esquematiza el método empleado para la obtención de mutantes polares y no polares en *Salmonella* y *E. coli* desarrollado por Datsenko y colaboradores (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 3.2). Con estos fragmentos se transformaron células electrocompetentes de *Salmonella* 7065/pKD46 o MC1061/ 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 3.1). La preparación de las células electrocompetentes que transportan el plásmido pKD46 se llevó a cabo de acuerdo a la sección 3.4 excepto que los cultivos fueron crecidos a 30ºC 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 ºC con agitación en LB conteniendo 1 % (p/V) glucosa. Se seleccionaron colonias $Amp^R$ a 30 ºC y luego se

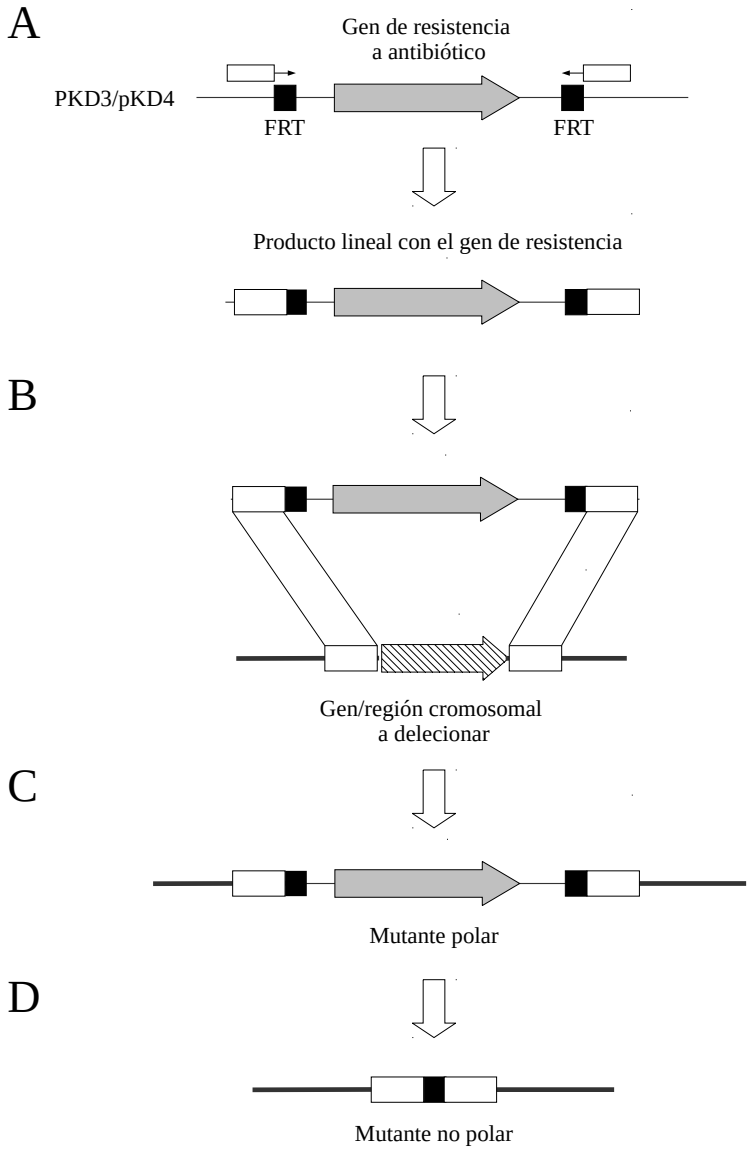



**Figura 3.1. Obtención de mutantes polares y no polares en *Salmonella* y *E. coli*.** El esquema muestra la estrategia descripta por Datsenko y Wanner para la obtención de mutantes cromosomales (Datsenko y Wanner, 2000). **A**. Se genera por PCR un fragmento de ADN lineal que contiene el gen de resistencia a *Cm* o *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 delecionar (blanco). **B**. Se transforma la cepa de *Salmonella* o *E. coli* 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 delecionar 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.

repicaron a 42 ºC para inducir la expresión de la recombinasa y evitar la replicación del plásmido que, de esta manera, se pierde. Así se obtuvieron las cepas mutantes conteniendo la deleción deseada y una pequeña "cicatriz" de 75 pb que contiene un único sitio FRT (Figura 3.1).

### 3.6.2. Generación de cepas portadoras de los alelos mutantes de *golS en Salmonella*

Para generar la cepa de *Salmonella* portadora del gen $golS_{S77C+L}$ o la cepa ΔcpxR-box, se utilizó una metodología que combina la técnica de transformación con ADN lineal descripta en el punto 3.6.1. con la técnica de *megaprimer* (Sarkar y Sommer, 1990) y/o de la de SOE-PCR (Aiyar y col., 1996) descriptas en la sección 3.3.1.9.

Para la construcción de la cepa $golS_{S77C+L}$ *golB::*$Cm^R$ inicialmente se amplificó por PCR la región del gen mutante $golS_{S77C}$ que se desea modificar utilizando el oligonucleótido golS(wt)-F y golSL-Rv, utilizando como molde ADN genómico de la cepa $golS_{S77C}$, como se describe en el punto 3.3.1.9. De esta manera, a través del oligonucleótido reverso, conteniendo la secuencia de ADN correspondiente a la versión mutante de *golS*, se introduce la mutación deseada. El producto resultante se utilizó como *megaprimer* en una segunda reacción de PCR utilizando además el oligonucleótido RvP1golB-R (Tabla 3.3) que contiene, además de la región correspondiente al promotor de *golB*, la secuencia complementaria al oligonucleótido con el cual se va a amplificar la región codificante para $Cm^R$ del plásmido pKD3 (producto 1). Se amplificó a su vez el *cassette* de resistencia a cloramfenicol ($Cm^R$) del vector pKD3 utilizando los oligonucleótidos golB-P1-F y golB-P2-R generando el producto 2 (Tabla 3.3). Como el extremo 5´ de este último producto solapa con el extremo 3´ del producto 1 se realizó una SOE-PCR utilizando como molde estos productos y los oligonucleótidos de los extremos, golS(wt)-F y golB-P2-R. Como resultado se obtuvo un único producto que fue empleado para transformar un cepa de *Salmonella* 7065 a la que previamente se le delecionaron los genes *golS* y *golB* (Δ*golSB*::*Km*, Tabla 3.1) y que transporta además el plásmido pKD46. Se utilizó esta cepa en lugar de la salvaje para asegurar la entrada del gen *golS* mutado ($golS_{S77C-L}$) (Figura 3.2). Se seleccionaron las cepas transformantes que sean resistentes a cloranfenicol pero sensibles a kanamicina, asegurando que el alelo mutante se *golS* se introdujo en el lugar correcto del cromosoma.

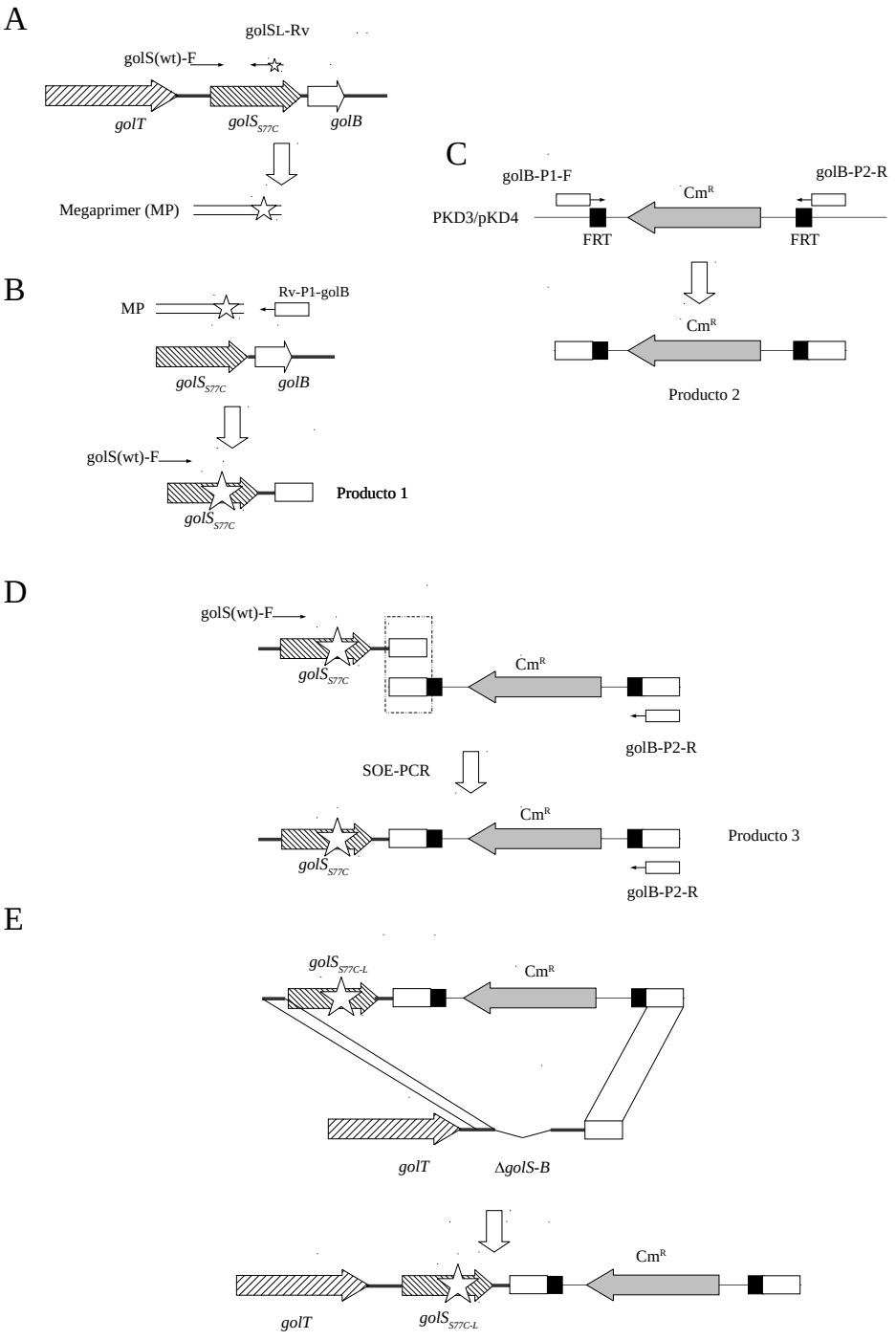



**Figura 3.2. Construcción de la cepa *golS*$_{S77C}$**. En la figura se esquematiza la metodología empleada para generar las cepas que portan los genes mutantes para *golS* (*golS**). **A.** Se genera un megaprimer (MP) mediante PCR utilizando el oligonucléotido golS(wt)-F y su par mutagénico golSL-Rv. **B.** Se genera el producto 1 al extender el MP con el oligonucléotido RvP1golB-R. **C.** Se genera el produto 2 que contiene el *cassette* de resistencia a cloranfenicol empleando los oligonucleótidos golB-P1-F y golB-P2-R. **D.** Se genera el producto 3 combinando los productos 1 y 2 mediante SOE-PCR. **E.** El producto 3 es empleado para transformar una mutante Δ*golSB*::Km$^{R}$.

Para la construcción de la cepa ΔcpxR-box, se procedió de la siguiente manera. En primer lugar se construyó una cepa (Pges-$Cm^R$) que lleva un *cassette* de resistencia a Cm corriente arriba del sitio de unión a CpxR (a una distancia de 80 pb) como se describe en la sección 3.6.1, utilizando los oligonucleótidos P1-ges-F y P2-ges-R y el plásmido pKD3 como molde de la PCR. A continuación se construyó un megaprimer utilizando los oligonucleótidos Mp-ges-cpx-box (que lleva el sitio de unión a CpxR mutado y Pges-R). El producto resultante se utilizó como *megaprimer* en una segunda reacción de PCR utilizando además el oligonucleótido P2-ges-R y el ADN genómico de la cepa Pges-$Cm^R$. El producto de esta PCR fue empleado para transformar una cepa de *Salmonella* 14028 que lleva el plásmido pKD46.

### 3.6.3. Construcción de mutantes transgénicas en *Escherichia coli.*

Las cepas transgénicas de *E. coli* MC1061 *golS*-$Cm^R$ y MC1061 *golTSgolB*-$Cm^R$ se construyeron utilizando recombinación mediada por el sistema Lambda-Red. En primer lugar, se amplificaron fragmentos de 1700 pb y 3300 pb que contienen al gen *golS* con su propio promotor o el locus completo *golTS-golB* a partir de ADN genómicos de las cepas de *Salmonella* Δ*golT* o la cepa silvestre 14028s respectivamente, utilizando los pares de oligonucleótidos PgolTS-Fw/golS-Rv o PgolTS-Fw/golB-Rv (Tabla 3.3), respectivamente. Cada fragmento se clonó por separado en el plásmido pGEM-T-easy (Promega) obteniéndose las construcciones pGEM-*golS* y pGEM-*golTSB*. Por otra parte, se amplificó un fragmento de 1,1 kb que contiene al gen de resistencia a cloranfenicol ($Cm^R$) utilizando como molde el plásmido pKD3 (Datsenko y Wanner, 2000) y el par de oligonucleótidos cat-Fw/cat-RV, que llevan sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *Pst*I y *Sac*I, respectivamente (Tabla 3.3). Este fragmento se clonó en los plásmidos pGEM-golS y pGEM-golTSB digeridos con las enzimas correspondientes para obtener los plásmidos pGEM-golS-$Cm^R$ y pGEM-golTSB-$Cm^R$, respectivamente. Finalmente, se amplificaron los fragmentos P*golTS-golS*-$Cm^R$ de ~2800 pb y P*golTS-golTS-golB*- $Cm^R$ de ~4400 pb utilizando el par de oligonucleótidos P1-gol/P2-cat (Tabla 3.3) y como molde los plásmidos pGEM-golS-$Cm^R$ y pGEM-goltsB-$Cm_R$, respectivamente.

Los oligonucleótidos P1-gol y P2-cat llevan en sus extremos 5' una secuencia homóloga al sitio de inserción de los fragmentos en el genoma de *E. coli* de 40 pb cada una. Estos fragmentos se utilizaron para transformar la cepa de E. coli MC1061

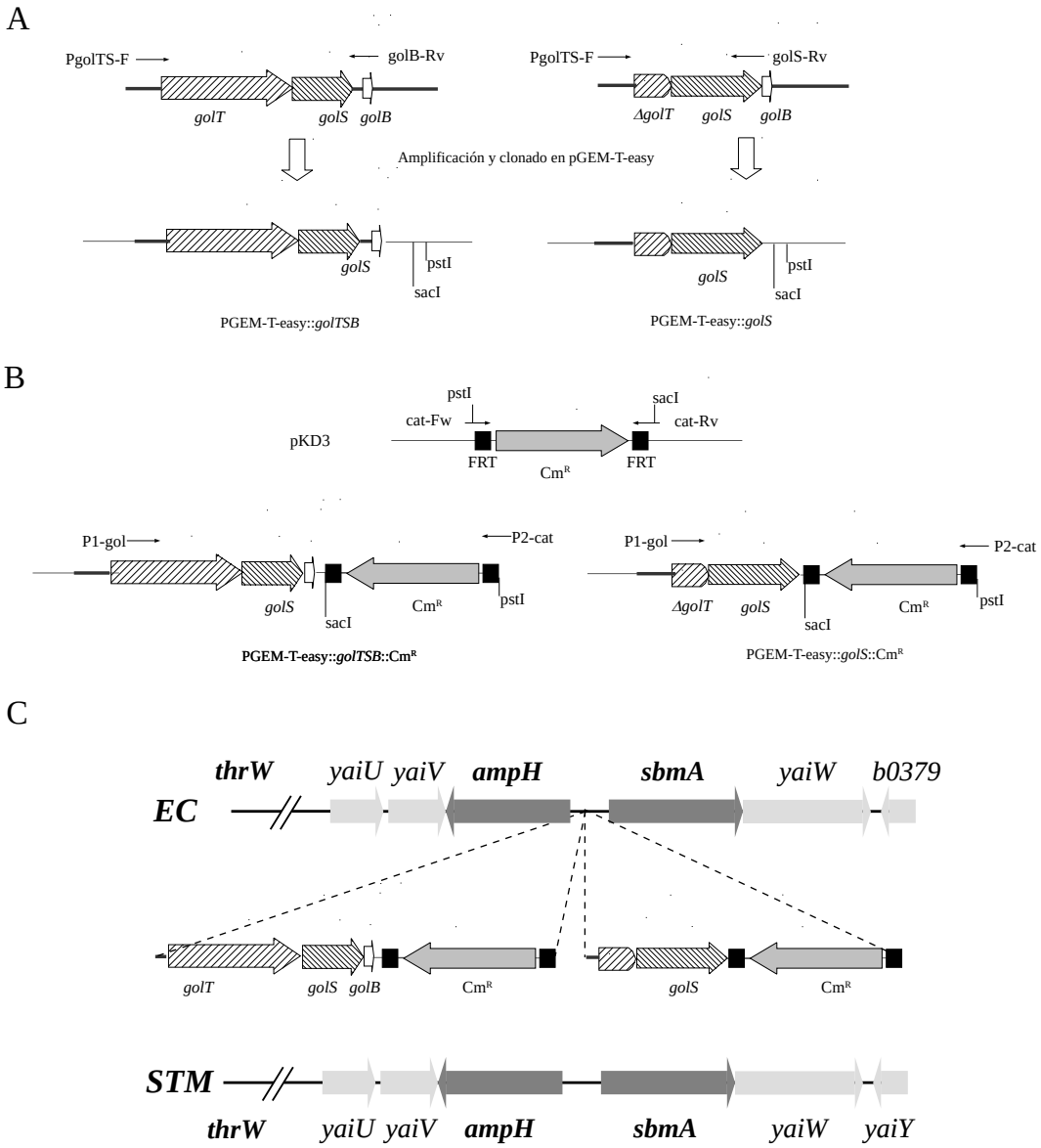



**Figura 3.3. Construcción de las cepas transgénicas de E. coli.** En la figura se esquematiza la metodología empleada para generar las cepas trangénicas de *E. coli EC golS* y EC golTSB. **A.** Se generaron por PCR dos fragmentos de PCR conteniendo los genes *golTSB* o *golS* con sus promotores y se clonaron en el plásmido pGEM-T-easy. **B.** Se amplificó por PCR un fragmento de ADN que contiene el cassette de resistencia a $Cm^R$. Este fragmento se clonó luego en los plásmidos generados en A. **C.** Los plásmidos generados en B se utilizaron para amplificar 2 fragmentos que contienen a los genes *golTSB*-$Cm^R$ o *golS*-$Cm^R$ y se transformó con los mismos una cepa de *E. coli* que lleva el plásmido pKD4. Se muestra la organización genética del sitio de inserción elegido para la inserción de los fragmentos *golS*-$Cm^R$ o *golTS-golB*-$Cm^R$ en el cromosoma de *E. coli* (EC) y la misma región en el cromosoma de *S.* Typhimurium LT2 (STM).

(Casadaban y Cohen, 1980) que porta el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000). Para la construcción de la cepa MC1061 $golST_{S77C}$ – $Cm^R$, se procedió de manera

similar a excepción de que el fragmento insertado se amplificó directamente de ADN genómico de la cepa de Salmonella *golS*$_{S77C}$ *golB*::Cm$^R$ utilizando el par de oligonucleótidos P1-gol y P2-cat (Casadaban y Cohen, 1980) que porta el plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000). Para la construcción de la cepa MC1061 golST$_{S77C}$ – Cm$^R$, se procedió de manera similar a excepción de que el fragmento insertado se amplificó directamente de ADN genómico de la cepa de *Salmonella golS*$_{S77C}$ *golB*::Cm$^R$ utilizando el par de oligonucleótidos P1-gol y P2-cat

## 3.6.4. Utilización del bacteriófago P22.

### 3.6.4.1. Obtención de lisado en medio semisólido.

Las mutantes en los diferentes genes de *Salmonella* descriptas durante esta Tesis, así como los plásmidos utilizados durante el trascurso de la misma fueron movilizados mediante transducción generalizada con fago 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 $^oC$, 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 $^oC$ 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 salvaje 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.

**3.6.4.2. Obtención de lisado en medio líquido.**

Esta técnica se utilizó para transferir, mediante transducción, el plásmido pCP20 utilizado para escindir la resistencia a antibiótico de algunas mutantes. Para obtener el lisado en primer lugar se centrifugó 1 ml de un cultivo saturado de la cepa dadora correspondiente (14028s/pCP20) durante 5 minutos a 5000 rpm. Se resuspendió el sedimento celular en 5 ml de medio Nutrient Broth suplementado con 0,05 ml de Sales E 50 X (10 g/L $MgSO_4.7H_2O$, 100 g/L de ácido cítrico, 655 g/L de $K_2HPO_4.3H_2O$, 175 g/L de $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ y 3 ml/L de $CHCl_3$), 0,05 ml de glucosa 20% (p/V) y 5 $10^7$ ufp/ml de fago P22 HT. Tras una incubación de 16 hs a 30 ºC con agitación, se agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugó durante 10 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante obtenido conteniendo la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4 ºC hasta el momento de su uso.

**3.6.4.3. Transducción generalizada.**

Una alícuota de 100 µl de un cultivo saturado de la cepa receptora se incubó durante 45 minutos a 37 $^oC$ 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 30ºC. 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.

## 3.6.5. Utilización del bacteriófago P1.

**3.6.5.1. Obtención de lisados en medio semisólido.**

Para transferir por transducción generalizada mutaciones cromosomales entre diferentes cepas de *E. coli*, se obtuvieron los lisados de las correspondientes cepas dadoras en medio semisólido. Para ello, se inocularon 100 µl de un cultivo saturado en medio LB en 900 µl de medio LB fresco y se lo incubó 1 hora a 37 °C con agitación. Transcurrido ese tiempo de incubación, se le agregaron 2,5 µl $CaCl_2$ 2M (concentración final de 5 mM) y 100 µl de una dilución $10^{-3}$ de la suspensión de fagos P1 crecidos en la

cepa silvestre de *E. coli* MC1061. La mezcla se incubó sin agitación durante 20 min a temperatura ambiente. Se le agregaron luego 4 ml de LB semisólido [0,6 % (p/V) agar] fundido, suplementado con 10 µl de $CaCl_2$ 2M y se lo vertió sobre una placa de Petri con LB-agar. Las placas fueron incubadas 12-15 horas a 37 °C hasta observar placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro. Para recoger el lisado se agregó a la placa 5 ml de medio LB líquido y, con ayuda de una espátula de Drigalsky, 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 5 min 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.

#### 3.6.5.2. Transducción.

Para transducir la mutación cromosomal de una cepa dadora de *E. coli* a otra receptora, 1 ml de cultivo saturado de la cepa receptora crecida en medio LB se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min, y el sedimento celular se resuspendió en igual volumen de una solución MC (100 mM $MgSO_4$ y 5 mM $CaCl_2$). 100 µl de estas células se mezclaron con 100 µl de lisado P1 (apartado 3.4.7.1) y se incubó la mezcla durante 20 min a 37 °C (sin agitación). Se utilizaron como controles mezclas en las cuales se reemplazaron bacterias o fagos por LB estéril, según corresponda. Transcurrido dicho período de incubación, se suplementó la mezcla con 20 µl de citrato de sodio 1 M y 1 ml de medio LB fresco. Se incubó por 3 horas a 37 °C con agitación y se colectaron luego las células por centrifugación a 7500 rpm durante 5 min. Todo el sedimento celular se resuspendió en aproximadamente 50 µl de LB y se seleccionaron las células en placas de LB-agar suplementadas con el antibiótico correspondiente para su selección.

## 3.7. Determinación de fluorescencia.

### 3.7.1. Determinación de fluorescencia en medio líquido.

Para las medidas de fluorescencia, se crecieron las cepas que llevan las distintas construcciones reporteras en medio LB, suplementado con el/los antibiótico/s correspondiente/s hasta fase estacionaria. Luego se realizó una dilución 1/100 en el mismo medio y se incubó en agitación a 37 ºC hasta una densidad óptica de 0,5. El

cultivo se fraccionó en alícuotas de 1 mL y se incubó en presencia del metal que se indica o agua destilada estéril durante el tiempo que se indica. Luego de tres horas se procedió a realizar 2 lavados de los medios en PBS (NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L; $Na_2HPO_4$ 1,44 g/L y $K_2HPO_4$ 0,24 g/L, pH 7) a fin de reducir la fluorescencia basal del medio LB resuspendiéndose los mismos en el mismo volumen. Se utilizó una alícuota de 200 μL para determinar la densidad celular por medidas de absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas Biotek modelo ELX-808. Para realizar las medidas de fluorescencia se colocaron alícuotas de 200 μL de cada cultivo (por triplicado) en una microplaca de 96 pocillos color negra y fondo plano (Greiner). La fluorescencia se determinó en un equipo Biotek modelo Synergy 2, utilizando un filtro de excitación de 485 ± 35 nm y uno de emisión de 535 ± 25 nm. El valor de fluorescencia medido (unidad relativa de fluorescencia, URF) fue normalizado respecto a la densidad óptica de los cultivos y la fluorescencia intrínseca de las bacterias. El cálculo de la fluorescencia específica se realizó del siguiente modo:

$$UEF = \frac{URF^1}{DO_{600}^1} - \frac{URF^2}{DO_{600}^2}$$

UEF: unidades específicas de fluorescencia

$URF^1$: Unidades relativas de fluorescencia de la cepa a cuantificar

$URF^2$: Unidades relativas de fluorescencia de la cepa que lleva el vector pPROBE-NT

$DO_{600}{}^1$: Densidad óptica de la cepa a cuantificar

$DO_{600}{}^2$: Densidad óptica de la cepa que lleva el vector pPROBE-NT

Para las medidas en medio mínimo SM9, se partió de un cultivo de la cepa a analizar en medio LB crecido hasta fase estacionaria a 37 ºC. Se colectaron las células por centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos y se lavaron 2 veces en medio SM9. Luego de la centrifugación las células se resuspendieron en igual volumen de SM9 suplementado con el/los antibiótico/s correspondiente/s, casaminoácidos y fuentes de carbono a las concentraciones que se indican en la sección 3.2 y con la mezcla se inoculó medio fresco en una relación 1/20. Los cultivos se incubaron a 37 ºC con agitación hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5. Luego se crecieron las células en ausencia o presencia de metal a las concentraciones y tiempos que se indican a 37 °C. Finalmente, se procedió como se indica para los cultivos realizados en LB sin someter

los cultivos a lavado con PBS.

Alternativamente, para el análisis de muestras aditivadas con metales, las bacterias cultivadas a una $DO_{600}$ de 0,5, se centrifugaron y se resuspendieron en medio SM9 2X, concentrando las células en el mismo factor. Posteriormente, se mezclaron 500 µl de la suspensión de bacterias con 500 µl de la muestra evaluar conteniendo agua corriente (de la canilla) a la que se agregaron los metales individuales o las mezclas de metales que se indiquen. Luego de tres horas de incubación, se determinó la fluorescencia emitida del mismo modo que anteriormente.

### 3.7.2. Determinación de fluorescencia en medio sólido.

Se utilizó el método de difusión por disco en agar. El mismo consistió en colocar discos de papel de filtro estériles, embebidos con agua estéril o con soluciones de metales de concentraciones conocidas, según se indique, sobre placas de LBA suplementadas con kanamicina y cloramfenicol. Luego se vertió una mezcla de 2 mL de medio semisólido LB con 200 µL de un cultivo saturado de la cepa sensora Δ*zntA golS*$_{S77C}$ *golB::*$Cm^R$ y cuya expresión de GFP se quería observar. Las placas tratadas se incubaron 16 horas a 37 ºC y luego se las fotografiaron bajo luz UV.

## 3.8. 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 µl del cultivo, los cuales fueron agregados a un tubo de ensayo que contenía 275 µl de solución reguladora Z (16,1 g/l $Na_2HPO_4.7H_2O$; 5,5 g/l $NaH_2PO_4.H_2O$; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l $MgSO_4.7H_2O$; 0,27 % (V/V) β-mercaptoetanol), 24 µl de cloroformo y 14 µl de 0,1 % (p/V) SDS. La mezcla se agitó vigorosamente por 10 segundos. La reacción se llevó a cabo a 30 $^oC$ y se inició por el agregado de 60 µl del reactivo o-nitrofenil-β-D-galactopiranósido (ONPG) 4 mg/ml a cada tubo, se mezclaron los reactivos y se dejó a 30ºC hasta observar coloración amarilla. La reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de 150 µl 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 µl de LB en lugar de cultivo bacteriano. La actividad enzimática se calculó según la fórmula que se describe a continuación,

$$Actividad\ \beta - galactosidasa(U.Miller) = \frac{DO_{405}^{1} + DO_{405}^{2}}{2xDO_{600}x\Delta t} x1000$$

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.

## 3.9. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

Las determinaciones de CIM de las diferentes cepas a analizar se realizaron sembrando 20 µl de una dilución 5 x $10^{-7}$ en PBS 1X de un cultivo crecido hasta saturación en placas de LB agar conteniendo concentraciones crecientes de $AuHCl_4$. Las placas se incubaron a 37ºC durante 16 horas en condiciones aeróbicas. Se consideró como CIM a la concentración de metal en la placa de LB agar en la que no se observó crecimiento de colonias.

## 3.10. Curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio rico LB ajustado a pH 7 (Sección 3.2) 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 en un volumen final de 100 µl conteniendo una dilución 1/100 de un cultivo saturado de la cepa a ensayar, $AuHCl_4$ a una concentración final de 5 µM, y cristal violeta o azul de metileno según se indique. Se registraron los valores de DO cada una hora durante 16 horas.

## 3.11. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína.

### 3.11.1. Fosforilación de oligonucleótidos.

La reacción de fosforilación del oligonucleótido Pges-foot-R se llevó a cabo en un volumen de 15 µl, conteniendo solución de fosforilación comercial suplementada

con 45 µCi de [γ-$^{32}$P]ATP (3000 mCi/µmol, 10 µCi/µl, New England Nuclear), 15 pmoles del oligonucleótido, y 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Promega). Se incubó 30 minutos a 37 ºC, y luego se detuvo la reacción por inactivación de la enzima, calentando la mezcla a 65 ºC durante 10 minutos. Se separaron 3 µl del oligonucleótido marcado para las reacciones de secuenciación (sección 3.11.5) y el resto se utilizó para amplificar mediante PCR el fragmento del promotor de *gesABC.*

### 3.11.2. 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 (Pges-foot-R) y uno no marcado (Pges-Fw). 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 una absorbancia de 1 260 nm equivale a 50 µg/ml de ADN. 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.

### 3.11.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida.

La interacción de las proteínas GolS y CpxR con la región promotora del *gesABC* fue analizada mediante la técnica de retardo de la movilidad electroforética de Lane y colaboradores (Lane y col., 1992).

El fragmento de ADN correspondiente a la región promotora fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos Pges-Fw y Pges-foot-R. Previamente se fosforiló el extremo 5´ del oligonucleótido reverso con $^{32}$P por medio de la oligonucleótido quinasa T4 (Invitrogen), como se describe en el punto 3.11.1.

Aproximadamente 6 fmoles (15 ng) de la sonda marcada fueron incubados con diferentes cantidades (indicadas en la leyenda de la figura 6.5) de GolS y/o CpxR purificadas, según corresponda, por 20 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo además *buffer* comercial

React[3] (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, utilizado para fosforilar al regulador CpxR. 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 desnaturalizantes de concentración final 8% (p/V) de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) para los ensayos de retardo realizados para la interacción con la sonda de GolS o CpxR por separado. 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. Alternativamente, para la determinación de la unión conjunta a la sonda de los reguladores GolS y CpxR se utilizó un gel en gradiente de sacarosa entre 3-8% (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.

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una intensidad de corriente de 10 mA por gel. Los geles fueron secados a 80 ºC durante 60 minutos en un desecador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT), para luego ser incubados 24 horas en un cartucho específico con una pantalla que capta las emisiones de fósforo que posteriormente fue escaneada en el analizador STORM (Amersham Biosciences).

### 3.11.4. 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 3.11.3 utilizando GolS y/o CpxR según se indique y 6 fmoles de ADN marcado. Luego de 30 minutos de incubación a 37 ºC, se adicionaron 60 µl de $H_2O$ destilada, 10 µl de solución 10 X de ADNasa I compuesta por 400 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM $MgSO_4$ y 10 mM $CaCl_2$ y 1 U de ADNasa I (RQ1 DNAse, Promega), y se incubó a 25 ºC 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 ºC durante 16 horas minutos, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos, se lavó con 70 % (V/V) etanol, y se secó a 37 ºC. El precipitado se resuspendió en 7 µl de solución de siembra desnaturalizante (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.

**3.11.5. 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 $^{32}$P como oligonucleótido y, se siguieron las instrucciones del fabricante del *kit* de secuenciación (Promega). Al finalizar, las reacciones se mezclaron con solución de siembra desnaturalizante 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 ºC 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. Los geles se secaron a 80 ºC durante

90 minutos en un secador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT) y se revelaron utilizando un cartucho de exposición para el escáner STORM.

## 3.12. Expresión y purificación de GolS y CpxR nativas.

### 3.12.1. Purificación de GolS.

Las cepa de *E. coli* XL1-blue/pGolS (PB3624) fue crecida en LB suplementado con Amp y Tc, con agitación constante a 37 ºC hasta saturación del cultivo. Luego se realizó una dilución del cultivo 1/100 en 300 ml de medio fresco. Se incubaron a 37 ºC hasta alcanzar una $DO_{600}$ de 0,6, momento en que se adicionó ITPG hasta una concentración final de 0,5 mM. Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 6500 rpm a 4 ºC durante 10 minutos. Luego se resuspendieron en 30 ml de solución de sonicación (50 mM Tris pH 7,2 mM EDTA y 5 mM DTT), y se sometieron a 10 pulsos de sonicación de 10 segundos cada uno al 15 % de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600 (Sonics and Materials). El procedimiento se llevó a cabo a 4 ºC. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 20 minutos a 20000 rpm y luego sobre el sobrenadante se realizó un corte con sulfato de amonio al 45 %, conservando la fracción insoluble que fue colectada por centrifugación a 20000 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 de sonicación. 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 7 y 5 mM DTT. Se eluyó con la misma solución empleada para equilibrar la columna a través de un gradiente creciente de NaCl de 0-1,5 M. La fracción de interés, colectada entre 0,8-0,85 M NaCl. Se detectó la presencia de GolS en las fracciones colectadas por 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; 50 mM NaCl).

### 3.12.2. Purifucación 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 ºC hasta saturación del cultivo. Luego se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 300 ml de medio fresco. Se incubó a 37 ºC 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 ºC 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 sometieó 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 ºC. 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 imidizol. 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).

## 3.13. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de las proteínas purificadas según los procedimientos descriptos 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:

$$\text{Concentración} = Abs_{280nm}/\text{paso óptico de la cubeta x coeficiente de extinción molar } (\varepsilon)$$

El coeficiente de extinción molar de una proteína ($\varepsilon$ ) 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 GolS y CpxR fueron calculados según la siguiente fórmula:

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

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

## 3.14. Electroforesis de proteínas.

Los lisados celulares de las distintas cepas de *Salmonella* y *E. coli* crecidas en presencia o ausencia de metales, así como las fracciones eluídas durante la purificación de GolS o CpxR nativas se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (Yanisch-Perron y col., 1985). Antes de la siembra, las muestras se calentaron 3 minutos a 100 ºC 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 Coomasie 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.

## 3.15 Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (*Western blot*).

La detección de la expresión de GolS a partir de *Salmonella* o *E. coli* a partir de extractos celulares separados por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en el punto 3.14 fueron electrotransferidas 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 1/100 de anticuerpos policlonales de conejo anti-GolS. Una vez finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS/leche. Posteriormente, la membrana se incubó durante una hora con anticuerpo anti-conejo conjugada a peroxidasa de rábano (General Electric Healthcare), diluido 1/3000 en la misma solución TBS/leche. Para el revelado se utilizó el *kit* comercial Amersham™ ECL™ Plus (General Electric Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, la membrana fue escaneada utilizando el analizador STORM (Amersham Biosciences).

## 3.16. Herramientas bioinformáticas.

Los motivos consenso para los sitios de unión de CpxR, BaeRS, RscB fueron generados entrenando el programa MEME (Bailey y col., 2006) con los sitios de unión de estas proteínas presentes en *Salmonella*. Para generar la matriz de CpxR, se consideraron los operadores corriente arriba de los genes *degP*, *ppiA*, *yihEdsbA*, *motABcheAW*, *ygjT*, *ppiD*, *CpxRA*, *cpxP*, *y csgBAC*. En el caso de BaeRS se consideraron los operadores de los genes *mdtABC*, *acrD*, y los dos sitios del gen *sodA*, *sodA*(1) y *sodA*(2); mientras que para RcsB, se consideraron los operadores de los genes *katE*, *osmB*, *osmY*, *spy*, *ydcF*, *ydjR*, *yghA*. Se consideró como restricción para el programa que encuentre sólo un motivo en cada secuencia. La matriz obtenida luego fue utilizada para buscar nuevos motivos en una región de 900 pares de bases del genonoma de *Salmonella* que comprenden aproximadamente una región entre 300 pb corriente abajo de *gesA* hasta 300 pb corriente abajo de *golT* (figura 6.1) mediante el programa MAST (Bailey y Gribskov, 1998).

## 3.17. Modelado matemático y ajuste de datos

Para el modelado matemático de la expresión de los sensores nos centramos en el comportamiento promedio de una población de *E. coli* en estado estacionario. Se utilizó un modelo determinista basado en ecuaciones diferenciales ordinarias para el modelado de la regulación génica y la expresión del reportero. Entre estas se incluyen la expresión basal de una proteína, el decaimiento en la expresión de una proteína y la

función de Hill (que en teŕminos generales describe la interacción cooperativa entre un ligando y un receptor, que en este caso es un metal y un sensor). En la figura se muestra un diagrama de la arquitectura de un promotor "ideal" que responde a una señal ambiental.

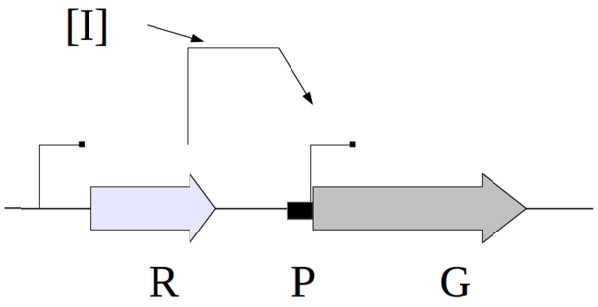



**Figura 3.4. Arquitectura de un promotor ideal.** En un sistema reportero ideal, el gen reportero G se encuentra regulado negativamente por el regulador R en ausencia de inductor que activa la expresión del gen reportero sólo en presencia del inductor, I.

En el modelo, el promotor se P se encuentra regulado negativamente por una represor R que se expresa constitutivamente y que responde a un inductor exógeno I activando la transcripción de un gen reportero G. La expresión del gen reportero G en el estado estacionario se puede expresar de la siguiente manera (Alon, 2007; Zoltan y col., 2006):

$$f([I]) = [G] = k \times \left(\alpha + \frac{[I]^n}{K_M^n + [I]^n}\right)$$ Función de Hill

donde *k* representa el máximo de inducción alcanzado, $K_M$ y n son la constante y el coeficiente de Hill que se relacionan con las interacciones del promotor-regulador y el inductor. En este caso $K_M$, es la concentración del inductor cuando la expresión del reportero es del 50%, y n es la pendiente de la curva en este punto, $\alpha$ es una constante relacionada al nivel basal de expresión del reportero ($0 \leq \alpha < 1$). Esta ecuación, a la que denominamos función de Hill, se utilizó para ajustar los datos de expresión de los bioreporteros caracterizados en esta Tesis utilizando un ajuste no lineal en el programa Prism. En todos los casos se corroboró que los datos sigan una distribución normal. Los ajustes se realizaron con un intervalo de confianza del 95%.

# 4. Capítulo I

*"Diseño y construcción de biosensores bacterianos selectivos para la detección de oro"*

## 4.1. Introducción

Como se mencionó en la introducción, a partir del desarrollo del biosensor bacteriano hace más de 20 años para la detección de naftaleno (King y col., 1990) este tipo de tecnología se ha convertido en una gran área de investigación y desarrollo, en especial en la detección de metales. Muchos de los diseños se basan en los sistemas de resistencia a metales controlados por reguladores de la familia MerR que son capaces de detectar una amplia variedad de metales con muy buena sensibilidad (Tabla 1.2).

Estos bioreporteros han demostrado ser útiles en la determinación de metales como Hg, Zn, Cd y Cu, entre otros, en muestras de suelo o agua que han sido modificadas artificialmente (Brandt y col., 2008; Ivask y col., 2009). Su gran ventaja respecto a los biosensores moleculares y los métodos analíticos es que permiten evaluar no sólo la biodisponibilidad sino también la toxicidad de los metales sobre un organismo vivo (van der Meer y Belkin, 2010).

En el diseño de un biosensor bacteriano robusto, es necesario utilizar un reportero que sea fácil de detectar y cuantificar (preferiblemente de forma no invasiva), altamente sensible e, idealmente, no presente en la organismo nativo (Daunert y col., 2000). La principal ventaja de la utilización de GFP frente a otras proteínas reporteras como β-galactosidasa es que no requiere la adición de sustrato alguno para las determinaciones. Además, es estable a pH biológico y no existen homólogos endógenos en la mayoría de los sistemas (Hakkila y col., 2002).

Previamente en nuestro laboratorio, se caracterizó el sensor de la familia MerR GolS de *S.* Typhimurium, que detecta la presencia de iones $Au^{+1}$ en el citoplasma de la bacteria y controla transcripcionalmente la expresión de factores requeridos para la resistencia a este metal. A diferencia de otras proteínas relacionadas como el sensor de Cu CueR, GolS es capaz de discriminar $Au^{+1}$ de otros iones metálicos monovalentes, como $Cu^{+1}$ o $Ag^{+1}$ (Checa y col., 2007; Ibáñez y col., 2013; Pérez Audero y col., 2010). Sobre la base de esta característica del sistema *gol* de resistencia a Au, nos propusimos desarrollar sistemas biosensores bacterianos fluorescentes para la detección de iones de Au que permitan detectar al metal de forma sencilla, pero con alta eficiencia, y que puedan ser de utilidad en el campo de la minería.

Como parte de mi trabajo de Tesis de Grado de la Licenciatura en Biotecnología (Cerminati, 2009), en el laboratorio generamos un plásmido reportero que lleva el gen *gfp* de *Aequorea victoria* bajo el control del promotor del gen *golB*, controlado por GolS, utilizando como vector en el plásmido de amplio rango de hospedador y mediano número de copia pPROBE-NT (Miller y col., 2000). Este plásmido, al que denominamos PgolB-gfp, fue introducido en las cepas de *S.* Typhimurium 14028s y mutantes en los reguladores *golS* y *cueR* para verificar la expresión del reportero dependiente de GolS y su respuesta específica a la presencia de $AuHCl_4$ tanto en medio líquido a concentraciones fijas de metal como en medio sólido. De esta manera, verificamos que la expresión del reportero GFP se induce en presencia de Au de manera dependiente de GolS. La respuesta a metales con propiedades fisicoquímicas similares como Cu o Ag, fue muy pobre, en tanto que no se observó respuesta a otros metales (Cerminati, 2009). Como resultado de estos estudios verificamos que el correcto funcionamiento del sistema bioreportero basado en GolS por lo que decidimos en este trabajo de Tesis Doctoral proseguir con estudios tendientes a la optimización y calibración del sistema de detección en *Salmonella* y su transferencia a una cepa no patógena de *E. coli* para validar su uso como biosensor.

## 4.2. Resultados y discusión.

### 4.2.1. Evaluación de un bioreportero fluorescente específico para oro en *Salmonella*

Continuando con la calibración del sistema de detección de Au, se evaluó la capacidad del mismo para detectar distintos compuestos que contienen Au y otros metales de transición. Para ello, se determinó la fluorescencia emitida por las bacterias que transportan el reportero PgolB-gfp cultivadas en medio mínimo SM9 (materiales y métodos, sección 3.2) o medio LB luego de 3 horas de incubación en presencia de agua o concentraciones subletales de distintos compuestos de Au y sales de otros metales de transición. En los ensayos se utilizó una concentración final de 40 μM AuHCl4, 40 μM $KAu(CN)_2$, 10 μM Auranofina (1-tio-β-D-glucopiranosa de trietilfosfina de $Au^{+1}$), 10 μM $AgNO_3$, 20 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 100 μM $ZnCl_2$, 80 μM $CdCl_2$, 5 μM $HgCl_2$, en medio mínimo, en tanto que en medio rico las concentraciones finales utilizadas fueron 40 μM AuHCl4, 40 μM $KAu(CN)_2$, 10 μM Auranofina y 2 mM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. Previo al

ensayo se determinó la concentración inhibitoria mínima para cada metal en las condiciones de cultivo empleadas. Como se observa en la figura 4.1 todas las sales de Au indujeron la máxima expresión del gen reportero. En medio mínimo (figura 4.1 A) se observó una inducción de aproximadamente 550 veces en presencia de $AuK(CN)_2$; 535 en presencia de AuHCl4; y 590 en presencia de auronofina, en relación al cultivo sin metal. Tal como habíamos determinado previamente (Cerminati, 2009), las sales de Cu y Ag sólo produjeron cambios menores en la fluorescencia comparados con la respuesta a Au, de 4,26 para el Cu y 3,12 para la plata, y no se observó inducción significativa de la expresión del gen reportero en presencia de otros metales de transición. En medio rico LB se obtuvieron resultados similares (fig 4.1 B), aunque en estas condiciones se alcanzaron niveles de expresión mayores que en medio mínimo. El

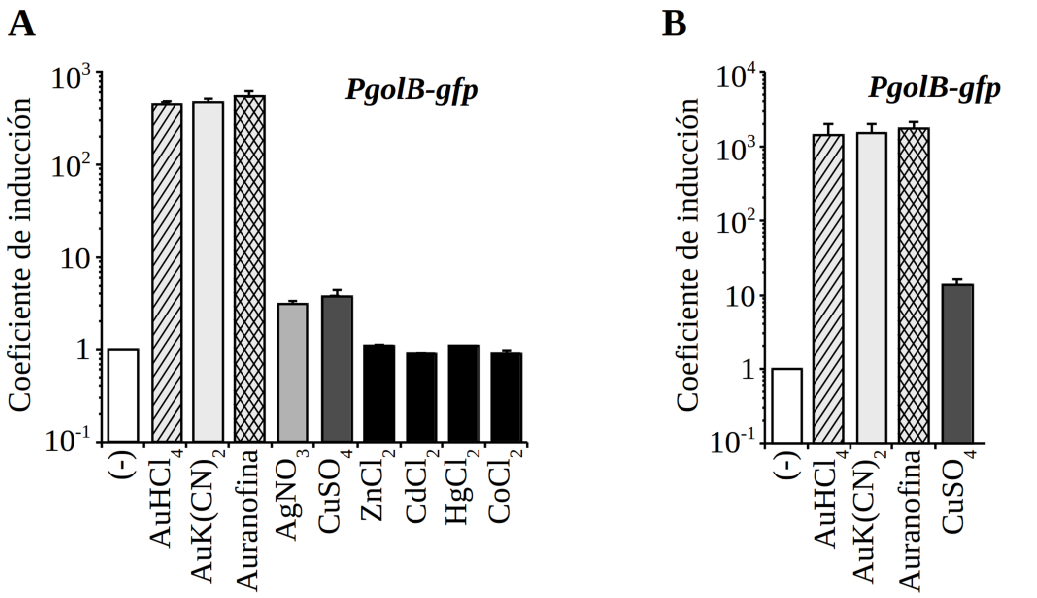



**Figura 4.1. Respuesta del bioreportero construido en *Salmonella* a concentraciones subletales de diferentes metales. A.** Respuesta relativa de la cepa *Salmonella* 14028 que lleva el plásmido reportero PgolB-gfp determinada en medio SM9 luego de tres horas de incubación en presencia de concentraciones subletales de $AuK(CN)_2$, $AuHCl_4$, Auranofina, $AgNO_3$, $CuSO_4$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$ y $HgCl_2$. **B.** Respuesta relativa de la cepa *Samonella* 14028 que lleva el plásmido reportero PgolB-gfp determinada en medio LB luego de tres horas de incubación en presencia de concentraciones subletales de $AuHCl_4$, $AuK(CN)_2$, Auranofina, o $CuSO_4$. Los gráficos muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados por triplicado. Coeficiente de inducción corresponde a la relación entre las unidades específicas de fluorescencia (UEF) con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

máximo nivel de expresión del sensor en presencia de iones Au fue de ~1300 veces de aumento con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal; y nuevamente, el

sensor fue capaz de detectar distintas especies de iones Au. Por el contrario, la máxima inducción en presencia de Cu fue de apenas 10 veces respecto a la muestra sin metal y esta se alcanza a una concentración de $CuSO_4$ de 2 mM. Sin embargo, en ambas condiciones de cultivo se obtuvieron índices de discriminación Au/Cu similares, de 127 en SM9 y 130 en LB. Este parámetro relativiza los valores máximos de inducción del sistema en presencia Au respecto a Cu y confirma que el sistema bioreportero desarrollado es efectivo para discriminar Au de Cu en las distintas condiciones ensayadas. Esto es relevante si se quiere utilizar el este sistema de detección de Au en muestras del ambiente en las que estos metales fisicoquímicamente muy similares se encuentran fuertemente asociados junto con Ag formando aleaciones que poseen concentraciones de oro que varían entre el 50 y el 80 %p/V (Reith y col., 2007). Además, la capacidad de detectar oro formando parte de compuestos inorgánicos o complejos orgánicos e independientemente del estado de oxidación del mismo ($Au^{+1}$ u $Au^{+3}$), es importante cuando se quiere detectar el metal biodisponible en muestras complejas, donde no se conoce a priori el/los compuestos de Au presentes.

### 4.2.2. Comparación del desempeño del bioreportero fluorescente con otros bioreporteros.

Otra forma de validación del sistema bioreportero desarrollado es compararlo con dispositivos similares. Esto es, bioreporteros basados en el mismo sistema de regulación pero que produzcan otra señal reportera, o que se basen en sistemas de regulación similares como el sistema de resistencia a cobre *cue* también presente en *Salmonella*.

Para validar la eficiencia del sistema reportero utilizamos una cepa de *S.* Typhimurium que transporta un plásmido que expresa la enzima β-galactosidasa bajo el control del promotor P*golB* desarrollado previamente en el laboratorio (Pérez Audero y col., 2010). Para esto, se determinó la expresión de este reportero y del reportero *gfp* en paralelo en cepas cultivadas medio mínimo SM9; en presencia de sales de Au, Cu y Ag por 3 horas. El nivel de expresión de la enzima β-galactosidasa obtenido en presencia de $AuK(CN)_2$ fue alrededor de 150 veces superior al obtenido en ausencia de metal (fig. 4.2 A y B). Sin embargo, estos valores se encuentran muy por debajo de los valores máximos obtenidos con el bioreportero fluorescente (~550 veces de inducción) en las

mismas condiciones. Por otra parte, el reportero β-galactosidasa presentó un índice de discriminación Au/Cu de ~25, también muy por debajo del valor obtenido para el bioreportero fluorescente (127). En base a estos resultados podemos concluir que el bioreportero fluorescente es más eficiente para la detección de Au en las muestras. Además, presenta una ventaja adicional respecto al bioreportero basado en la enzima β-galactosidasa, ya que a diferencia de éste el reportero fluorescente no necesita del agregado de ningún sustrato para reportar la señal, lo que lo hace también más económico y fácil de utilizar.

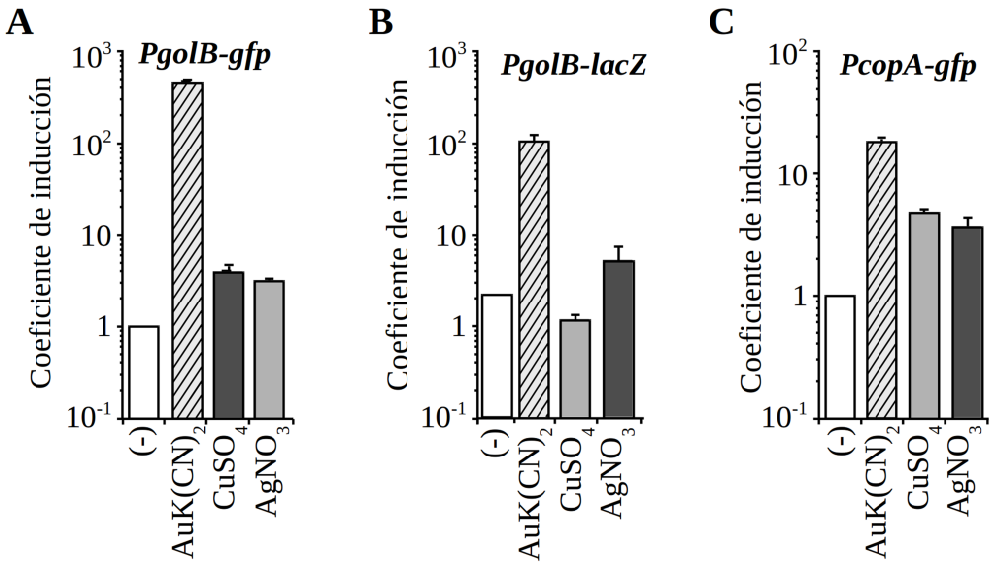



**Figura 4.2. Desempeño de distintos bioreporteros.** Respuesta relativa de cepas de *Salmonella* que llevan los plásmidos reporteros PgolB-gfp (A); PgolB-lacZ (B) o PcopA-gfp (C) determinada en medio SM9 luego de tres horas de incubación en ausencia de metal (-) o en presencia de 40 μM $KAu(CN)_2$, 20 μM $CuSO_4$ o 10 μM $AgNO_3$. Los gráficos muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por triplicado. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Para obtener un reportero basado en el regulón *cue* de resistencia a Cu de *Salmonella* generamos un plásmido reportero que lleva el gen *gfp* bajo el control del promotor del gen *copA*, controlado por CueR, utilizando como vector el mismo plásmido utilizado para la construcción del reportero fluorescente de Au, pPROBE-NT (Miller y col., 2000), al que denominamos PcopA-gfp (Materiales y Métodos, sección 3.3.1.10). Este plásmido reportero fue introducido en la cepa silvestre de *S.* Typhimurium para su evaluación. Como se observa en la Fig. 4.2 A y C, el reportero

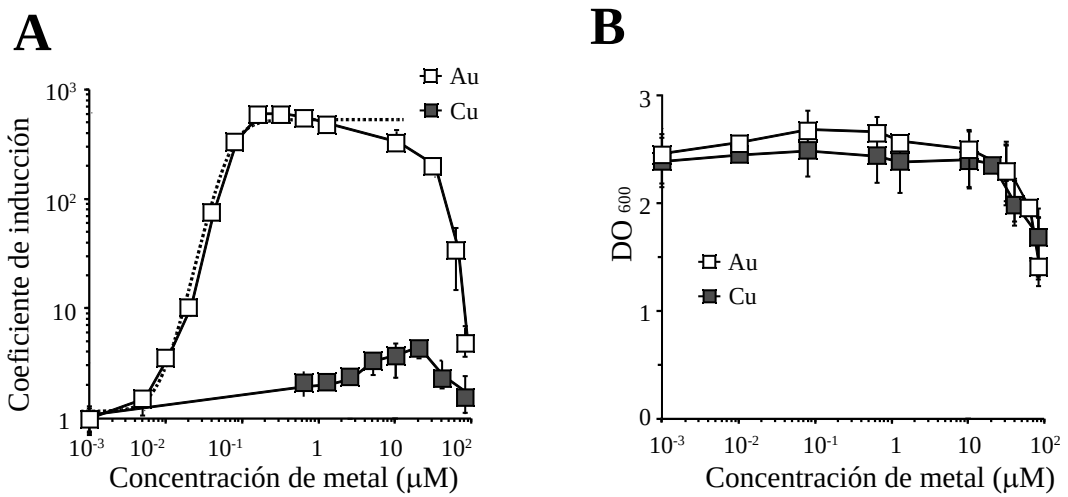
basado en GolS mostró una mayor inducción y un mayor índice de discriminación Au/Cu que el reportero que expresa GFP bajo el control del promotor de *copA* (PcopA-gfp), controlado por CueR. La fluorescencia del bioreportero basado en GolS aumentó más de 500 veces en presencia de Au, con un índice de discriminación Au/Cu mayor a 100, mientras que el basado en CueR mostró sólo un incremento de la fluorescencia en presencia de Au de 11 veces y un índice de discriminación menor a 5.

*Los resultados hasta aquí presentados demuestran que el bioreportero fluorescente basado en el regulón gol funciona adecuadamente en Salmonella para la detección específica de iones de Au en el medio (tanto $Au^{+1}$ como $Au^{+3}$ formando parte de sales inorgánicas o complejos orgánicos), ya que emite fluorescencia en presencia de sales de Au, pero no detecta otros metales de transición, como el Zn o el Hg así como tampoco detecta Cu ni Ag, metales con los que el oro comparte varias características fisicoquímicas. Además esta construcción bioreportera demostró ser más efectiva en la detección de Au que una construcción similar que expresa el reportero β-galactosidasa u otro bioreportero fluorescente basado en el sistema de regulación homólogo cue.*

### 4.2.3. El bioreportero fluorescente en *Salmonella* detecta un amplio rango de concentraciones de oro.

Continuando con la caracterización del bioreportero fluorescente desarrollado y a fin de determinar el rango de concentraciones de Au detectadas y el límite de detección del dispositivo, se analizó la expresión del reportero en células cultivadas en medio mínimo SM9 en presencia de cantidades crecientes de $AuK(CN)_2$ o $CuSO_4$. La inducción se realizó cuando las bacterias alcanzaron una densidad óptica a 600 nm ($DO_{600}$) de 0,5 y luego se incubaron los cultivos por 3 horas a 37 ºC, con agitación. Como se observa en la figura 4.3 A, la expresión de GFP se incrementa con la cantidad de $AuK(CN)_2$ presente en el medio, alcanzando su máximo nivel a una concentración de metal de 1,25 μM de ~550 veces, en comparación con el cultivo sin metal. La señal continúa siendo máxima hasta una concentración de 80 μM, concentración a la cual la fluorescencia del cultivo disminuye debido a la toxicidad del metal (fig. 4.3 B). Por su parte, la expresión en presencia de Cu es mucho menor. La máxima inducción en presencia de este metal, que es apenas 4,26 veces respecto a la muestra sin metal, se

alcanza a una concentración de $CuSO_4$ de 20 μM (Fig. 4.3 A), concentración por encima de la cual el metal resulta tóxico, toxicidad que se evidencia por el decaimiento en la DO del cultivo (Fig. 4.3 B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente utilizando concentraciones fijas de metal (figura 4.1).




**C**

| k | n | $K_M$ | α | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| 542,7 ± 30,9 | 2,86 ± 0,01 | 0,15 ± 0,01 | 0,0021 ± 0,0003 | 0,967 |

**Figura 4.3. Respuesta del bioreportero fluorescente a Au. A.** Curvas dosis respuestas del bioreportero a concentraciones variables de $AuK(CN)_2$ (Au) y $CuSO_4$ (Cu) crecido por 3 horas en medio mínimo SM9 a 37 °C con agitación. Los resultados muestran el promedio al menos 5 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. La línea punteada muestra el ajuste realizado sobre los datos utilizando la función de Hill**. B.** Densidad óptica final a 600 nm ($DO_{600}$) alcanzada por los cultivos a las mismas condiciones en A. **C.** Parámetros del ajuste a la función de Hill realizado con un 95% de confianza sobre la curva dosis-respuesta a Au del biosensor. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

A fin de calibrar el bioreportero en cuanto a su efectividad para detectar oro, los datos obtenidos de la curva de la Fig. 4.3 A para Au fueron ajustados a la función de Hill, un modelo matemático determinista basado en ecuaciones diferenciales ordinarias, que en teŕminos generales describe la interacción cooperativa entre un ligando y un receptor, en este caso un metal y un sensor en una población de *E. coli* en estado estacionario. (Materiales y Métodos, sección 3.16). La función se expresa de la siguiente manera (Alon, 2007; Zoltan y col., 2006):

$$[G] = k \times \left(\alpha + \frac{[I]^n}{K_M^n + [I]^n}\right)$$ (1) (función de Hill)

donde [G] es la respuesta del reportero; k es el máximo nivel de expresión alcanzado por el sistema; $\alpha$ es una constante relacionada al nivel basal de expresión del reportero ($0 \leq \alpha < 1$); y $K_M$ y n son la constante y el coeficiente de Hill que se relacionan con las interacciones del promotor-regulador y el inductor. En este caso $K_M$, es la concentración del inductor cuando la expresión del reportero es del 50%, y n es la pendiente de la curva en este punto.

Los datos obtenidos para el bioreportero en presencia de Au se ajustan muy bien al modelo (Fig. 4.3 A, línea punteada) con un coeficiente de determinación corregido, $R^2$, de 0,967. Este valor indica cuan bien los valores experimentales se ajustan al modelo (cuanto más cercano a 1 es el valor, mayor es la relación entre los datos experimentales y el modelo). A partir del ajuste (Fig. 4.3 C), se calculó el valor máximo de inducción en 542,7 ± 30,9 veces en relación al cultivo sin el agregado de metal; valor que se alcanza a una concentración de Au de 1,25 μM. Además, se determinó el límite de detección como la mínima concentración de oro que induce la expresión del reportero a partir de la ecuación $2(F_B+3\ DS)/F_B$, donde $F_B$ es la fluorescencia basal media del sensor (sin el agregado del metal) y DS es la desviación estándar (Long y Winefordner, 1983). El valor obtenido fue de 21,75 nM (unas 4,28 ppb) de iones Au, cantidad de metal a la que se detecta un incremento de fluorescencia de 3,46 veces.

Bajo las condiciones ensayadas, el bioreportero fluorescente en *Salmonella* muestra un rango de detección (definido como el rango de concentraciones en que el sensor emite una señal detectable) muy amplio, ya que detecta concentraciones Au que van desde 21,75 nM a 80000 nM (80 μM). El rango de detección efectivo, es decir el rango de concentraciones útil para realizar cuantificaciones (entre el límite de detección y el nivel de máxima inducción) fue de 21,75 – 1250 nM de Au. Estos valores indican que, *a priori*, el sensor resulta adecuado para la detección de Au en muestras provenientes del ambiente, donde el metal se encuentra en concentraciones que van desde las 4 ppb en la corteza terrestre, hasta unas 4000 ppb (20 μM) en los yacimientos económicamente rentables.

### 4.2.4. Transferencia del sistema bioreportero a *E. coli.*

#### 4.2.4.1. Biosensores que expresan el sensor/regulador GolS a partir de plásmidos.

Los resultados obtenidos hasta aquí muestran que el sistema *gol* es apropiado para el desarrollo un biosensor bacteriano específico para Au. Sin embargo, este sistema se encuentra en una bacteria patógena, por lo que surge la necesidad de transferirlo a otro organismo. En ese sentido, *E. coli* ha sido ampliamente utilizada como bacteria residente de distintos dispositivos biosensores (Robbens y col., 2010). No sólo es la bacteria más estudiada tanto microbiológica como genéticamente sino que hay muchas técnicas genéticas disponibles para este organismo. Los conocimientos adquiridos sobre sus mecanismos de señalización así como el amplio repertorio de cepas disponibles la favorecen para su aplicación en el desarrollo de biosensores sobre otras bacterias. Se ha utilizado a esta bacteria exitosamente para determinar la toxicidad de metales puros y mezclas de metales y se ha demostrado que *E. coli* se puede aplicar en la detección de los mismos a partir de una gran variedad de muestras provenientes del agua, suelo y sedimentos entre otros (Ivask y col., 2009; Stocker y col., 2003; Tsang y col., 1998)

Nos propusimos entonces utilizar *E. coli* como bacteria residente del sistema detector de oro para facilitar su uso en el análisis de muestras del medioambiente. Sin embargo, *E. coli* carece en su cromosoma del locus *gol*, por lo que no posee el gen que codifica para el regulador transcripcional GolS. Por esta razón, en primer lugar, decidimos expresar el regulador transcripcional desde plásmidos de amplio rango de hospedador para que posibilitaran además la transferencia del sistema bioreportero a otras bacterias además de *E. coli*. Para ello, se clonó el gen *golS* proveniente del plásmido pUH::*golS* (Materiales y Métodos, sección 3.3.1.10, Checa y col., 2007) en el plásmido pSU8 (Bartolomé y col., 1991), de manera que el mismo quedara bajo el control del promotor inducible por IPTG, P*lac*. Esta construcción, a la que denominamos pGOLS-Cm, fue introducida por transformación en una cepa de *E. coli* MC1061 que transporta el plásmido reportero PgolB-gfp.

Se analizó el desempeño del nuevo biosensor en las mismas condiciones empleadas anteriormente, es decir, se realizaron determinaciones de la fluorescencia en medio mínimo SM9 en presencia de cantidades variables de Au o Cu o sin metal. Como

se observa en la figura 4.4, la fluorescencia se incrementa con la concentración de Au, aunque los incrementos fueron modestos en comparación con la inducción por Au observada en la cepa original de *Salmonella.* Por ejemplo, la fluorescencia se

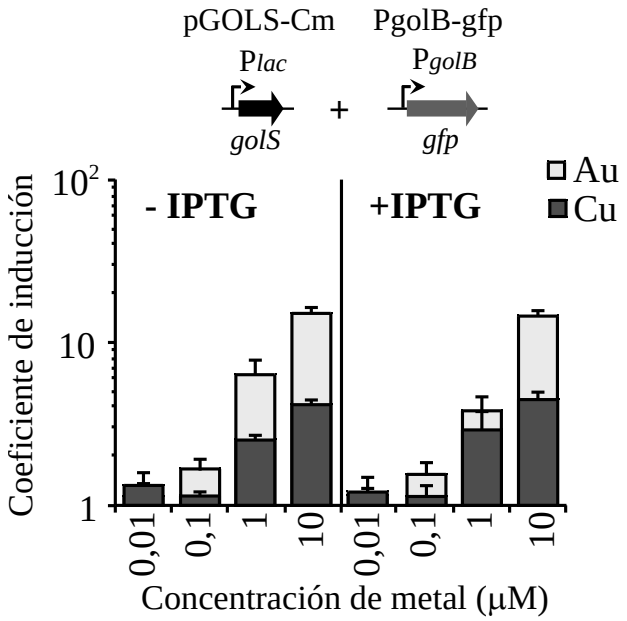



**Figura 4.4. Desempeño del biosensor fluorescente en *E. coli* cuando GolS se expresa a partir de un promotor heterólogo.** Respuesta relativa a $AuK(CN)_2$ (Au) o $CuSO_4$ (Cu) de la cepa de *E. coli* que lleva los plásmido pGOLS-Cm y PgolB-gfp, crecidas en medio SM9 a 37 °C con agitación por 3 horas. En la parte superior de la figura se esquematizan las partes relevantes de las construcciones plasmídicas utilizadas. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

incrementó 10,5 veces en presencia de 10 μM de $AuK(CN)_2$, en tanto que en las mismas condiciones el bioreportero en *Salmonella* presentó un incremento en la fluorescencia de 550 veces. Además, el biosensor en *E. coli* muestra prácticamente los mismos niveles de expresión de GFP en presencia de Cu que los observados en *Salmonella*. Esto reduce ampliamente el índice de discriminación Au/Cu del dispositivo a ~3,3 (para una concentración de 10 μM de cada metal) en tanto que en las mismas condiciones el índice de discriminación calculado para el bioreportero en *Salmonella* fue de 127,4 (índice calculado en base a los datos de la fig 4.3). Además, el agregado de IPTG no produjo diferencias en los resultados obtenidos.

Estas diferencias observadas con respecto al bioreportero fluorescente en *Salmonella* podrían deberse a un incremento en la expresión basal del regulador en *E.*

*coli* debido a que el gen *golS* se encuentra en múltiples copias en un plásmido. Además, la expresión de GolS a partir del promotor heterólogo *lac* podría ser elevada, aún en ausencia del inductor IPTG, ya que la bacteria no expresa el represor LacI. Por el contrario, en *Salmonella* el gen *golS* se encuentra en copia única en el cromosoma y además se autorregula (Checa y col., 2007), por lo que las cantidades de regulador presente en ausencia de Au son ínfimas. En el laboratorio previamente reportamos que en ausencia de metal la cantidad de GolS presente en el citoplasma de *Salmonella* es de 18 ± 9 nM, es decir, menos de cuatro dímeros por célula. Esta cantidad se incrementa 430 veces en presencia de 40 μM de Au (Pérez Audero y col., 2010). Por lo tanto, postulamos que el exceso de la proteína reguladora disponible en condiciones de no inducción resulta en una expresión incrementada del reportero GFP desde el plásmido en condiciones basales, y la consecuente pérdida de sensibilidad del biosensor. De hecho, la cepa de *E. coli* biosensora presenta un nivel basal de expresión 5,05 veces mayor (5470 unidades específicas de fluorescencia, UEF) que el de una cepa que lleva el plásmido pSU8 vacío (1083 UEF) y 31 veces el valor basal en *Salmonella* (176 UEF).

Para mejorar el desempeño del biosensor, decidimos expresar el sensor/regulador GolS a partir de plásmidos, pero bajo el control de su propio promotor. Además, para facilitar la futura transferencia a otras bacterias decidimos incluir el gen *golS* en el mismo plásmido que lleva la construcción reportera, un derivado de $prep_p$ BBR1 que posee un amplio rango de hospedador (Miller y col., 2000). Para ello clonamos el gen *golS* con su promotor en dos arreglos génicos distintos: uno conservando el arreglo génico del locus *gol* en *Salmonella*, es decir P*golTS*-*golS*-P*golB*; y el otro con los genes en orientación trancripcional divergente, a fin de disminuir posibles aumentos en la expresión basal del reportero GFP a partir de la transcripción desde el promotor P*golTS*, ya que no existe un terminador transcripcional entre los genes *golS* y *golB.* De esta manera, obtuvimos dos construcciones plasmídicas: pGOLS-GFP y pGOLS(R)-GFP, cuyas partes relevantes se esquematizan en la figura 4.5 y se detallan en la sección 3.3.1.10 de Materiales y Métodos.

Los plásmidos fueron introducidos en la cepa de *E. coli* MC1061 y se analizó la respuesta de estas construcciones reporteras en las mismas condiciones utilizadas anteriormente. En ambos casos se observó un aumento en la fluorescencia con la concentración de Au, aunque nuevamente los incrementos fueron modestos en

comparación con la inducción por Au observada en la cepa original de *Salmonella*, y los niveles de expresión de GFP en presencia de Cu se conservaron. Por ejemplo, para la construcción pGOLS-GFP, la fluorescencia se incrementó 12,5 veces en presencia de 10 μM de $AuK(CN)_2$, y 4,2 veces en presencia de Cu, con un índice de discriminación de 2,97. Por su parte la cepa de *E. coli* que lleva el plásmido pGOLS(R)-GFP, presentó valores de 10,7 y 1,89 veces de inducción en presencia de 10 μM de Au y Cu, respectivamente; con un índice de discriminación de 5,66. En ambos casos, observamos un incremento en la fluorescencia basal en relación al bioreportero fluorescente en *Salmonella* de 12,23 y 10,37 (2151 y 1823 UEF) veces para las construcciones pGOLS-GFP y pGOLS(R)-GFP, respectivamente y de 3,81 y 3,61 veces con respecto a la cepa de *E. coli* que lleva el plásmido pPROBE-NT vacío (504,4 UEF).

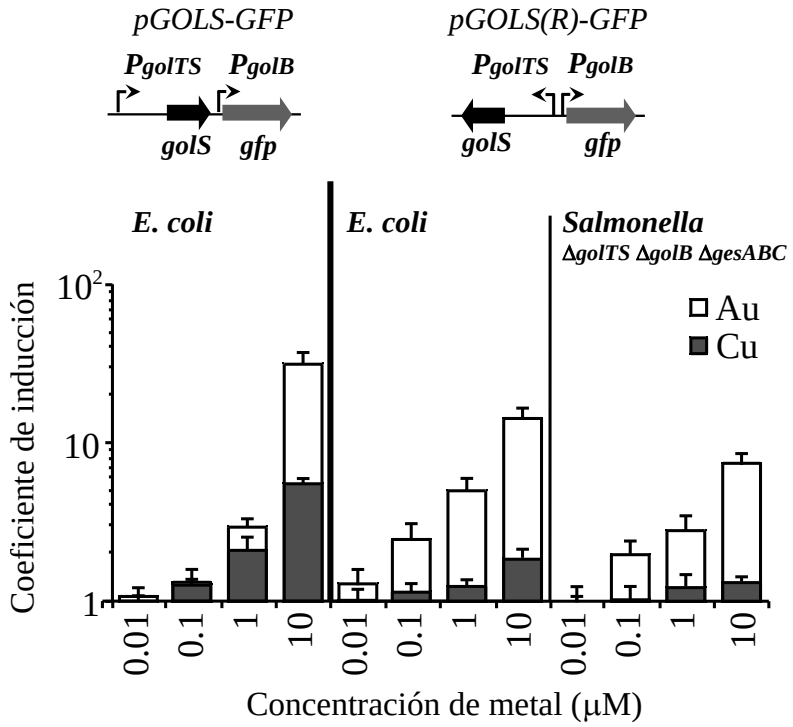



**Figura 4.5. Desempeño del biosensor fluorescente cuando GolS se expresa a partir de su promotor nativo en plásmidos.** Respuesta relativa a $AuK(CN)_2$ (Au) o $CuSO_4$ (Cu) de la cepa de *E. coli* o *Salmonela* Δ*golTS* Δ*golB* Δ*gesABC* que llevan los plásmido pGOLS-GFP o PGOLS(R)-GFP, crecidas en medio SM9 a 37 °C con agitación por 3 hs. Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. En la parte superior de la figura se esquematizan las partes relevantes de las construcciones plasmídicas utilizadas. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar

Como se discutió anteriormente, el pobre desempeño de los biosensores en *E.*

*coli* puede deberse a una expresión basal elevada del regulador transcripcional como consecuencia de encontrarse codificado en el plásmido en múltiples copias, aunque también puede ser consecuencia de diferencias en el manejo de los metales por parte de esta bacteria cuando se la compara con *Salmonella*. En este sentido es importante destacar que *E. coli* carece de todo el locus *gol*, pero posee el regulador CueR que controla la expresión del transportador CopA y la multicobre oxidasa CueO al igual que ocurre en *Salmonella*. Sin embargo, *E. coli* posee el sistema de eflujo CusABC y la chaperona periplasmática asociada CusF que contribuyen también a la resistencia a Cu en el periplama (Loftin y col., 2005), sistema que está ausente en *Salmonella* (Pontel y col., 2007), y que el patógeno compensa, al menos parcialmente, mediante la expresión de la proteína de unión a cobre periplasmática CueP controlada transcripcionalmente por CueR (Pontel 2009).

Para discernir entre estas hipótesis decidimos introducir el plásmido reportero pGOLS(R)-GFP en una cepa de *S.* Typhimurium delecionada en el locus *gol* (Δ*golTS* Δ*golB* Δ*gesABC*) que se asemeja al contexto genético de *E. coli*, y evaluamos la respuesta a sales de Au y Cu. Como se observa en la fig 4.5, el patrón de inducción en presencia de cantidades crecientes de ambos metales es similar al observado en la cepas de *E. coli* que posee el mismo plásmido reportero, aunque el incremento en la fluorescencia es incluso menor, alcanzando un valor de apenas 8,9 veces de inducción en presencia de Au. Además, también se observa un aumento de 8,94 veces en el nivel basal de expresión del sistema (1571 UEF). En base a estos resultados, podemos concluir que la expresión del sensor/regulador a partir de plásmidos produce un desbalance en la relación regulador/operador que afecta tanto la sensibilidad del dispositivo como su capacidad de discriminar oro de cobre.

#### 4.2.4.2. Biosensores que expresan el sensor/regulador GolS a partir del cromosoma de *E. coli.*

Para mejorar el desempeño de los biosensores en *E. coli* nos propusimos construir cepas de esta bacteria en las que el regulador transcripcional GolS se exprese desde el cromosoma bacteriano a partir de su promotor nativo, de modo tal que su producción en las células se encuentre autorregulada, como ocurre en *Salmonella*. Para ello, insertamos el gen *golS* con su promotor en el cromosoma de *E. coli* MC1061

mediante transformación con ADN lineal. Además, para simular las condiciones en que el sistema bioreportero funciona en *Salmonella* insertamos el operón completo *golTS* y el gen *golB* de *Salmonella.* Las inserciones se realizaron en el cromosoma de *E. coli* en una región de su genoma que se parece en su contexto genético al lugar de inserción del islote genómico en el cual se encuentra el locus *gol* en *Salmonella* (Checa y Soncini, 2011; McClelland y col., 2001). Generamos así dos cepas transgénicas de *E. coli* a las que denominamos EC-GolS y EC-GolTSB, según transporten el gen *golS* o la región *golTS-golB*, respectivamente. La estrategia utilizada para la construcción de las cepas de *E. coli* se detalla en la sección 3.6.3 de Materiales y Métodos.

En primer lugar, analizamos los niveles de expresión de GolS en las cepas transgénicas de *E. coli* cuando las bacterias se cultivan en presencia de cantidades crecientes de Au y los comparamos con los de una cepa de *Salmonella* crecida en las mismas condiciones por western blot (figura 4.6 A). Para las tres cepas analizadas, los niveles de GolS son prácticamente indetectables en ausencia de metal, pero se incrementan en proporción con la cantidad de Au presente. Estos resultados indican que el regulador se expresa en las cepas de *E. coli* de manera similar que en *Salmonella*. Sin embargo, a bajas concentraciones de Au la acumulación de GolS en el citoplasma de las cepas de *E. coli* fue de 3 a 5 veces menor que en *Salmonella*, mientras que, a una concentración de 1 μM $AuK(CN)_2$, los niveles de GolS aumentan más de tres veces en comparación con la cepa silvestre de *Salmonella*. Llamativamente y a diferencia de *Salmonella*, la proteína sensora apareció como una doble banda inmunogénica en los extractos de *E. coli* lo que probablemente evidencie un procesamiento proteolítico de la proteína heteróloga expresada en esta bacteria. Si bien no hemos realizado estudios para verificar si la forma de mayor movilidad electroforética, no presente en *Salmonella*, es activa como sensor de metales o como regulador transcripcional, la abundancia de la otra especie considerada funcional resulta similar a la encontrada en *Salmonella*, por lo que se prevé un correcto funcionamiento del sistema en *E. coli* (Fig 4.6 A). Alternativamente, dado que los anticuerpos anti GolS se realizaron a partir de una purificación de GolS a partir de cepas de *E. coli*, cabe la posibilidad de que la segunda banda inmunogénica se deba a alguna proteína que copurifique con GolS y no esté presente en *Salmonella*, a pesar de que la proteína se obtuvo a partir de la electroelusión de una banda obtenida a partir de un gel de poliacrilamida.

Las cepas EC-GolS y EC-GolTSB fueron transformadas posteriormente con el

plásmido PgolB-gfp, el mismo plásmido bioreportero fluorescente utilizado en *Salmonella*, a fin de evaluar su respuesta a Au y Cu. Como se observa en la figura 4.6

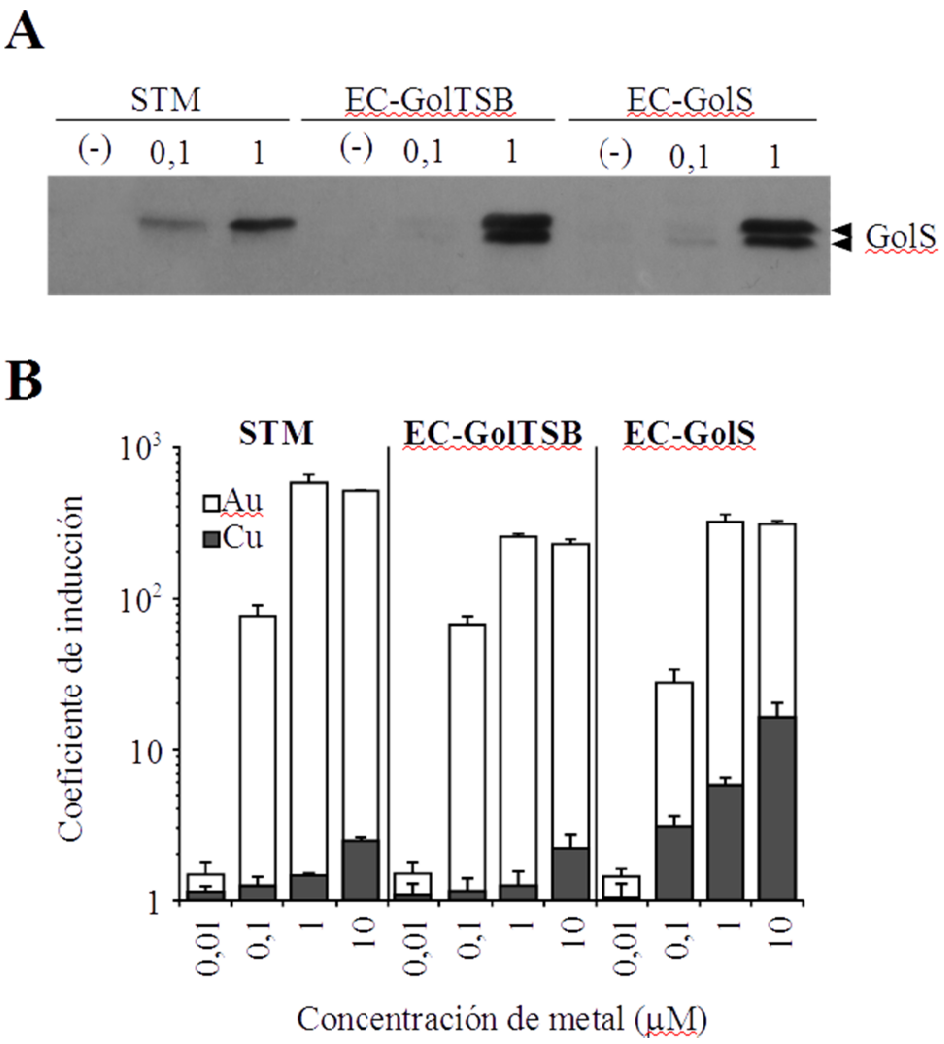



**Figura 4.6. Evaluación de los biosensores transgénicos de *E. coli*. A.** Inmunodetección de GolS en extractos celulares totales obtenidos a partir de *S.* Typhimurium (STM), o las cepas transgénicas de *E. coli*, EC-GolTSB o EC-GolS, crecidas en medio rico LB en ausencia de metal o con el agregado de 0,1 o 1 µM de $AuK(CN)_2$. **B.** Respuesta relativa del bioreportero fluorescente en *Salmonella* y las cepas transgenicas de *E. coli* a concentraciones crecientes de $AuK(CN)_2$ (Au) o $CuSO_4$ (Cu). Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

B, los biosensores fluorescentes desarrollados en *E. coli* muestran un patrón de inducción a concentraciones fijas de Au similar al observado en *Salmonella*. Sin embargo, la respuesta a Cu del biosensor EC-GolS fue mayor que la del biosensor

fluorescente EC-GolTSB o el bioreportero construido en *Salmonella* (en adelante STM), lo que disminuye el poder de discriminación del sensor. En base a los resultados obtenidos calculamos el índice de discriminación Au/Cu para el biosensor en EC-GolTSB a una concentración de 10 μM de cada metal. El valor obtenido, 144,7, es similar al obtenido en *Salmonella*, mientras que en el caso del sensor EC-GolS, los máximos obtenidos fueron 290,3 y 10,9 veces de inducción en presencia de 10 μM de Au y Cu, respectivamente, con un índice de discriminación de sólo 26,7.

El hecho de que la cepa transgénica EC-GolS tenga una respuesta mayor a cobre que la cepa EC-GolTSB podría indicar que GolT y GolB ayudarían en la eliminación de Cu también en *E. coli*, disminuyendo su concentración en el citoplasma y mejorando así el desempeño del biosensor transgénico para la detección de Au. En este sentido en nuestro laboratorio habíamos demostrado previamente que GolT y en menor medida GolB, contribuyen a la resistencia a Cu en una mutante delecionada en la ATPasa CopA, regulada por CueR (Espariz y col., 2007).

*En conjunto, estos resultados indican que la expresión de la ATPasa GolT y le proteína de unión a metales GolB, mejoran el desempeño del biosensor para la detección de Au. Debido a esto, decidimos continuar los estudios de caracterización del sistema utilizando la cepa EC-GolTSB como bacteria residente del sistema de detección de Au.*

### 4.2.5. Calibración del biosensor fluorescente EC-GolTSB.

#### 4.2.5.1. Optimización de las condiciones de cultivo: medio de cultivo.

Dado que la condición nutricional de un cultivo pueden influenciar no sólo en la expresión del reportero sino también el estado de la envoltura celular, afectando así la permeabilidad de las bacterias a los iones metálicos (Charrier y col., 2011; Kohlmeier y col., 2007); decidimos comparar la respuesta del biosensor EC-GolTSB a Au y Cu cultivado la bacteria en distintos medios de cultivo. Para ello, se crecieron células hasta una $DO_{600}$ nm de 0,5 en medio mínimos SM9 suplementado con diferentes fuentes de carbono o medio rico LB y las incubamos durante 3 horas con sales de Au o Cu a una concentración de 10 μM.

Como se observa en la tabla 4.1, y al igual que habíamos observado previamente

para el bioreportero fluorescente STM (fig 4.1), la máxima inducción de GFP se observa en medio rico LB. En estas condiciones, se obtuvo un incremento en los niveles de fluorescencia de 365,7 veces en presencia de 10 μM $AuK(CN)_2$ respecto a los niveles basales (sin metal), en tanto que la inducción en presencia de 10 μM $CuSO_4$ se incrementó sólo 2,5 veces. En base a estos datos calculamos el índice de discriminación Au/Cu de 147,4, muy similar al obtenido en *Salmonella.* Para células crecidas en medio mínimo SM9 suplementado con 0,2 % glucosa (tabla 4.1), se observó un menor incremento en la fluorescencia tanto en presencia de Au como de Cu (194,4 y 1,3 veces de inducción, respectivamente) comparado con los niveles obtenidos al cultivar las bacterias en LB. Sin embargo, se obtuvo un índice de discriminación Au/Cu, muy similar, de 144,7.

Por otro lado, cuando se suplementa el medio con 0,2% glicerol, si bien se obtuvieron valores de inducción por Au similares que cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono, de 189,1; se observó un aumento significativo de la inducción en presencia de Cu, 6,08, por lo que el índice de discriminación disminuyó a sólo 31,0. En medio suplementado con 0,27% acetato y 0,32% citrato los niveles de inducción en presencia de Au son mucho menores: 56,8, para el acetato; y 34,58 para el citrato. Mientras que por su parte, en presencia de Cu, las inducciones fueron de 3,1 y 1,4, respectivamente. A partir de estos resultados se obtuvieron índices de discriminación de 18,3 para el acetato y de 24,6 para el citrato, muy por debajo de lo obtenido en medio mínimo suplementado con glucosa o en medio LB.

**Tabla 4.1. Desempeño del biosensor *EC golTSB* crecido en diferentes fuentes de carbono**

| Medio/Fuente de carbono | Máxima inducción Au (veces de inducción ± DS) | Máxima inducción Cu (veces de inducción ± DS) | Índices de discriminación Au/Cu |
|---|---|---|---|
| LB | 365,7 ± 43,6 | 2,4 ± 0,7 | 147,4 |
| SM9 + 0,2% glucosa | 194,4 ± 12,6 | 1,3 ± 0,5 | 144,7 |
| SM9 + 0,2% glicerol | 189,1 ± 51,8 | 6,1 ± 1,6 | 31,0 |
| SM9 + 0,27% acetato de sodio | 56,8 ± 15,3 | 3,1 ± 0,9 | 18,3 |
| SM9 + 0,32% citrato de sodio | 34,5 ± 6,8 | 1,4 ± 0,2 | 24,6 |

DS: desviación estándar

Sobre la base de estos resultados, se puede concluir el medio mínimo SM9 suplementado con glucosa como fuente de carbono, presenta la mejor inducción en

presencia de Au y la mejor relación Au/Cu. Además el medio mínimo presenta varias ventajas frente al medio rico LB ya que por ser un medio definido, posee menores niveles de fluorescencia que interfieren con las determinaciones, así como ínfimos niveles de metales que suelen estar presentes en los componentes del medio rico.

### 4.2.5.2. Optimización de las condiciones de cultivo: fase de crecimiento de las bacterias.

Una condición importante para el desarrollo de un biosensor robusto, es minimizar el tiempo requerido para producir una señal cuantificable. Esto no sólo simplifica el proceso en sí, sino que además disminuye el costo. Dado que los biosensores bacterianos son células vivas, existe un período de tiempo inherente necesario para que el reportero se exprese y provea una señal medible. La mayoría de los sistemas biosensores descriptos, reportan tiempos de incubación de entre 30 minutos y 5 horas de exposición con el analito (Van Der Meer y col., 2004).

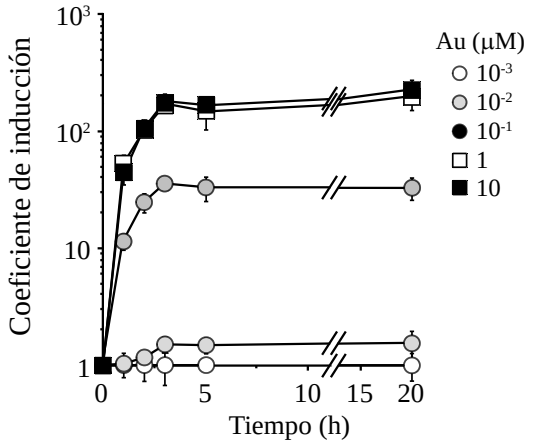



**Figura 4.7. Optimización del tiempo de exposición al metal.** Las células cultivadas en SM9-glucosa se expusieron por 1, 2, 3, 5 y 20 horas a las concentraciones indicadas de $AuK(CN)_2$ (Au). Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

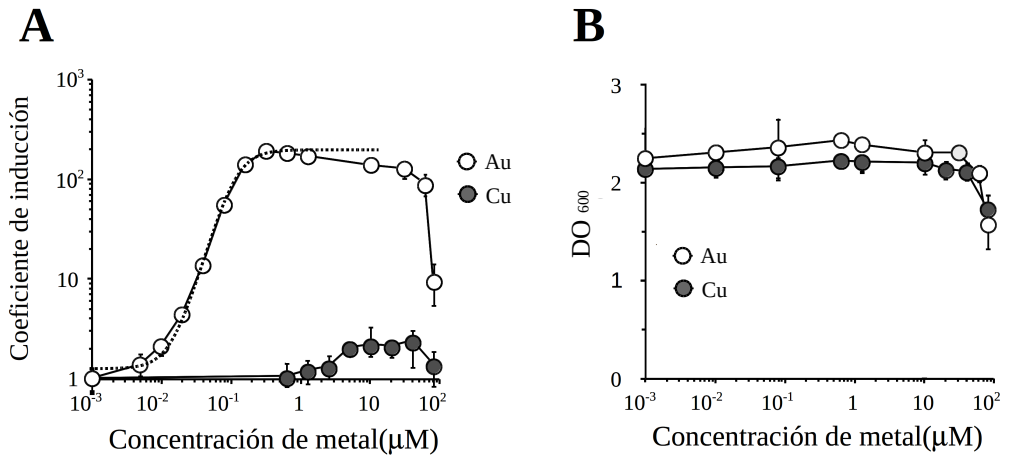
A fin de optimizar el tiempo de exposición al metal, el biosensor transgénico EC-GolTSB se expuso a iones Au por distintos períodos de tiempo en medio mínimo suplementado con glucosa (figura 4.7). De esta manera, se observó que la máxima expresión de GFP se obtiene luego de 3 hs de incubación con el metal, indistintamente de la concentración de Au utilizada; mientras que mayores tiempos de incubación no aumentan significativamente la respuesta; aunque la fluorescencia es estable por al

menos 20 hs (Fig. 4.7).

### 4.2.5.3. Determinación de los rangos y límite de detección.

A continuación decidimos verificar el funcionamiento del biosensor EC-GolTSB en un rango más amplio de concentraciones de Au y Cu y compararlo con el desempeño del biosensor EC-GolS y del bioreportero fluorescente STM. Para ello, las células de los distintos sensores fueron cultivadas en medio mínimo SM9 hasta una $DO_{600}$ de 0,5 e incubadas por 3 horas en presencia de cantidades crecientes de $AuK(CN)_2$ o $CuSO_4$.

En la fig. 4.8 A se muestran las curvas de dosis-respuesta para el biosensor EC-GolTSB. Como se observa en la figura, la fluorescencia se incrementa con la cantidad de Au presente, alcanzando su máximo nivel a una concentración de 1,78 μM. Al igual que lo observado para el bioreportero STM, la fluorescencia continua siendo máxima hasta una concentración de 80 μM, concentración a la cual el metal comienza a afectar la viabilidad celular y la fluorescencia decae (Fig. 4.8B).




**C**

| k | n | $K_M$ | α | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| 194,4 ± 12,6 | 2,26 ± 0,09 | 0,19 ± 0,01 | 0,0061 ± 0,0006 | 0,991 |

**Figura 4.8. Calibración del biosensor EC-GolTSB. A.** Curvas dosis-respuesta del biosensor a concentraciones variables de $AuK(CN)_2$ (Au) y $CuSO_4$ (Cu) crecido por 3 horas en medio mínimo SM9 a 37 °C con agitación. Los resultados muestran el promedio de al menos 5 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. La línea punteada muestra el ajuste realizado sobre los datos utilizando la función de Hill**. B.** Densidad óptica final ($DO_{600}$) alcanzada por los cultivos a las mismas condiciones en A. **C.** Parámetros del ajuste a la función de Hill realizado con un 95% de confianza sobre la curva dosis-respuesta a Au del biosensor. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En presencia de Cu, la fluorescencia es mínima hasta valores de concentración mayores a 1 µM. La máxima inducción de 1,32 veces respecto a la muestra sin metal se observa a una concentración de $CuSO_4$ de 20 µM (Fig. 4.8 A), concentración por encima de la cual comienzan a evidenciarse los efectos tóxicos del metal (Fig. 4.8 B).

Analizamos además la respuesta del biosensor *EC golTSB,* a otros metales de transición además de Cu (fig 4.9) como Ag, Zn, Cd, Hg, Ni y Co. Como se observa en la figura, ningún otro metal ensayado es capaz de inducir la respuesta del reportero bajo las condiciones ensayadas del mismo modo que el bioreportero STM, indicando que el sensor GolS en la cepa transgénica se comporta de igual manera que mismo se expresa en su entorno natural.

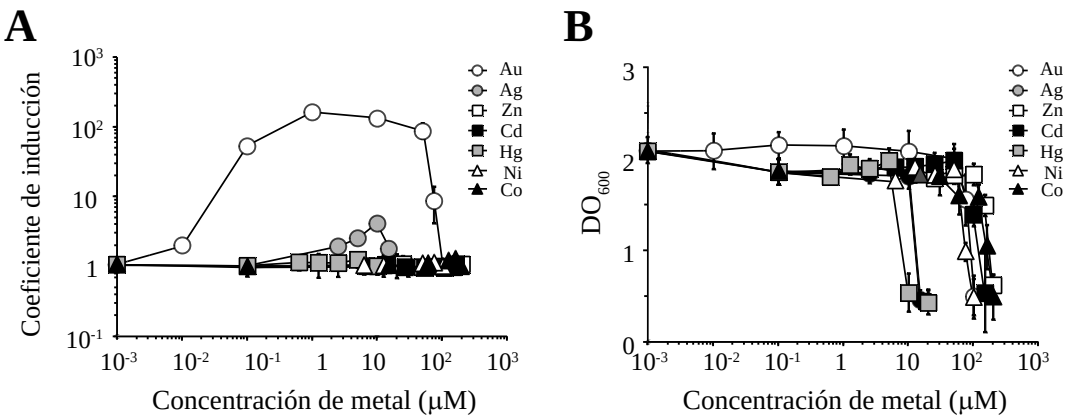
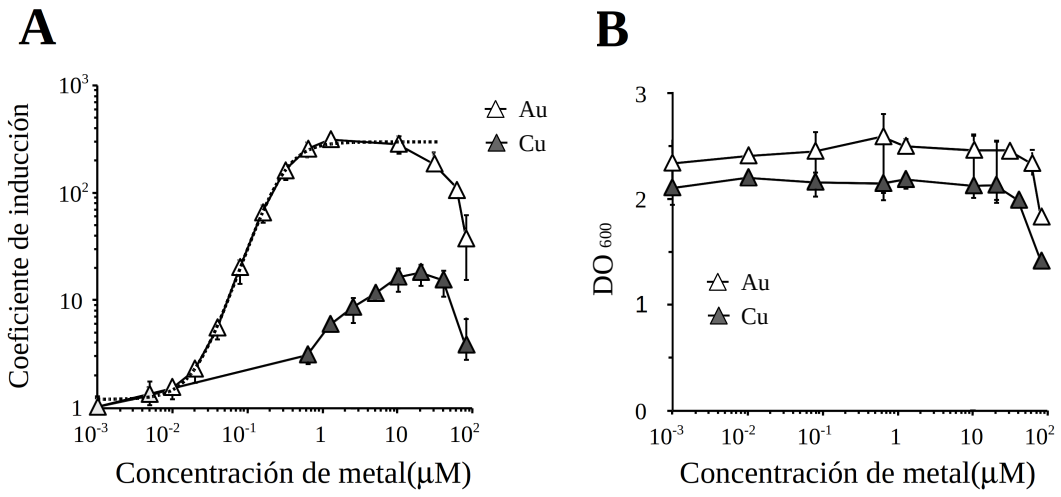



**Figura 4.9. Respuesta del biosensor EC-GolTSB a diferentes metales. A.** Curvas dosis-respuesta para el biosensor en presencia de concentraciones variables de $AuK(CN)_2$, $AgNO_3$, $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $HgCl_2$, $NiSO_4$ y $CoCl_2$, crecido por 3 horas en medio mínimo SM9 a 37 °C con agitación **B.** Densidad óptica ($DO_{600}$) final alcanzada por los cultivos en las mismas condiciones que en A. Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Con fines comparativos, realizamos también curvas dosis-respuesta a Au y Cu para el biosensor fluorescente EC-GolS. Como se observa en la Figura 4.10 A, la máxima inducción se obtuvo a una concentración de Au de 1,79 µM con un valor de 290,3 ± 11,5 veces de inducción. A concentraciones mayores a 80 µM Au, la fluorescencia cae debido a la toxicidad del metal (Fig 4.10 B). La máxima respuesta a Cu se observa a una concentración del metal de 10 µM con un valor de 10,87 y como

habíamos observado en los experimentos utilizando concentraciones fijas de metal (Fig 4.7 B), los nivel máximos de inducción alcanzados son superiores a los observados para el biosensor EC-GolTSB.




**C**

| k | n | $K_M$ | α | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|
| 290,3 ± 11,5 | 2,09 ± 0,06 | 0,29 ± 0,02 | 0,0039 ± 0,0003 | 0,997 |

**Figura 10. Calibración del biosensor fluorescente EC-GolS. A.** Curvas dosis respuesta del biosensor EC-GolS en presencia $AuK(CN)_2$ (Au) y $CuSO_4$ (Cu) crecido por 3 horas en medio mínimo SM9 a 37 °C con agitación. Los resultados muestran el promedio al menos 5 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. La línea punteada muestra el ajuste realizado sobre los datos utilizando la función de Hill. Los parámetros obtenidos se resumen en C**. B.** Densidad óptica final alcanzada por los cultivos. **C.** Parámetros del ajuste de la función de Hill realizado con un 95% de confianza sobre la curva dosis-respuesta a Au del biosensor. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

### 4.2.6. Comparación de los biosensores fluorescentes.

Los datos de las curvas de dosis-respuesta en presencia de Au para los biosensores EC-GolTSB y EC-GolS, fueron ajustados al modelo matemático planteado previamente (sección 4.2.3) como se realizó para el bioreportero STM. Los resultados de los ajustes se muestran en las figuras 4.8 C y 4.10 C. A partir de los mismos se pudo calcular la concentración de Au a la que se alcanzan los niveles máximos de inducción y el límite detección que definen el rango detección efectivo de los biosensores y que se resumen en la tabla 4.2.

A partir de los datos de la tabla 4.2, se observa que el rango de detección efectivo para el biosensor EC-GolTSB es muy similar al observado para el bioreportero

STM. Además los dos sensores tienen un índice de discriminación Au/Cu muy similares, indicando el correcto funcionamiento del biosensor transgénico para la detección de iones Au en solución.

**Tabla 4.2. Comparación de las cepas bioreporteras STM, EC-GolTSB y EC-GolS.**

| Sensor | Rango de detección efectivo (nM/ppb) | Índice de discriminación Au/Cu |
|---|---|---|
| STM | 21,75 – 1249 (4,28 – 246,2) | 127,4 |
| EC-GolS | 29,9 – 1798 (5,88 – 354,1) | 26,7 |
| EC-GolTSB | 19,86 – 1779 (3,91 – 350,6) | 144,7 |

Datos obtenidos a partir de los resultados que se muestran en las figuras 4.3, 4.8 y 4.10

Por otra parte, el sensor EC-GolS presenta una disminución en sensibilidad (definida como la menor concentración de metal detectada) en presencia de Au, ya que presenta un límite de detección mayor que los otros sensores. Como se comentó anteriormente, el índice de discriminación Au/Cu es mucho menor debido al aumento en la respuesta a Cu de este biosensor.

*El conjunto de resultados nos permiten concluir que el biosensor fluorescente EC-GolTSB exhibió una buena relación señal ruido, que proporciona la relación que existe entre el nivel de señal detectada y las fluctuaciones de la fluorescencia debido a la expresión basal del sistema y la autoflorscencia de las bacterias, y mínimos niveles de interferencia con otros metales, incluso aquellos metales químicamente similares al Au como Cu y Ag, metales que se encuentran frecuentemente asociados al Au en los depósitos minerales. Además, un muy bajo límite de detección 19,86 nM (3,91 ppb) y un amplio rango detección efectivo de 19,8 - 1779 nM, aunque es capaz de detectar el metal hasta una concentración de 80000 nM. Esto lo hace apropiado para realizar tanto ensayos cuantitativos sino que también puede ser aplicable en ensayos de tipo cualitativo, como ensayos de difusión en placa, permitiendo así una detección rápida y directa de la presencia de metal como Au solubilizado en el medio.*

## 4.3. Conclusiones Capítulo I

En este Capítulo se detalla el diseño y construcción del primer biosensor bacteriano específico para Au basado en el regulón *gol* de *S.* Typhimurim.

Mediante la generación de un plásmido reportero que expresa el gen *gfp* de

*Aequaria victoria*, bajo el control del promotor del gen *golB*, regulado por GolS logramos obtener inicialmente en *Salmonella*, la bacteria donde reside el sistema de regulación, un bioreportero específico para la detección de iones Au ($Au^{+1}$ u $Au^{+3}$) en solución, tanto formando parte de sales inorgánicas o complejos orgánicos. Este bioreportero no detecta otros metales de transición, como el Zn o el Hg, ni metales con los que el oro comparte varias características fisicoquímicas y con los que se encuentra asociado en la naturaleza como Cu o Ag. Además este bioreportero demostró ser más efectivo para la detección de Au que construcciones similar que expresan el reportero β-galactosidasa u otro basado en el sistema de regulación homólogo *cue*.

Por otra parte, a fin de obtener biosensores bacterianos que puedan emplearse en la evalucación de muestras del ambiente, transferimos este sistema a la bacteria no patogénica *E. coli*, un microorganismo que ha sido muy utilizado para el desarrollo de este tipo de dispositivos. Demostramos que tanto en esta bacteria como en su hospedador original, la expresión de la proteína sensora/reguladora desde un plásmido resulta contraproducente para el correcto funcionamiento del biosensor como un detector selectivo de iones Au. Se generaron entonces, cepas de *E. coli* transgénicas que expresan GolS a partir de una única copia en el cromosoma. Luego de la calibración de los biosensores obtenidos pudimos concluir que la expresión del regulador junto con los transportadores GolT y GolB, también pertenecientes al regulón *gol*, mejoran ampliamente el desempeño de un biosensor sobre todo respecto al límite de detección y el índice de discriminación.

Demostramos además que el biosensor EC-GolTSB alcanza la máxima expresión de GFP en 3 horas independientemente de la concentración de Au presente, y que esta inducción se mantiene por al menos 20 horas. Además, el sistema de detección mejora su desempeño para la detección de Au si las bacterias se cultivan en medio mínimo SM9 utilizando glucosa como fuente de carbono. Este medio, por ser un medio definido, no posee metales que suelen estar presentes en los componentes del medio rico y presenta niveles muy bajos de fluorescencia intrínseca lo que simplifica las determinaciones.

El biosensor EC-GolTSB detecta amplio rango efectivo de concentraciones de Au, entre 3,91 – 350,6 ppb (19,86 – 1779 nM) lo que, *a priori*, lo hace apropiado para su uso a campo, ya que la abundancia de este metal que en la corteza terrestre es de sólo

4 ppb, y puede alcanzar valores incluso mayores de 4000 ppb en yacimientos económicamente rentables. Estas bacterias biosensoras son apropiadas no sólo para realizar ensayos cuantitativos como los que se describen es esta Tesis, sino que también puede ser aplicable en ensayos de tipo cualitativo, como ensayos de difusión de metal en placas (Cerminati, 2009) permitiendo así la detección rápida y directa de la presencia o no del metal como Au solubilizado en el medio. Si bien la eficiencia de esta tecnología sencilla y de bajo costo sólo se ha ensayado hasta el momento en condiciones de laboratorio y con muestras acuosas aditivadas con metales, en su estado actual de desarrollo sirve como una prueba de concepto para su aplicación en el campo de la minería.

Por otro lado, el buen desempeño del dispositivo sensor basado en el sistema regulatorio controlado por GolS sienta las bases para la construcción de nuevos sensores basados en variantes de GolS que han sido modificadas para detectar otros metales.

# 5. Capítulo II

"*Desarrollo de biosensores no selectivos para la detección de un amplio espectro de metales de transición*"

## 5.1. Introducción.

Como se mencionó en la Introducción, los reguladores de la familia MerR unen el ión metálico en un sitio, denominado sitio de unión del metal, localizado en la interface del dímero del sensor y conformado por residuos del rulo de unión a metal de un monómero y del inicio del dominio de dimerización del otro monómero (Changela y col., 2003). Residuos de Cys o His altamente conservados de estas regiones de la proteína actúan como ligandos del ión (Reyes-Caballero y col., 2011). Dado que las preferencias en cuanto a geometría de coordinación varían entre los metales de transición, se ha postulado que la disposición particular de estos ligandos favorece la unión de algunos metales y desfavorece la de otros determinando la selectividad metálica del sensor (Ma y col., 2009). En este sentido, en base a un análisis comparativo de los dominios de dimerización de los metalo-reguladores de la familia MerR se postuló que la presencia o no de un residuo de cisteína al inicio de la hélice de dimerización (en posición 77) es determinante en este sentido. Aquellos miembros de la familia que han sido caracterizados como sensores de cationes monovalentes, como CueR o GolS, poseen un residuo conservado de serina, en tanto que los que responden a cationes divalentes como ZntR, PbrR, CadR y MerR poseen un residuo de cisteína en esta posición, que se ha visto implicado en la coordinación metálica (Changela y col., 2003). Los datos de la estructura cristalográfica de CueR unido a $Cu^{+1}$ y de ZntR unido a $Zn^{+2}$ revelaron información relevante en este sentido. El residuo de Ser77 si bien puede actuar como ligando del metal, se encuentra en una posición tal que la distancia Cu-Oγ es demasiado grande para permitir una interacción directa con el catión (Changela y col., 2003). En base a esto se concluyó que el residuo Ser77 podría estabilizar el rulo de unión a metal del sensor conformando un ambiente hidrofóbico propicio para la unión del ión $Cu^{+1}$, entorno que desfavorece la interacción con cationes divalentes. Por el contrario, el residuo en la misma posición en ZntR, Cys79, coordina directamente con uno de los dos iones de $Zn^{+2}$ unidos al rulo de unión a metal. En base a esto se postuló que la existencia de este ligando adicional en ZntR favorece la unión de $Zn^{+2}$ y desfavorece la unión de $Cu^{+1}$ que prefiere una geometría de unión lineal (Changela y col., 2003).

Estudios previos realizados en el laboratorio (Ibáñez, 2012) demostraron que el reemplazo del residuo de serina en la posición 77 de GolS y CueR por cisteína, contrario a lo esperado, no afecta la capacidad de los sensores mutantes de responder a

cationes monovalentes como Au y Cu. Además, estos sensores mutantes a los que denominamos $GolS_{S77C}$ y $CueR_{S77C}$, fueron capaces de activar la expresión de sus genes blanco en presencia de $Hg^{+2}$, pero también en presencia de $Zn^{+2}$, $Cd^{+2}$ y $Pb^{+2}$, en una cepa que carece del principal transportador de estos metales, ZntA (Ibáñez, 2012). Se obtuvieron así sensores de metales basados en GolS que presentan el espectro más amplio de metales detectados reportado hasta el momento. Además, mediante la construcción de proteínas quiméricas entre GolS y CueR de *Salmonella* en los que se intercambiaron residuos de aminoácidos comprendidos entre las posiciones 111 y 120, que comprenden el rulo de unión a metal, pudimos identificar los residuos de aminoácidos responsables de la selectividad de GolS por Au y obtener variantes de GolS, como la variante $GolS_L$, que detectan tanto Au como Cu y Ag (Checa y col., 2007; Ibáñez y col., 2013).

La Organización Mundial de la Salud, posicionó al Hg, Pb y Cd, tres de los metales detectados por las variantes no selectivas de GolS obtenidas, entre los 10 químicos más peligrosos para el hombre (Organización Mundial de la Salud., 2011), metales que se acumulan en el medio ambiente principalmente como resultado de las actividades humanas. Dado que los biosensores bacterianos presentan la ventaja de reportar solamente la fracción del contaminante que se encuentra disponible para los organismos vivos y que justamente es la causante de los efectos tóxicos, el desarrollo de biosensores basados en la variante $GolS_{S77C}$ podría servir para revelar de manera rápida y económica la presencia de cualquiera de estos metales contaminantes, así como otros menos abundantes, pero igualmente tóxicos, y así conducir a su saneamiento. En vistas de estas necesidades, y teniendo como antecedente el desarrollo de biosensores altamente eficientes para la detección de oro (Capítulo I) basados en GolS silvestre, nos propusimos utilizar la variante no selectiva $GolS_{S77C}$ como módulo de detección de señal en el diseño de biosensores fluorescentes de amplio espectro para la detección de metales pesados tóxicos. Además, nos propusimos obtener una nueva variante de GolS que lleva la mutación S77C y el rulo de unión al metal de CueR, para ampliar aún más el espectro de metales detectados por el sensor proteico y evaluar el desempeño de esta nueva variante cuando se la utiliza en la generación de biosensores bacterianos.

## 5.2. Resultados y discusión.

### 5.2.1. Construcción de un bioreportero fluorescente basado en GolS$_{S77C}$ utilizando como bacteria residente a *Salmonella*.

En el capítulo anterior se describió el desarrollo y caracterización del primer biosensor bacteriano específico para la detección de iones Au. Como se describe allí, la plataforma de detección basada en el sistema de regulación GolS/PgolB-gfp resultó ser sumamente eficiente para la detección de Au, principalmente debido a los bajos niveles de expresión basal de la proteína reportera en condiciones de no inducción (sin metal) lo que resulta en una mejor relación señal/ruido y un incremento en la sensibilidad del dispositivo. Por esto, decidimos utilizar esta plataforma para generar los nuevos biosensores de amplio espectro para la detección de metales tóxicos.

En primer término nos propusimos validar la utilización de la variante GolS$_{S77C}$ como módulo sensor del dispositivo utilizando *Salmonella* como bacteria residente. Para ello, transformamos la cepa 14028s *golS*$_{S77C}$ *golB*::Cm$^R$ Δ*zntA*, ya disponible en el laboratorio, con el plásmido reportero PgolB-gfp, y utilizamos inicialmente esta cepa bioreportera (de ahora en adelante, STM-GolS$_{S77C}$) para realizar ensayos cualitativos en placa (Fig. 5.1).

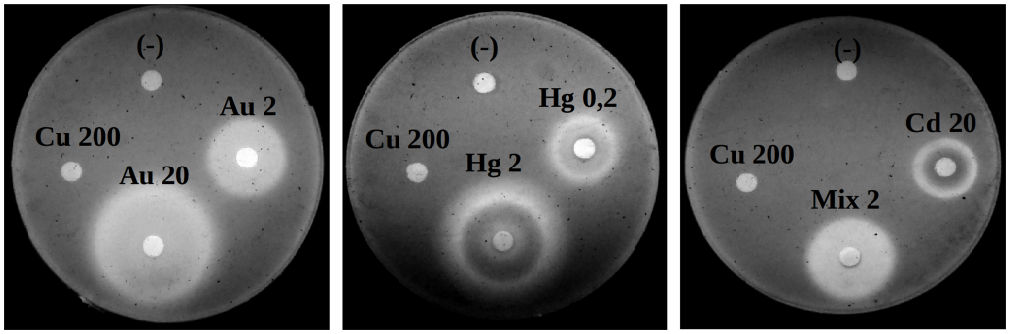



**Figura 5.1. Análisis cualitativo de la respuesta del bioreportero fluorescente basado en STM-GolS$_{S77C}$.** La cepa STM-GolS$_{S77C}$ se incubó en presencia de discos de papel embebidos en agua (-), o soluciones de AuK(CN)$_2$ (Au) a una concentración de 2 o 20 μM; $HgCl_2$ (Hg) a una concentración de 0,2 o 2 μM; $CuSO_4$ a una concentración de 200 μM, $CdCl_2$ a una concentración de 20 μM o una mezcla de los cuatro metales (Mix) en concentraciones de 0,5 μM Au; 0,05 μM Hg; 50 μM Cu y 5 μM Cd por 16 h a 37 °C. Las placas se fotografiaron bajo luz UV.

La bacteria se inoculó sobre placas conteniendo medio sólido LB Agar sobre las que posteriormente se colocaron discos de papel embebidos en agua estéril (-), o las sales de metales que se indican. Luego del desarrollo del césped bacteriano se observó

la formación de un halo fluorescente alrededor del disco que contenía Au, pero también alrededor de los discos de papel que contenían Hg y Cd, así como de una mezcla de todos estos metales. Además corroboramos que el sensor $GolS_{S77C}$, al igual que GolS silvestre no induce la expresión de la proteína reportera en presencia de iones Cu, verificando de esta manera que el sensor responde a metales tanto mono- como divalentes de acuerdo a lo esperado.

### 5.2.2. Calibración del bioreportero fluorescente basado en $GolS_{S77C}$.

Para evaluar el desempeño del bioreportero STM-$GolS_{S77C}$ para detectar cada uno de los metales, determinamos la fluorescencia emitida por las bacterias cuando estas son cultivadas en medio mínimo SM9 hasta una $DO_{600}$ de 0,5 e incubadas por 3 horas con sales de Au, Hg, Pb, Cd, Zn, Cu o Ni. Como se observa en la figura 5.2, la fluorescencia del cultivo se incrementó más de 150 veces en presencia de Au, Hg, Pb o Cd, respecto a la condición de no inducción (sin metal), mientras que en presencia de Zn, el sistema se indujo sólo 6,4 veces.

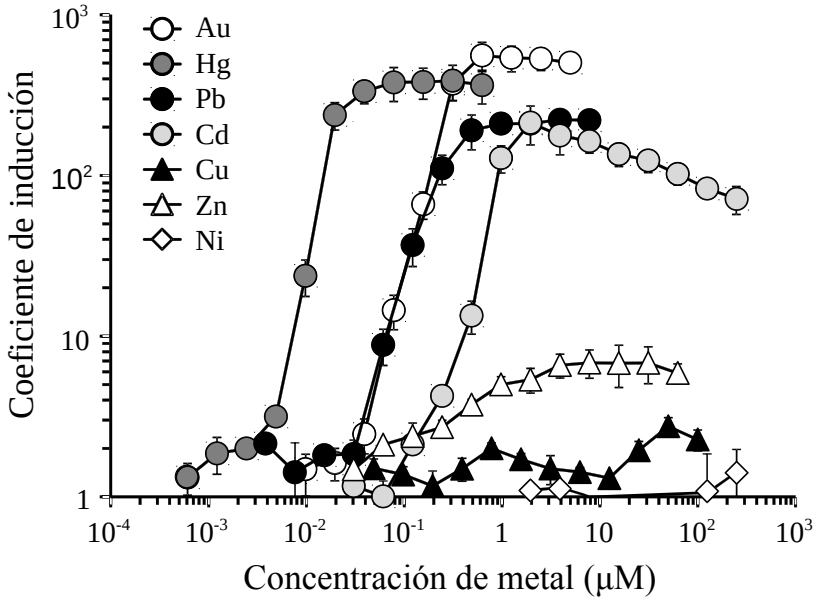



**Figura 5.2. Respuesta del bioreportero STM-$GolS_{S77C}$ a distintos metales de transición.** Curvas dosis-respuesta en medio mínimo SM9 luego de 3 horas de incubación con concentraciones variables de $AuK(CN)_2$ (Au); $HgCl_2$ (Hg); $Pb(NO_3)_2$ (Pb); $CdCl_2$ (Cd); $CuSO_4$ (Cu); $ZnCl_2$ (Zn) y $NiSO_4$ (Ni). Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Por otra parte, en presencia de Cu, sólo produjeron cambios menores en la fluorescencia, de manera similar a lo observado para el bioreportero en *Salmonella* basado en GolS silvestre (Capítulo I, sección 4.2.3). Además, como se esperaba, no se detectó un cambio significativo en la expresión del reportero en presencia de iones Ni (fig. 5.2).

Los datos obtenidos de las curvas dosis-respuesta del bioreportero a Au, Hg, Pb y Cd fueron ajustados a la función de Hill mediante la aplicación de la ecuación $[G] = k \times \left(\alpha + \frac{[I]^n}{K_M^n + [I]^n}\right)$(figura 5.3), obteniéndose los parámetros que se detallan en la tabla 5.1 Como se observa en la tabla, todos los ajustes mostraron un coeficiente de determinación ($R^2$) alto.

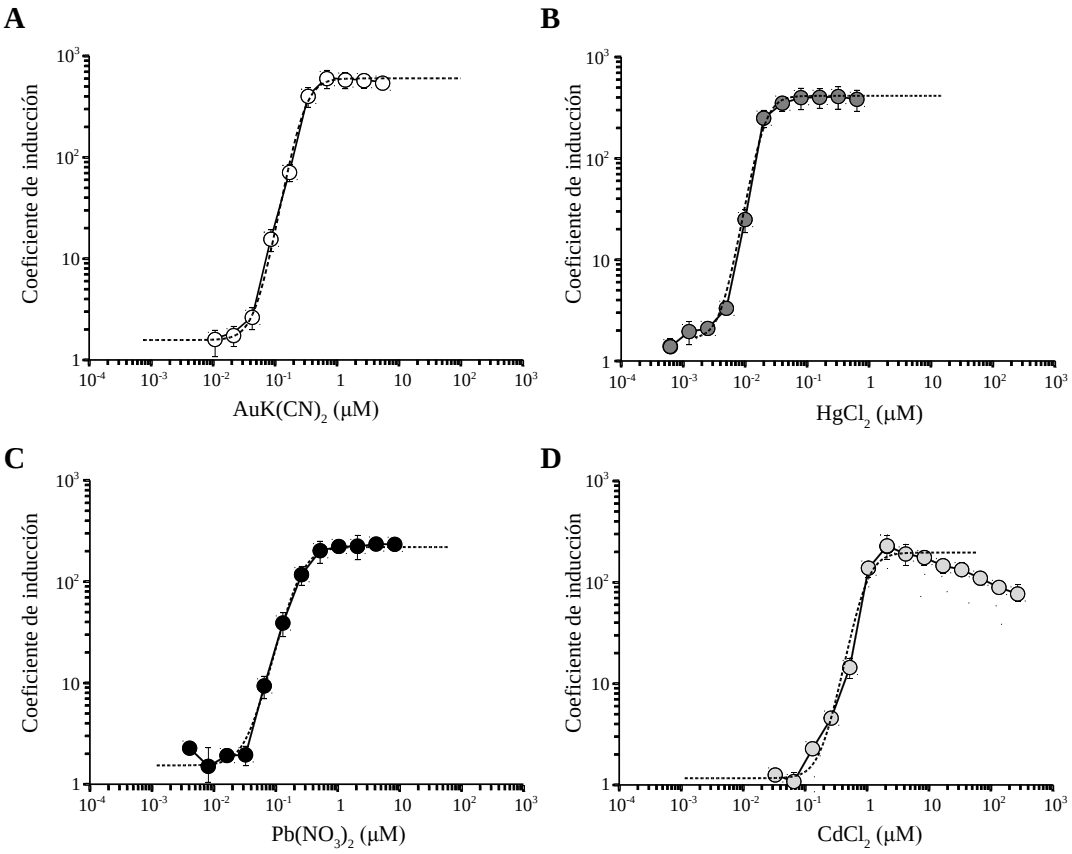



**Figura 5.3. Ajuste a la función de Hill de las curvas dosis-respuesta a Au, Hg, Pb y Cd para el bioreportero GolS$_{S77C}$ en *Salmonella***. El ajuste realizado sobre los datos de la Fig. 5.2 para Au (A), Hg (B), Pb (C) y Cd (D) se muestran como línea punteada. Los parámetros obtenidos se detallan en la tabla 5.1.

A partir de estos parámetros obtenidos para cada metal y la aplicación de la ecuación $2(F_B+3\ DS)/F_B$ (Capítulo I, sección 4.2.3), calculamos el límite de detección

para iones Au en 31,06 nM (6,12 ppb). El valor obtenido es similar al reportado para el bioreportero basado en GolS silvestre (Capítulo I, sección 4.2.3). La máxima expresión, 545,8 ± 58,5 veces de incremento respecto a los valores en ausencia de metal, se alcanza a partir de una concentración de iones Au de 1450 nM, por encima de la cual no se detectan cambios, al menos hasta una concentración de 10 μM (fig 5.3 A). De esta manera, corroboramos que el bioreportero STM-GolS$_{S77C}$ detecta Au con una sensibilidad y rango de detección efectivo similar bioreportero basado en el sensor silvestre.

**Tabla 5.1. Parámetros del ajuste realizado sobre las curvas dosis-respuesta a distintos metales del bioreportero STM-GolS$_{S77C}$.**

| | K (veces de inducción) | n | $K_M$ (μM) | α | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Au | 545,8 ± 82,9 | 3,25 ± 0,48 | 0,27 ± 0,04 | 0,0042 ± 0,0009 | 0,959 |
| Hg | 347,1 ± 31,9 | 7,04 ± 0,83 | 0,010 ± 0,006 | 0,0044 ± 0,0006 | 0,960 |
| Pb | 215,3 ± 16,1 | 2,57 ± 0,19 | 0,23 ± 0,02 | 0,0056 ± 0,0007 | 0,984 |
| Cd | 168,6 ± 23,2 | 2,96 ± 0,47 | 0,96 ± 0,17 | 0,0069 ± 0,0015 | 0,944 |
| Parámetros del ajuste realizado con un 95% de confianza sobre la curva dosis-respuesta a Au, Hg, Pb y Cd del bioreportero STM-GolS$_{S77C}$ | | | | | |

La mínima concentración de Hg (fig 5.3 B) detectada por el bioreportero STM-GolS$_{S77C}$ fue calculada en 4,68 nM, mientras que la máxima inducción (347,1 ± 31,9 veces de inducción) se alcanza a un concentración del metal de 222 nM, valores que se mantienen aún a concentraciones de 1000 nM (1μM). La sensibilidad y el rango de detección efectivo para Hg de este bioreportero son similares a los reportados para otros bioreporteros selectivos para mercurio desarrollados a la fecha basados en el sensor de Hg MerR como proteína sensora y cuyos rangos de detección reportados variaron entre 50 – 200 nM utilizando un reportero *luxAB* (Condee y Summers, 1992); 0.1 fM – 1000 nM utilizando un reportero *luxABCD* (Selifonova y col., 1993) y entre 5 – 24,9 μM utilizando un reportero *lacZ* (Hansen y Sorensen, 2000).

La respuesta del sistema reportero a iones Pb (fig 5.3 C) fue igualmente buena, en términos de límite de detección (34,23 nM), y nivel máximo de expresión, (215,3 ± 16,1 veces), valor que se alcanza a una concentración de 1725 nM de $Pb(NO_3)_2$ y se mantienen hasta una concentración de 10000 nM, mientras que otros sensores previamente reportados basados en ZntR en *E. coli* y PbbR en *C. metallidurans* sólo detectaron este metal en concentraciones entre 1 y 30 μM (Riether y col., 2001) y 0,5 -

5 mM (Corbisier y col., 1993), respectivamente; por lo que en comparación, el bioreportero STM-Gol$S_{S77C}$ resulta más eficiente para la detección de Pb, ya que es capaz de detectar concentraciones de al menos dos órdenes de magnitud menor que los previamente desarrollados.

Por su parte, el límite de detección de Cd se estimó en 202,71 nM y el máximo de expresión (168,6 ± 23,2 veces de inducción) se obtuvo a una concentración de 5160 nM (5,16 μM), concentración por encima de la cual el metal comienza a ser tóxico y en consecuencia la fluorescencia disminuye paulatinamente (fig 5.3 D). La sensibilidad de este bioreportero es mayor a otro desarrollado previamente basado en el sensor CadR que presenta un límite de detección de 2 μM (Corbisier y col., 1993); mientras que la máxima inducción en este bioreportero que se obtiene a 0,1 mM de Cd, una concentración mayor a la del bioreportero STM-Gol$S_{S77C}$.

Finalmente, el sensor mostró una leve respuesta a Zn, alcanzando aproximadamente 7 veces de inducción en las condiciones ensayadas. Si bien los datos de la curva no pudieron ser ajustados a la función de Hill, estos resultados muestran que el sensor tiene potencialidad para detectar este metal, tal vez en otras condiciones de crecimiento o modificando el entorno genético de la bacteria mutando genes que puedan estar involucrados en el mantenimiento de la homeostasis de este metal esencial.

*Estos resultados, en conjunto, muestran la potencialidad del bioreportero fluorescente desarrollado para la construcción que biosensores bacterianos que puedan ser usados para la detección de metales pesados tóxicos en muestras acuosas.*

### 5.2.3. Transferencia del sistema bioreportero basado en Gol$S_{S77C}$ a *Escherichia coli.*

Dado el buen desempeño del sensor basado en Gol$S_{S77C}$ en *Salmonella* para la detección de Hg, Pb y Cd, además de Au, decidimos transferir el sistema de detección a la bacteria no patógena *E. coli*, que como se comentó anteriormente, no posee el locus *gol*. Para ello, utilizamos un procedimiento similar al empleado para obtener el biosensor transgénico EC-GolTSB (Materiales y Métodos, sección 3.6.3). Mediante transformación con ADN lineal introdujimos en el genoma de *E. coli* un fragmento

conteniendo el operón *golTS$_{S77C}$* con su propio promotor en la región intergénica *ampH-sbmA de E. coli*. Esta cepa transgénica se transformó con plásmido reportero PgolB-gfp e inicialmente se ensayó la respuesta a concentraciones fijas de sales de Au, Hg, Pb y Cd. A fin de evaluar si la respuesta a metales es similar a lo observado en *Salmonella*, se incluyó en los ensayos una cepa de *S.* Typhimurium 14028 *golS*$_{S77C}$ *golB*::Cm$^R$ que lleva el plásmido reportero. Como se observa en la figura 5.4, ambas cepas bioreporteras son capaces de detectar Au y Hg, pero no responden a Cd o Pb, ya que no tienen mutado el transportador de ZntA involucrado en la detoxificación de estos metales (Pérez y col., 2006). A una concentración de 0,5 μM $AuK(CN)_2$, la expresión de GFP aumenta 397,4 veces en la cepa transgénica de *E. coli* y 426,8 veces en *Salmonella*; mientras que los niveles de inducción observados en presencia de 0,1 μM de $HgCl_2$ fueron 232,5 y 473,2 veces, respectivamente. La menor respuesta del bioreportero en *E. coli* a Au comparado con *Salmonella* ya había sido observada para la cepa transgénica que expresa GolS silvestre (Fig 4.6, Capítulo I), por lo que estos resultados validan el correcto funcionamiento del sensor proteico GolS$_{S77C}$ en *E. coli*.

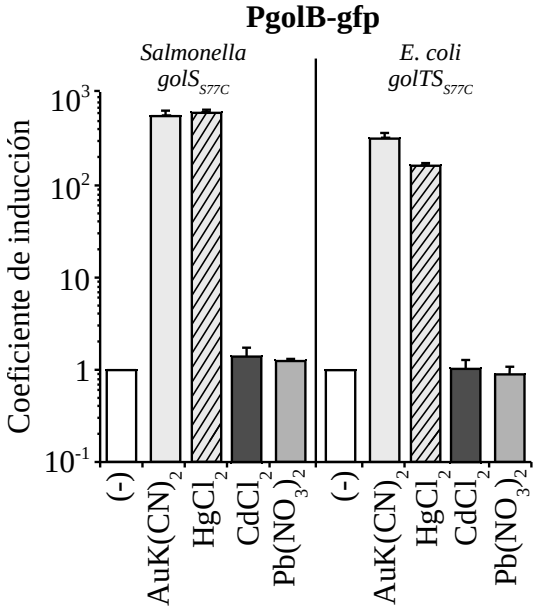



**Figura 5.4. Las cepas bioreporteras basadas en el sensor GolS$_{S77C}$ responden de manera similar a metales de transición.** Respuesta relativa de cepas de *Salmonella golS$_{S77C}$*::Cm$^R$ y *E. coli golTS$_{S77C}$*::Cm$^R$ que llevan el plásmido reportero PgolB-gfp determinada en medio SM9 luego de tres horas de incubación en ausencia de metal (-) o en presencia de 0,5 μM $KAu(CN)_2$, $CdCl_2$; $Pb(NO_3)_2$; o 0,1 μM $HgCl_2$. Los gráficos muestran el promedio de 3 ensayos independientes realizados por triplicado. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar

**5.2.3.1. Construcción y calibración del biosensor bacteriano no selectivo.**

A fin de incrementar la respuesta a iones divalentes como $Cd^{+2}$ y $Pb^{+2}$ y así incrementar el espectro de metales detectados por el sensor proteico $GolS_{S77C}$, procedimos entonces a delecionar el gen *zntA* en la cepa transgénica *golTS*$_{S77C}$ de *E. coli*. La nueva cepa transgénica fue transformada con el plásmido reportero PgolB-gfp, para generar el biosensor al que denominamos EC-$GolTS_{S77C}$.

Para evaluar el nuevo sistema biodetector determinamos la fluorescencia emitida en las mismas condiciones empleadas previamente para el biosensor construido en *Salmonella*, es decir medio mínimo SM9 e incubación por 3 horas en presencia cantidades crecientes de sales de Au, Cu, Hg, Pb, Cd, Zn y Ni (Figura 5.5).

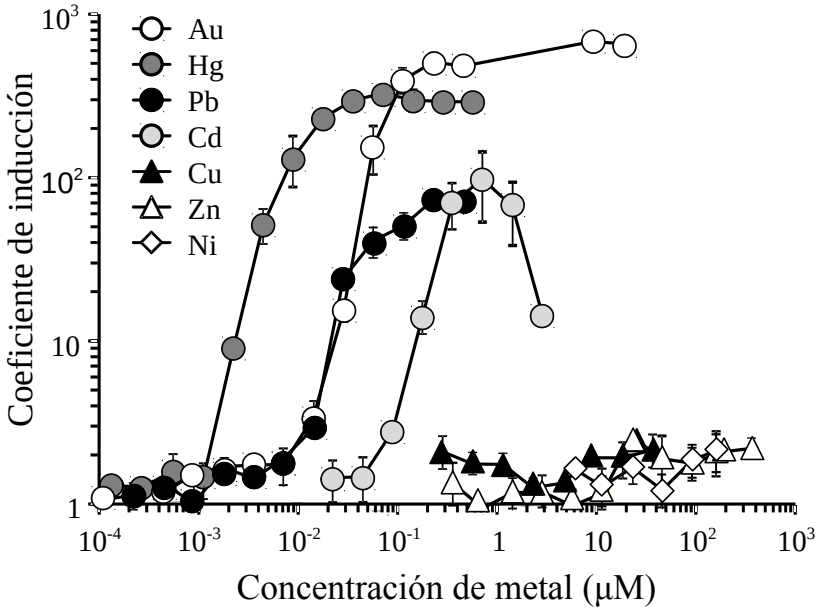



**Figura 5.5. Evaluación de la respuesta del biosensor EC-$GolTS_{S77C}$ a distintos metales**. Curvas dosis-respuesta en medio mínimo SM9 luego de 3 horas de incubación con concentraciones variables de $AuK(CN)_2$ (Au); $HgCl_2$ (Hg); $Pb(NO_3)_2$ (Pb); $CdCl_2$ (Cd); $CuSO_4$ (Cu); $ZnCl_2$ (Zn) y $NiSO_4$ (Ni). Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Como se observa en la figura 5.5, la fluorescencia del biosensor se incrementa en presencia de Au, Hg, Pb y Cd. Los niveles máximos de inducción por Au fueron similares a los alcanzados por el bioreportero STM-$GolS_{S77C}$, y si bien los valores

máximos alcanzados en presencia de Hg, Pb o Cd son menores, también disminuye la respuesta a metales no inductores como Cu, Zn o Ni, por lo que la capacidad del biosensor de discriminar entre metales inductores y no inductores, se conserva. Como se discutió en el Capítulo I, también en este caso, la menor respuesta a ciertos metales observada cuando la bacteria residente del sistema biodetector es *E. coli* podría deberse a diferencias en el manejo de los mismos respecto a *Salmonella.* En este sentido, se ha demostrado que *E. coli* es más susceptible a metales como Pb y Cd que *Salmonella* (Hartman y Kuo, 1987).

Al igual que para el bioreportero STM-Gol$S_{S77C}$, los datos obtenidos de la respuesta del biosensor EC-Gol$TS_{S77C}$ a Au, Hg, Pb y Cd fueron ajustados a la función de Hill (fig. 5.6) obteniéndose los parámetros que se detallan en la tabla 5.2. Como se observa en la tabla, todos los ajustes mostraron un coeficiente de determinación ($R^2$) alto.

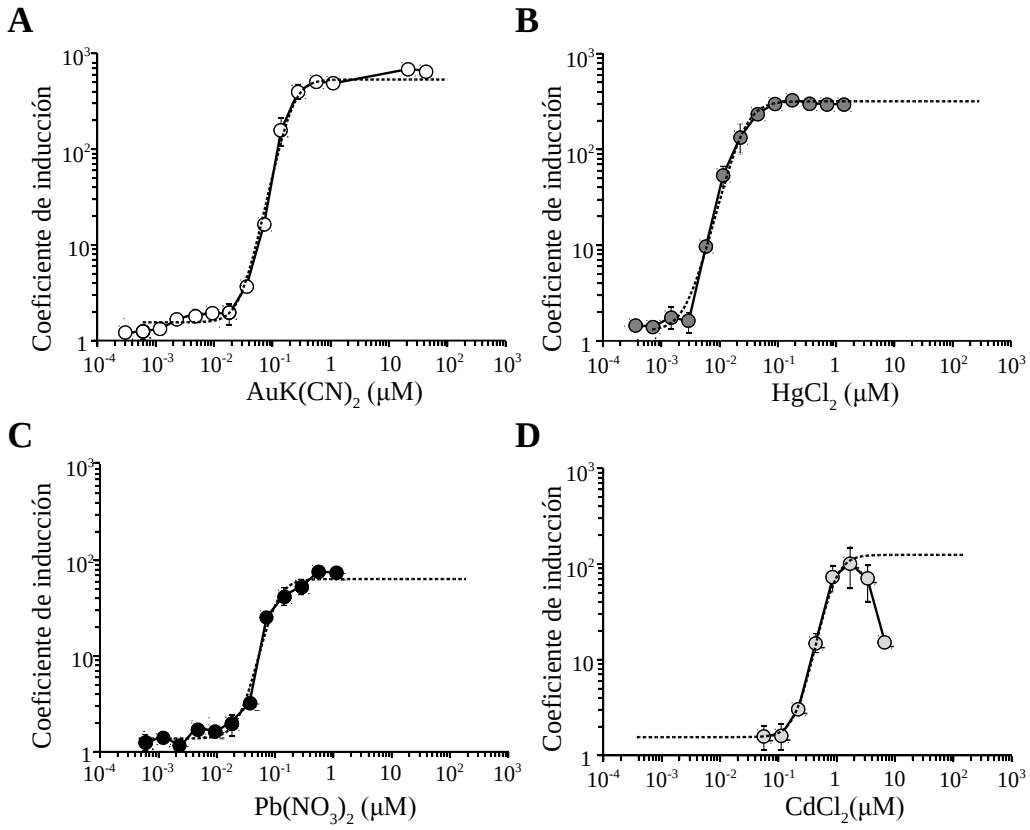



**Figura 5.6. Análisis de la respuesta del biosensor EC-Gol$S_{S77C}$ a metales pesados**. El ajuste realizado sobre los datos de la Fig. 5.5 para Au (A), Hg (B), Pb (C) y Cd (D) se muestran como línea punteada. Los parámetros obtenidos se detallan en la tabla 5.2.

A partir de estos parámetros y la ecuación $2(F_B+3\ DS)/F_B$, calculamos el límite y rango efectivo de detección para cada metal, datos que se resumen en la tabla 5.3. El límite de detección para iones Au fue de 34,29 nM, muy similar a los valores obtenidos para el bioreportero en *Salmonella*. Del mismo modo, la máxima expresión se alcanzó a una concentración de 1478 nM de $AuK(CN)_2$, (fig 5. 6. A y tabla 5.3)

**Tabla 5.2. Parámetros del ajuste realizado sobre las curvas dosis-respuesta a distintos metales del biosensor EC-GolTS$_{S77C}$**

| | k (veces de Inducción) | n | $K_M$ (mM) | $\alpha$ | $R^2$ |
|---|---|---|---|---|---|
| Au | 577,1 ± 58,5 | 3,20 ± 0,28 | 0,23 ± 0,03 | 0,0025 ± 0,0003 | 0,984 |
| Hg | 288,5 ± 21,6 | 2,85 ± 0,23 | 0,022 ± 0,002 | 0,0043 ± 0,0005 | 0,960 |
| Pb | 62,8 ± 8,6 | 3,43 ± 0,66 | 0,098 ± 0,015 | 0,022 ± 0,004 | 0,976 |
| Cd | 87,4 ± 14,69 | 3,48 ± 0,63 | 0,76 ± 0,12 | 0,015 ± 0,004 | 0,980 |
| Parámetros del ajuste realizado con un 95% de confianza sobre la curva dosis-respuesta a Au, Hg, Pb y Cd del bioreportero EC-GolTS$_{S77C}$ | | | | | |

El biosensor EC-GolTS$_{S77C}$ detectó Hg con prácticamente la misma sensibilidad que el bioreportero en *Salmonella*, aunque el rango de detección efectivo (4,37-147,7 nM), fue levemente más estrecho que el observado en la bacteria residente original (fig 5B y tabla 5.3)

Los máximos niveles de expresión del reportero alcanzados en presencia de iones Pb (fig 5.6), fueron significativamente menores que los obtenidos para el bioreportero STM-GolS$_{S77C}$ (tabla 5.2 y 5.3). Sin embargo ambos bioreporteros presentaron aproximadamente la misma sensibilidad para la detección de este metal. El límite de detección calculado fue de 39,68 nM contra 34,23 en el sensor STM GolS$_{S77C}$. Por su parte, el límite de detección del biosensor EC-GolTS$_{S77C}$ a Cd (fig 5.6 D) fue de 248,6 nM y el máximo de expresión del reportero se obtuvo a una concentración de $CdCl_2$ de 2580 nM. La menor respuesta a Pb y Cd del biosensor EC-GolTS$_{S77C}$, comparado con el bioreportero en *Salmonella* (Tabla5.3), pero sobre todo, el brusco descenso observado en la fluorescencia a concentraciones de Cd superiores a 3,5 μM cuando la bacteria residente del sistema bioreportero es *E. coli* (figura 5.6 D), podría deberse a diferencias en la susceptibilidad entre estas cepas. Como se comentó anteriormente, se sabe que *E. coli* es naturalmente más susceptible a estos metales tóxicos que *Salmonella* (Hartman y Kuo, 1987), por lo que la identificación de nuevos factores implicados en la captación/eflujo de Cd y Pb, y sobre todo su manipulación a

fin de incrementar la resistencia de la bacteria biosensora, puede resultar beneficioso para optimizar el rango de concentraciones de estos metales detectadas por estos dispositivos.

**Tabla 5.3. Comparación del desempeño las cepas reporteras STM-GolS$_{S77C}$ y EC-GolTS$_{S77C}$.**

| | STM-GolS$_{S77C}$ | | EC-GolTS$_{S77C}$ | |
|---|---|---|---|---|
| | Rango de detección (nM/ppb) | Máxima inducción alcanzada (veces de inducción) | Rango de detección (nM/ppb) | Máxima inducción alcanzada (veces de inducción) |
| Au | 31,06 – 1450/ 6,1 – 285,6 | 545,8 ± 82,9 | 34,29 – 1478/ 6,75 – 291,9 | 577,1 ± 58,5 |
| Hg | 4,68 – 222/ 0,94 – 44,1 | 347,1 ± 31,9 | 4,37 – 147,7/ 0,88 – 29,6 | 288,5 ± 21,7 |
| Pb | 34,23 – 1725/ 7,1 – 362,6 | 215,3 ± 16,1 | 39,68 – 290/ 8,22 – 60,1 | 62,8 ± 8,7 |
| Cd | 202,7 – 5160/ 22,8 – 580,1 | 168,6 ± 23,2 | 248,6 – 2580/ 27,9 - 290 | 87,4 ± 14,7 |

*El conjunto de los resultados hasta aquí presentados indican que el biosensor EC-GolS$_{S77C}$ es capaz de detectar la presencia de iones de Au, Hg, Pb o Cd con una sensibilidad similar o incluso mayor que biosensores previamente desarrollados para la detección de estos metales (Condee y Summers, 1992; Corbisier y col., 1993; Hansen y Sorensen, 2000; Riether y col., 2001; Selifonova y col., 1993), y en un amplio rango de concentraciones. Estas características y el hecho de ser no selectivo para la detección de estos metales lo convierte en una herramienta útil para el monitoreo rápido y efectivo de la presencia de cualquiera de estos metales tóxicos en muestras acuosas del ambiente.*

### 5.2.4. Análisis de muestras aditivadas con metales utilizando las herramientas biotecnológicas desarrolladas.

Los biosensores hasta aquí desarrollados han demostrado ser capaces de detectar una amplia variedad de iones metálicos tanto mono- como divalentes, cuando estos son agregados por separado al medio de cultivo donde se crecieron las bacterias. Para evaluar si las herramientas biotecnológicas desarrolladas tienen potencialidad para ser empleadas para el análisis de muestras de agua provenientes del ambiente, decidimos realizar ensayos utilizando muestras de aguas aditivadas con distintas mezclas de sales

de metales de transición. En estos ensayos, se incubó la suspensión de bacterias biosensoras en una relación 1 a 1 con la muestra de agua a evaluar y se determinó la fluorescencia emitida luego de 3 horas de incubación (fig 5.7)

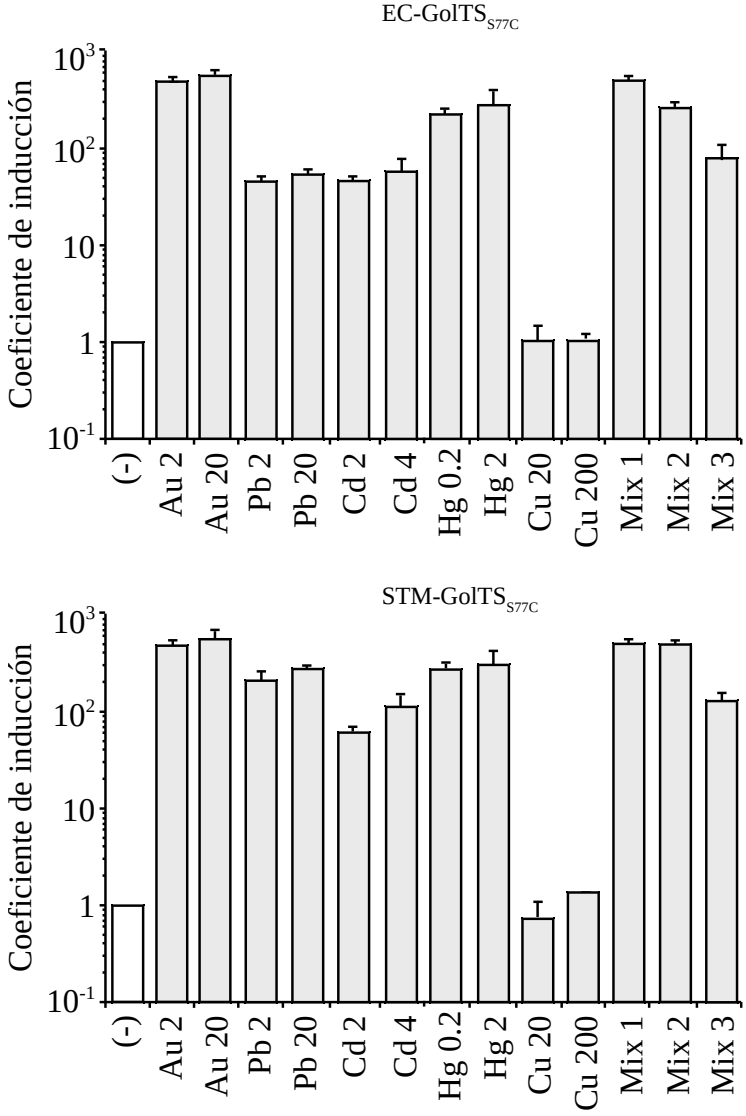



**Figura 5.7. Detección de metales en aguas aditivadas**. Se evaluó la respuesta de los biodetectores EC-GolTS$_{S77C}$ y STM-GolS$_{S77C}$ a los metales. Las bacterias cultivadas a una $DO_{600}$ de 0,5, se centrifugaron y se resuspendieron en medio SM9 2X, concentrando las células en el mismo factor. Para los ensayos se mezclaron 500 µl de la suspensión de bacterias con 500 µl de la muestra evaluar. Las muestras consisten en agua corriente (de la canilla) a la que se agregaron, por separado, $AuK(CN)_2$ (2 y 20 µM), $Pb(NO_3)_2$ (2 y 20 µM), $CdCl_2$ (2 y 4 µM), $HgCl_2$ (0.2 y 2 µM), y $CuSO_4$ (20 y 200 µM) o las mezclas de metales (Mix) según se detalle: **Mix 1:** $AuHCl_4$ 2µM + $Pb(NO_3)_2$ 2µM + $HgCl_2$ 0,2µM + $CdCl_2$ 2 µM; **Mix2**: $AuHCl_4$ y $Pb(NO_3)_2$: 0,32 µM de cada uno; $HgCl_2$: 0,032 µM; $CdCl_2$ y $CuSO_4$: 3,33 µM de cada uno. **Mix3**: $AuHCl_4$ y $Pb(NO_3)_2$: 0,166 µM; $HgCl_2$: 0,0166 µM;, $CdCl_2$ y $CuSO_4$: 1,66 µM. Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Como se observa en la figura, tanto el biosensor EC-GolTS$_{S77C}$ como la cepa bioreportera de STM-GolS$_{S77C}$ fueron igualmente eficientes para detectar los metales, tanto cuando estos están solos en la muestra como formando parte de mezclas (figura 5.7). Para las muestras que contienen un solo metal la respuesta obtenida es comparable a los valores predichos según la calibración de los biosensores utilizando la función de Hill (tablas 5.1 y 5.2). Estos datos se resumen en la tabla 5.3 que compara los valores predichos de inducción para cada metal, con los observados.

**Tabla 5.3. Valores de inducción predichos y observados para cada metal.**

| | EC-GolTS$_{S77C}$ | | STM-GolS$_{S77C}$ | |
|---|---|---|---|---|
| Metal[a]/cepa | Predicho | Observado | Predicho | Observado |
| Au (2 μM) | 573,5 | 522,8 | 540,5 | 541,2 |
| Au (20 μM) | 577,7 | 570,3 | 545,8 | 550,3 |
| Pb (2 μM) | 62,1 | 58,4 | 211,1 | 208,4 |
| Pb (20 μM) | 62,8 | 61,9 | 215,3 | 220,6 |
| Hg (0,2 μM) | 285,9 | 273,8 | 344,4 | 329,6 |
| Hg (2 μM) | 288,5 | 294,6 | 347,1 | 343,8 |
| Cd (2 μM) | 64,1 | 56,2 | 89,7 | 76,8 |
| Cd (4 μM) | 87,4 | 89,3 | 168,6 | 154,3 |

[a] . Se expresa la concentración de metal en la muestras de agua aditivadas. Para los cálculos se utilizó la concentración final del metal en el ensayo que equivale a una dilución del metal al medio.
Todos los valores se expresan en veces de inducción en relación a la muestra sin metal.

En las mezclas, la respuesta obtenida en presencia de más un metal inductor parece ser aditiva. En la tabla 5.4 se resumen los valores de inducción predichos luego de la aplicación de la función de Hill a la respuesta de cada metal por separado (según la concentración de cada metal presente en la mezcla) y los valores esperados en la mezcla (Total) considerando que el efecto de los metales inductores es aditivo y que no existe sinergia entre los distintos metales. Dado la respuesta a Cu es prácticamente despreciable, a los efectos comparativos, este metal fue omitido de la tabla. Al comparar los datos de la fig 5.7 con los datos de la tabla, ambas bacterias biosensoras responden a las tres mezclas de acuerdo a lo esperado. Para aquellas mezclas que no saturan el sistema (Mix 2 y Mix3), los valores de inducción medidos (299,2 ± 34,6 y 98,7 ± 9,4 para las Mix 2 y 3, respectivamente, en EC-GolTS$_{S77C}$; y 129,3 ± 10,4 para la Mix 3 en STM-GolS$_{S77C}$) son muy similares a los predichos según la tabla 5.4.

Por el contrario, para aquellas mezclas que tienen concentraciones de metales individuales que saturan el sistema biodector, es decir, la suma da un valor mayor al valor máximo observado en presencia de los metales que más inducen al sistema (Mix1

para ambas cepas y Mix2 para el biosenosr STM) la respuesta observada es menor a la esperada y coincide con los valores máximos observados a concentraciones elevadas de Au y Hg.

**Tabla 5.4. Valores de inducción esperados para cada metal en las mezclas.**

| | Mix 1 | | Mix 2 | | Mix 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Metal/cepa biosensora | EC[a] | STM[b] | EC[a] | STM[b] | EC[a] | STM[b] |
| Au | 573,5 | 540,5 | 141,6 | 86,2 | 20,9 | 12,6 |
| Pb | 62,95 | 211,1 | 54,2 | 61,5 | 22,2 | 14,4 |
| Hg | 285,9 | 344,4 | 84,1 | 332,6 | 16,4 | 48,9 |
| Cd | 64,1 | 89,7 | 81,1 | 133,7 | 48,5 | 62,5 |
| Total[c] | 987,7[d] | 1195,7[d] | 361 | 614[d] | 108 | 138 |

[a]. EC: EC-GolTS$_{S77C}$
[b] . STM: STM-GolS$_{S77C}$
[c]. Suma de las inducciones esperadas para cada metal. Representa el valor esperado de inducción en presencia de todos los metales.
[d]. Valores que superan el máximo valor de inducción observados a concentraciones elevadas de los metales ensayados.
Todos los resultadas se expresan en veces de inducción en relación a la muestra sin metal

*Estos resultados validan el uso de estos biosensores para la evaluación de muestras complejas, si bien para confirmar este punto hace falta realizar estudios complementarios, como la evaluación de un número más importante de mezclas que incluyan tanto metales inductores como no inductores en distintas combinaciones y concentraciones variables, y la evaluación de muestras ambientales que pueden contener otros contaminantes que pueden interferir con los ensayos.*

### 5.2.5. Generación de una variante del sensor GolS que detecta un mayor espectro de metales.

El sensor GolS$_{S77C}$ fue capaz de ampliar el espectro de metales detectados por GolS silvestre para incluir, además de $Au^{+1}$, iones metálicos divalentes como $Hg^{+2}$, $Cd^{+2}$ y $Pb^{+2}$, pero no detecta iones de Cu ni Ag (Figura 5.9). Por ello, nos propusimos generar una nueva variante que incluya estos metales para ampliar el espectro de metales detectados cuando este sensor proteico es empleado en la construcción de biosensores bacterianos. Estudios previos realizados en el laboratorio, demostraron que el determinante de la selectividad de GolS por $Au^{+1}$ es la región del denominado rulo de unión a metal (entre los aminoácidos C111-C120). El reemplazo de los residuos que componen esta región en GolS por los correspondiente a CueR resultó en un sensor mutante, GolSL, que sin perder la capacidad de responder a $Au^{+1}$, detecta además $Cu^{+1}$

y $Ag^{+1}$ (Checa y col., 2007; Ibáñez y col., 2013). En vistas de estos resultados, decidimos combinar esta mutación y la mutación S77C para generar una nueva variante de GolS que posea un espectro más amplio de metales detectados. Para ello, generamos el alelo mutante *golS*$_{S77C+L}$ en el cromosoma de *S. Typhimurium* mediante amplificación y transformación con ADN lineal como se indica en Materiales y Métodos, sección 3.6.3. La cepa que transporta esta construcción, *golS*$_{S77C+L}$ *golB::*$cm^R$, se transformó con el plásmido reportero PgolB-gfp, para generar el bioreportero STM-golTS$_{S77C+L}$ y se evaluó la respuesta a distintos metales.

Como se observa en la figura 5.9, el bioreportero STM-GolS$_{S77C+L}$ conserva los niveles de respuesta a Au y Hg del bioreportero STM golS$_{S77C}$, pero adquiere además la capacidad de detectar iones de Ag y Cu acuerdo a lo esperado. Si bien, los niveles de expresión del reportero en presencia de Cu o Ag fueron menores en comparación que los obtenidos en presencia de Au o Hg, los incrementos son significativos en comparación con la condición de no inducción. La cuantía de la respuesta a Cu y Ag se condice además con lo previamente reportado para el sensor GolS$_L$ (Checa y col., 2007) y para el sensor CueR silvestre [(Pérez Audero y col., 2010), ver también fig. 4.2].

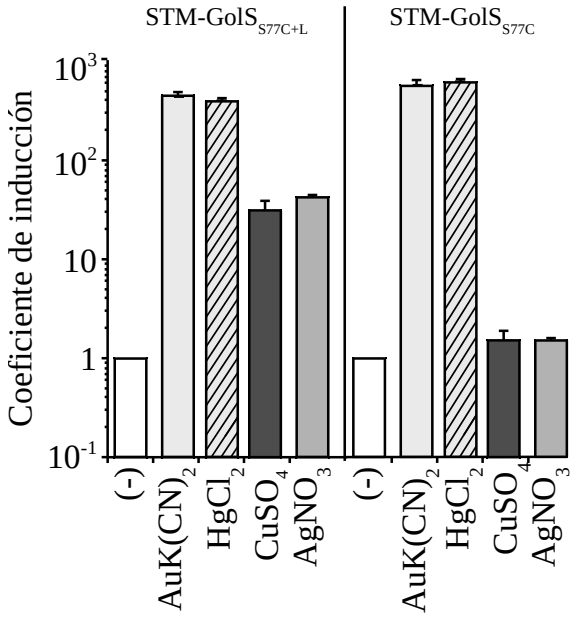



**Figura 5.9 Respuesta del bioreportero STM golS$_{S77C-L}$ a metales pesados**. Se ensayó la respuesta de los bioreporteros STM-GolS$_{S77C+L}$ y STM-GolS$_{S77C}$ cultivados en medio mínimo SM9 e incubados por 3 horas en presencia de 1 μM $KAu(CN)_2$, 0,1 μM $HgCl_2$, 10 μM $CuSO_4$ y 10 μM $AgNO_3$. Los resultados muestran el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Coeficiente de inducción es la relación entre las unidades específicas de fluorescencia (UEF) con respecto a las células cultivadas en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Si bien aún queda determinar la capacidad del bioreportero de detectar otros metales divalentes en un entorno mutante en la ATPasa ZntA, y transferir el sistema bioreportero a *E. coli*, estos resultados sientan las bases para el desarrollo de un biosensor capaz de detectar iones de Au, Ag, Cu, Hg, Pb y Cd con aplicación potencial en monitoreo ambiental.

### 5.3. Conclusiones Capítulo II.

En este capítulo desarrollamos biosensores no selectivos para la detección de un amplio espectro de metales de transición usando la plataforma GolS/PgolB-gfp desarrollada en el Capítulo I para la detección selectiva de iones Au, pero utilizando las variantes $GolS_{S77C}$ y $GolS_{S77C+L}$ de amplio espectro para la detección de metales, como módulo sensor de los dispositivos.

El biodetector STM-$GolS_{S77C}$ detecta Au con una sensibilidad y con un rango de detección efectivo similares (31,06 – 1450 nM) a los del bioreportero basado en GolS silvestre, que se desarrolló en el Capítulo I de esta Tesis. Por otro lado, el sensor fue capaz de detectar otros metales como Hg en un rango de concentraciones de 4,68 nM – 222 nM (0,94 – 44,13 ppb); Pb, en un rango entre 34,23 – 1725 nM (7,09 – 362,6 ppb); y Cd, en un rango entre 202,71 – 5160 nM (22,79 – 580,04) valores similares a otros sensores reportados.

El sistema basado en $GolS_{S77C}$ pudo ser transferido a *E. coli* exitosamente. Utilizando esta bacteria se comprobó que el sistema bioreportero de responder a Au, Hg, Pb y Cd de manera similar a lo observado en *Salmonella*, tanto respecto al límite como al rango de detección efectivo para cada metal. El biosensor detecta Au en un rango de concentraciones entre 34,26 – 1478 nM (6,75 – 291,96 ppb); mercurio, entre 4,37 nM y 147,7 nM (0,88 – 29,62 ppb); Pb, en un rango entre 39,68 – 290 nM (8,22 – 60,11 ppb); y Cd, entre 248,65 y 2580 nM (27,95 – 290 ppb), en los últimos dos casos cuando la bacteria residente carece del transportador ZntA. Los niveles de inducción en presencia de Pb y Cd para el biosensor construido en *E. coli* fueron menores que los observados para el bioreportero ensayado en *Salmonella* probablemente debido a los efectos tóxicos exacerbados para estos metales que se observan en *E. coli.*

Además, logramos generar el sensor proteico $GolS_{S77C+L}$ y construir con este un

nuevo sistema bioreportero en *Salmonella* que detecta Cu y Ag además de Au y Hg. Esta variante utilizada en la generación de biosensores usando *E. coli* como bacteria residente se prevé será capaz de detectar Au, Hg, Pb, Cd, Cu y Ag.

Por otro lado, realizamos ensayos para determinar si los sensores desarrollados son capaces de detectar metales cuando estos se encuentran en aguas aditivadas, tanto solos como formando parte de distintas mezclas. Si bien los resultados son preliminares y no consideran muchos factores que podrían influenciar la detección de los metales en muestras del ambiente, tanto el bioreportero de STM-GolS$_{S77C}$ como EC-GolTS$_{S77C}$, fueron capaces de detectar la presencia de metales tóxicos en las muestras complejas. Por su alta sensibilidad, amplio rango de detección y particularmente por ser no selectivos, estos desarrollos, en su estado actual y en condiciones de laboratorio, sirven como prueba de concepto para la utilización de estas herramientas tecnológicas en la detección rápida de la presencia de metales pesados tóxicos (Hg, Pb, Cd y Au) como contaminantes en muestras del ambiente, con particular aplicabilidad en el análisis de muestras de agua para consumo.

Finalmente, los resultados aquí presentados muestran la potencialidad de la plataforma basada en GolS/PgolB-gfp para el desarrollo de nuevos biosensores. Demostramos que la simple modificación del módulo sensor, el principal determinante de la sensibilidad y selectividad de estos dispositivos mediante técnicas de mutación sitio dirigidas posibilitan la generación biosensores selectivos o no selectivos para la detección de diferentes metales. La generación de estas variantes y estudios estructurales para caracterizar la interacción de estos sensores proteicos con los metales puede además contribuir al campo de estudio de las metaloproteínas.

# 6. Capítulo III

"*Caracterización del sistema de eflujo* GesABC de *Salmonella"*

## 6.1. Introducción

La envoltura bacteriana actúa como un frente de batalla protegiendo a la bacteria del estrés (Bury-Mone y col., 2009). Sus componentes, no sólo desempeñan funciones importantísimas para proteger a los componentes de la célula de alteraciones producidas en las diversas condiciones de crecimiento, sino que además son capaces de inducir respuestas adaptativas para recuperar la homeostasis. En *E. coli*, se han descripto un número importante de vías regulatorias que se inducen en respuesta al estrés de la envoltura (Rowley y col., 2006). Estos sistemas están involucrados en la biogénesis, el mantenimiento, y la reparación de la envoltura celular y, por lo tanto, contribuyen a la integridad de la bacteria. Además, modulan funciones bacterianas esenciales como movilidad, división celular y formación de biopelículas (Beloin y col., 2004). La mayoría de estos reguladores se encuentran en casi todos los genomas bacterianos secuenciados (Laub y Goulian, 2007; Rowley y col., 2006).

Como se detalla en la introducción (Sección 1.2.4) los sistemas de dos componentes juegan un rol primordial en la detección y transmisión de señales que indican el estado de la envoltura bacteriana. Las bacterias codifican para una amplia variedad de estos sistemas que pueden estar involucrados tanto en la respuesta a un estrés específico, como la presencia de un metal (*cusRS*, Cu) o a condiciones de estrés generales (BaeRS, CpxAR y RcsDCB) (Munson y col., 2000; Shen y Fang, 2012).

Las bombas de eflujo del tipo CBA, están involucradas principalmente en la eliminación de diversos sustratos, entre ellos antibióticos o compuestos tóxicos, incluyendo metales, al entorno extracelular a fin de aliviar el estrés que estos puedan estar causando en la membrana interna o el espacio periplasmático (Tal y Schuldiner, 2009). Dada su función, la expresión de estos transportadores suele estar controlada a diferentes niveles, involucrando tanto reguladores generales como específicos (Piddock, 2006). Por ejemplo, la expresión de la bomba de eflujo AcrAB-TolC de *E. coli*, una de las mejor estudiadas, está controlada tanto por el regulador local AcrR (un regulador de la familia TetR); como por MarA, Rob y SoxS, reguladores globales perteneciente a la familia AraC/XylS de activadores transcripcionales (Alekshun y Levy, 2004; Martin y col., 2000; Miller y col., 1994). Además, se ha demostrado que SdiA, un regulador de *quorum sensing* de la familia LuxR, también controla la expresión de la bomba AcrAB (Kanamaru y col., 2000). En otros miembros de la familia Enterobacteriaceae como *S.*

Typhimurium, *Enterobacter aerogenes*, y *Klebsiella pneumoniae* que poseen homólogos a la bomba de eflujo AcrAB, la evidencia acumulada indica que RamA, también perteneciente a la familia AraC/XylS, es un regulador esencial para la expresión de la bomba, mientras que los reguladores globales descriptos en *E. coli*, sólo actúan como moduladores (Piddock, 2006).

GesABC es una bomba de eflujo del tipo CBA perteneciente al regulón *gol* de resistencia a Au (Checa y Soncini, 2011). Durante la caracterización inicial del sistema GesABC de *Salmonella* en la resistencia a oro (Pontel y col., 2007), se observó que, a diferencia de los otros genes controlados por GolS, este sistema se expresa sólo a concentraciones elevadas del metal. De hecho, el sitio operador de GolS en el promotor de *gesABC* es el menos conservado dentro del regulón que resulta no sólo en la expresión retrasada del sistema del sistema de eflujo comparada con los otros transportadores, sino que no se expresa en presencia de Cu, aún en una bacteria que carece del transportador de cobre CopA, como si lo hacen los otros genes del regulón *gol* (Pontel y col., 2007). Por otro lado, GesABC es más homologo a sistemas que detoxifican drogas como AcrAB-TolC que a los que detoxifican metales, como CusABC de *E. coli* (Pontel y col., 2007). En este sentido, estudios realizados en nuestro laboratorio y contribuciones de otros grupos de investigación demostraron que en presencia de Au o cuando *gesABC* se sobreexpresa desde un plásmido, se incrementa la resistencia a compuestos orgánicos como azul de metileno y cristal violeta, aunque este fenotipo se evidencia solamente en un entorno delecionado en la principal bomba de eflujo de *Salmonella* AcrAB (Nishino y col., 2006; Pontel y col., 2007). Estos resultados sugieren que esta bomba podría ser requerida en otras condiciones de estrés además del estrés metálico por exceso de oro. Esto, junto con los reportes que indican la existencia de múltiples niveles de regulación que involucran reguladores globales, además de locales, en respuesta a distintas condiciones de estrés para este tipo de transportadores, nos condujeron a plantear la hipótesis de que la expresión de GesABC podría estar sometida a otros sistemas de regulación, además del regulador local GolS. En este capítulo se detallan los resultados obtenidos en este sentido como parte de la caracterización de GesABC.

## 6.2. Resultados y discusión

### 6.2.1. Análisis bioinformático de la región promotora de *gesABC.*

En primer término, nos propusimos analizar la región promotora de *gesABC*, que como mencionamos anteriormente es la menos conservada dentro del regulón *gol*, en busca de elementos regulatorios adicionales. Dado que los sistemas de eflujo CBA dirigen el eflujo desde el periplasma o la membrana interna hacia el exterior celular, decidimos iniciar la búsqueda de sitios putativos de unión de reguladores globales vinculados al mantenimientos de la homeostasis a nivel de la envoltura como BaeR, RcsB, y CpxR, para los que se conocen las secuencias operadoras (Hobman y col., 2007). Con esta información, generamos matrices de probabilidad dependiente de la posición para la secuencia consenso de unión de cada uno de estos reguladores con la herramienta bioinformática MEME (Bailey y col., 2006). Estas matrices describen la probabilidad de que ocurra una base dada en una determinada posición, generando además un consenso (figura 6.1 A). Con cada matriz generada, analizamos una región del genoma de *Salmonella* de 900 pb que incluye la región intergénica entre los operones *gesABC* y *golTS* y ~300 pb corriente abajo de los transcriptos de estos operones divergentes, utilizando el programa MAST (Bailey y Gribskov, 1998). Este programa busca la ocurrencia de la matriz de probabilidad proveniente de MEME en una determinada secuencia.

Así, logramos identificar un sitio putativo para la unión del regulador CpxR que se encuentra en la posición -61 a -46 pb del sitio de inicio de la transcripción del operón *ges*ABC, corriente arriba del sitio de unión a GolS (Fig. 6.1 B), y que se ajusta muy bien al consenso [ *p-value* de $8{,}93\ 10^{-4}$ (el *p-value* es la probabilidad de observar una coincidencia del motivo al menos tan buena como cuando se compara con una secuencia al azar. Cuanto menor es el *p-value*, mayor es la coincidencia (Bailey y Gribskov, 1998)]. Para los demás reguladores, no logramos identificar secuencias putativas de unión en esta región.

Como se detalló en la introducción (Sección 1.4.1), CpxR es el regulador transcripcional asociado a la quinasa sensora CpxA asociada a membrana interna que detecta diversas señales en el periplasma, tales como la presencia de proteínas desplegadas, alteraciones en los lípidos de la membrana interna, pH y metales como Cu y Zn entre otras (Raivio, 2013). Este sistema de dos componentes, en el cual la actividad

de CpxR se controla mediante fosforilación, controla la transcripción de una gran cantidad de genes, entre los que se incluyen *degP*, *dsbA*, *ppiA*, y el propio sistema de regulación *cpxRA*, entre otros (Raivio, 2013).

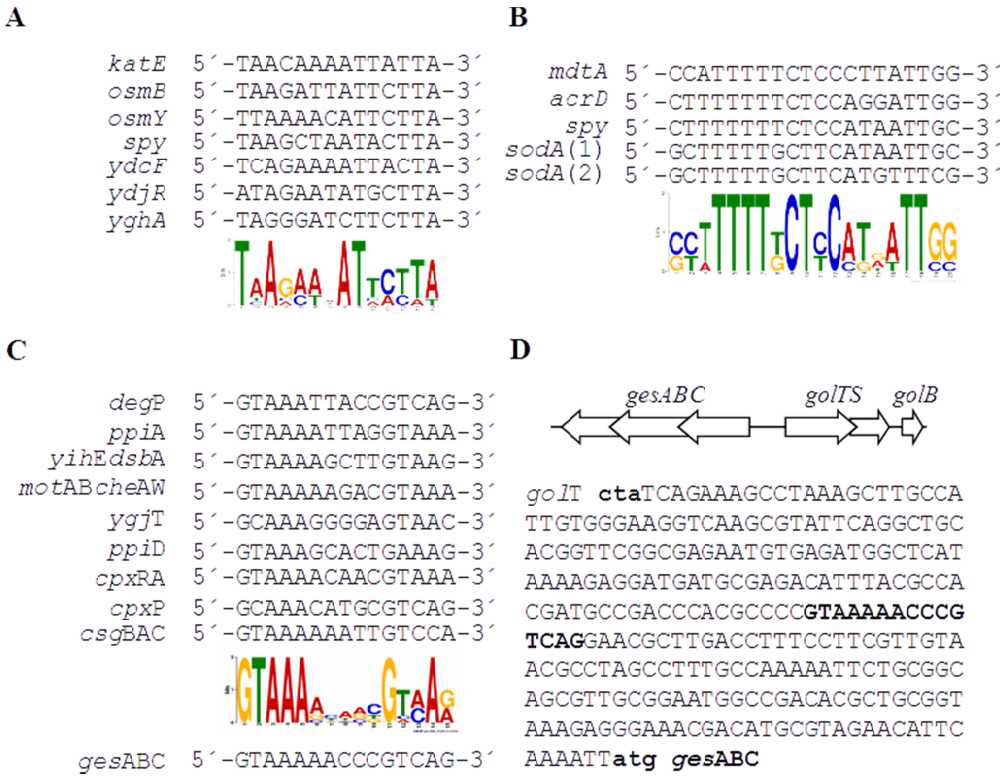



**Figura 6.1. Estudios *in silico* del promotor de *gesABC*.** Se muestran las secuencias utilizadas para construir las matrices de probabilidad mediante el programa MEME y los logos correspondientes a los sitios consenso de unión de RcsB **(A)**; BaeR **(B)** y CpxR **(C)**. En la parte inferior del logo correspondiente a CpxR se destaca el sitio putativo de unión a CpxR encontrado en la región promotora de *gesABC*. **D.** Representación del locus *gol* en *Salmonella* y secuencia de ADN de la región intergénica de *gesABC-golT*. La secuencia consenso del sitio de unión a CpxR se encuentra resaltada en negrita.

### 6.2.2. El sistema de dos componentes CpxAR activa la expresión de *gesABC*.

Para verificar si efectivamente CpxR controla la expresión de *gesABC*, analizamos la respuesta de un reportero cromosomal *gesABC*::*lacZ*, ya disponible en el laboratorio (Pontel y col., 2007), en un entorno silvestre y ΔcpxR también disponible en el laboratorio, tanto en presencia de oro como en su ausencia. Además, dado que una de las señales reconocidas por el sistema CpxAR es el pH del medio, realizamos estas determinaciones tanto a pH 5,5, condición de no activación del sistema, como a pH 7,0, donde el CpxAR se activa.

Como se observa en la figura 6.2, la expresión de *gesABC* en ausencia de Au es

prácticamente nula tanto en la cepa silvestre como en la mutante ΔcpxR, y no se observan diferencias a los distintos pH ensayados. En presencia de 5 μM $AuHCl_4$ y a pH 5,5 se observa un incremento en la expresión del reportero que es similar para ambas cepas analizadas. Sin embargo, a pH 7,0 y en presencia de Au la actividad β-galactosidasa para la cepa silvestre aumenta más del doble respecto a los valores medidos a pH 5,5 en presencia del metal (fig. 6.2). Este incremento no se observa en la mutante ΔcpxR cultivada en las mismas condiciones, sugiriendo que el sistema CpxRA está involucrado en la regulación de la expresión del sistema GesABC a pH 7,0 y en presencia de iones de Au.

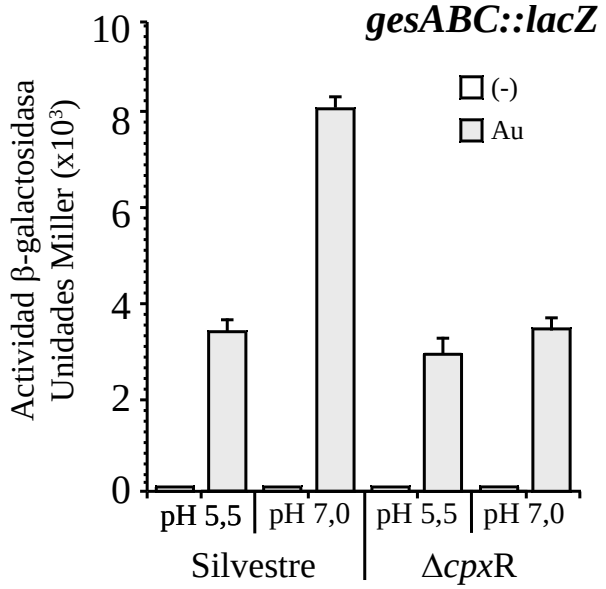



**Figura 6.2. CpxR activa la expresión de *gesABC* a pH7 y en presencia de Au.** Medidas de actividad β-galactosidasa (unidades Miller) del reportero *gesABC::lacZ* un entorno silvestre o Δ*cpxR*. Todas las cepas fueron crecidas con agitación a 37 °C por un período de 18 horas en medio rico LB-MES-MOPS, pH 5,5 o 7,0 según se indica; y en ausencia de metal o en presencia de 5 μM $AuHCl_4$. El gráfico muestra el promedio de al menos 3 ensayos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Como el efecto de CpxR sólo se evidenció en presencia de Au, decidimos analizar la expresión de *gesABC* en un entorno Δ*gol*S y Δ*cpxR* Δ*gol*S. En este caso, para agilizar el trabajo utilizamos un reportero plasmídico Pges-lacZ, ya disponible en el laboratorio. Como se observa en la figura 6.3, con este nuevo reportero se obtuvieron los mismos resultados que con el reportero cromosomal para las cepas silvestre y ΔcpxR. Por el contrario, y de acuerdo a lo previamente reportado (Pontel y col., 2007) la inducción por Au se pierde completamente en la mutante delecionada en el gen *gol*S, tanto a pH 7,0 como a pH 5,5, observándose valores de actividad β-galactosidasa

similares a los obtenidos en ausencia del metal. En concordancia, el mismo comportamiento se observó para la doble mutante Δ*cpxR* Δ*gol*S (Fig. 6.3).

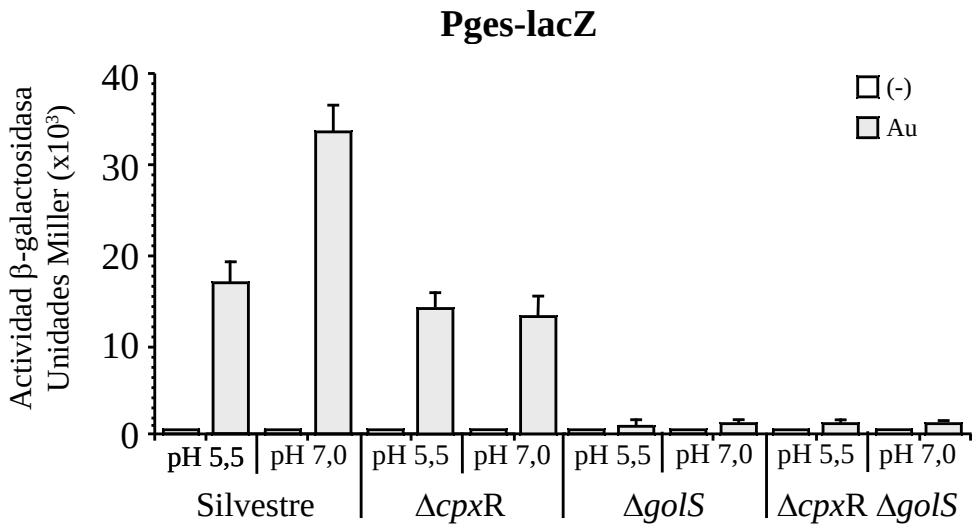



**Figura 6.3. CpxR modula la expresión de gesABC actuando como un regulador auxiliar.** Medidas de actividad β-galactosidasa (unidades Miller) del reportero Pges-lacZ en la cepa silvestre de *Salmonella* o en mutantes Δ*cpxR*, Δ*golS* o Δ*cpxR* Δ*golS*. Todas las cepas fueron crecidas con agitación a 37 °C por un período de 18 horass en medio rico LB-MES-MOPS, pH 5,5 o 7,0 según se indica; y en ausencia de metal o en presencia de 5 μM $AuHCl_4$. El gráfico muestra el promedio de al menos 3 ensayos independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Estos resultados indican que el regulador GolS es esencial para la expresión del sistema GesABC, en tanto que CpxAR sólo actuaría como corregulador o regulador auxiliar, incrementando los niveles de expresión en determinadas condiciones como a pH 7,0. En este sentido ya se había reportado un papel similar de CpxR en la activación de la expresión de las bombas de eflujo MdtABC y el componente AcrD de la bomba AcrAD-TolC, en donde BaeRS es esencial para la expresión de estos genes y CpxR sólo modula su expresión (Hirakawa y col., 2005). [AcrD, es una proteína tipo RND que se asocia a AcrA y TolC para dirigir el eflujo de algunos compuestos (Sharff y col., 2001)]. Sin embargo, dado que el sitio putativo de unión a CpxR se encuentra en la región intergénica del divergón *gesABC-golTS*, también existe la posibilidad de que la regulación mediada por CpxAR no sea directa sobre el promotor de *gesABC* sino modulando la expresión del regulador local GolS.

En este sentido, un análisis de los sitios de unión de CpxR en varios genes pertenecientes al regulón Cpx de *E. coli* (Price y Raivio, 2009) reveló que existe una

gran heterogeneidad respecto a la ubicación y orientación del sitio relativa al gen regulado. Como se observa en la Tabla 6.1, los sitios de unión a CpxR se pueden encontrar tanto en las cercanías del promotor, como a distancias que pueden superar los 400 pb corriente arriba del gen regulado, pero también hasta unas 150 pb corriente abajo del mismo. Los sitios pueden ser únicos o múltiples y estar orientados en la misma orientación ($GTAAA_{(N4-8)}GTAAA$) o en orientación contraria ($TTTAC_{(N4-8)}TTTAC$) al sitio de inicio de la transcripción del gen regulado. Además, como se mencionó en la introducción, no se puede predecir a partir de la orientación o la posición en relación al sitio de inicio de la transcripción del gen que regula, si CpxR actúa como activador o represor. Por ello, y en vista de los resultados mostrados en la fig. 6.3, decidimos analizar si CpxR está influenciando la expresión de *gesABC* directamente, o indirectamente, modulando la expresión del regulador local GolS, codificado en el operón *golTS*.

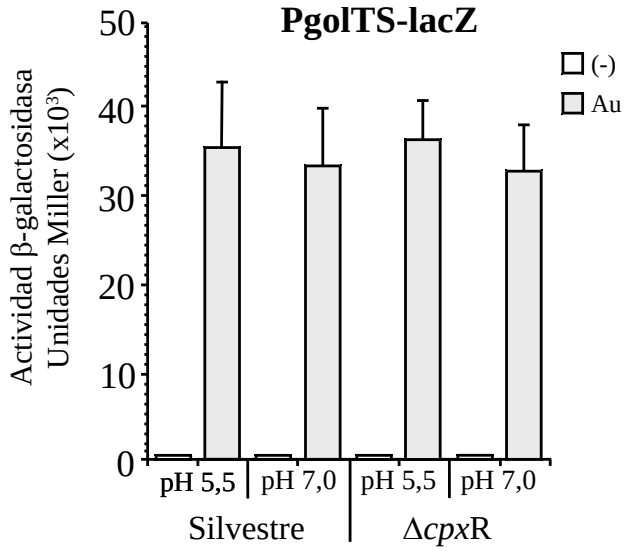



**Figura 6.4. Análisis de la expresión de un reportero *golTS*.** Medidas de actividad β-galactosidasa (unidades Miller) del reportero PgolTS-lacZ en una cepas silvestre de *Salmonella* o una mutante Δ*cpxR*. Todas las cepas fueron crecidas con agitación a 37 °C por un período de 18 horas en medio rico LB-MES-MOPS, pH 5,5 o 7,0 según se indica; y en ausencia de metal o en presencia de 5 μM $AuHCl_4$. El gráfico muestra el promedio de al menos 3 ensayos independientes realizados por triplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Se procedió entonces a analizar la expresión del reportero PgolTS-lacZ (Pérez Audero y col., 2010) en una cepa silvestre o una mutante ΔcpxR en las mismas condiciones utilizadas anteriormente. Como se observa en la figura 6.4, la expresión del reportero se incrementa en presencia de oro en igual cuantía tanto en la cepa silvestre como en la mutante e independiente del pH del medio de cultivo empleado.

**Tabla 6.1. Características de los sitios de unión de CpxR en *E. coli***

| Gen/operón | Función | Posición en relación al sitio de inicio de la transcripción | Orientación | Efecto de CpxR en la regulación | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|
| *tsr* | Subunidad del complejo de señalización de quiotaxis | -16 – -2 | Directa[1] | Activa | (De Wulf y col., 1999) |
| *psd* | Fosfatidil serina decarboxilasa | 158 – 144 | Reversa[2] | Reprime | (De Wulf y col., 2002) |
| *cpxP* | Regulador de la expresión de cpxR | -59 – -45<br>-39 – -25<br>-14 – 5 | Directa[1]<br>Directa[1]<br>Directa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006)<br>(Raivio y col., 2013) |
| *cpxRA* | Sistema de dos componentes de estrés periplasmático | -60 – -74<br>-40 – -54 | Reversa[1]<br>Reversa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006)<br>(Pogliano y col., 1997) |
| *rdoA dsbA* | Serin treonin protein quinasa / disulfuro oxidoreductasa | -56 – -42 | Directa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006) |
| *yidQ* | Proteína putativa de membrana interna | -262 – -246<br>-184 – -196<br>-151 – -136 | Directa[2]<br>Reversa[2]<br>Directa[2] | Activa | (Dartigalongue y col., 2001) |
| *ppiA* | Peptidil-propil cis-trans isomerasa | -40 – -54 | Reversa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006) |
| *yqjA mzrA* | Proteínas putativas de membrana interna | -54 – -40 | Directa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006) |
| *bacA* | Undecaprenil pirofosfato fosfatasa | -285 – -299 | Reversa[2] | Activa | (De Wulf y col., 2002) |
| *dsbC* | Disulfito oxidoreductasa | -385 – -398<br>-350 – -364 | Reversa[2]<br>Reversa[2] | Activa | (Dartigalongue y col., 2001) |
| *bamE* | Subunidad del complejo de ensamblado de proteínas de membrana externaperiplasmáticas | 4 – 18 | Directa[2] | Reprime | (De Wulf y col., 2002) |
| *ung* | Uracil-ADN glicosilasa | -88 – -74 | Directa[1] | Reprime | (Ogasawara y col., 2004) |
| *rpoE* | Factor $\sigma^E$ de la ARN polimerasa | 74 – 60 | Reversa[2] | Reprime | (De Wulf y col., 2002) |
| *acrD* | Subunidad de la bomba de eflujo AcrAD-TolC | -136 – -119<br>-104 – -92<br>-74 – -58 | Directa[1]<br>Directa[1]<br>Directa[1] | Activa | (Hirakawa y col., 2005) |
| *ompC* | Porina C | -344 – -358<br>-127 – -141<br>-90 – -100 | Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1] | Activa | (Batchelor y col., 2005 |
| *mdtABC* | Sistema de eflujo RND | -136 – -121<br>-73 – -60 | Directa[1]<br>Directa[1] | Activa | (Hirakawa y col., 2005) |
| *fntB* | Proteína putativa tipo ferritina | -68 – -54 | Directa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2005) |
| *motAB cheAW* | Subunidades del motor flagelar | -30 – -44 | Reversa[1] | Reprime | (De Wulf y col., 2002) |
| *yebB* | Proteína conservada de membrana interna | -37 – -51 | Reversa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006) |
| *spy* | Chaperón periplasmático | -43 – -57 | Reverta[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 2006) |
| *dgcZ* | Diguanilato ciclasa | -33 – -49 | Reversa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006) |
| *csgBAC* | Subunidades del curli | 1 – 15<br>-262 – -248<br>-471 – -457 | Directa[1]<br>Directa[2]<br>Directa[1] | Reprime | (De Wulf y col., 2002) |
| *csgD* | Regulador transcripcional | -179 – -193<br>-172 – -184<br>-159 – -173<br>-122 – -137<br>-102 – -115<br>-93 – -107<br>-89 – -102<br>-67 – -80<br>-41 – -55<br>-36 – -50<br>-45 – -59<br>-15 – -28<br>10 – -5 | Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa1<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1] | Reprime | (Ogasawara y col., 2010) |
| *efeU* | Proteína hipotética, transporte de Fe | -61 – -48 | Directa[1] | Reprime | (Yamamoto y Ishihama, 2006) |
| *ompF* | Porina F | -422– -437<br>-366 – -380<br>-86 – -100<br>-61 – -76 | Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1]<br>Reversa[1] | Reprime | (Batchelor y col., 2005)<br>(Raivio y col., 2013) |
| *aroG* | 2-dehidro-3-desoxifosfoheptonato aldolasa | -45 – -31 | Directa[1] | Activa | (Yamamoto y Ishihama, 2006) |
| *ppiD* | Proteína de plegado periplasmático | -172 – -158<br>-124 – -110<br>-104 – -89 | Directa[2]<br>Directa[2]<br>Directa[2] | Activa | (Dartigalongue y Raina, 1998) |
| *degp* | Serin proteasa periplasmática | -230 – -216<br>-80 – -63<br>-70 – -56 | Directa[1]<br>Directa[1]<br>Directa[1] | Activa | (Pogliano y col., 1997)<br>(Danese y col., 1995)<br>(Yamamoto y Ishihama, 2006) |

[1]Indica que existe videncia experimental de la unión de CpxR sobre la región promotora ya sea por unión de la proteína ***in vitro*** mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética o de huella dactilar, o evidencia ***in vivo*** por mutación del sitio de unión a CpxR

[2.] Indica que la presencia del sitio se determinó por métodos informáticos y no existe evidencia experimental.

*Estos resultados indican que la regulación CpxR-dependiente sobre gesABC es independiente de la expresión de GolS y, por lo tanto, sería directa por unión al sitio predicho mediante análisis in silico.*

### 6.2.3. CpxR se une a la región promotora de *gesAB*.

Para confirmar la interacción directa de CpxR con la región promotora del operón *ges*ABC, inicialmente realizamos ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. En los ensayos utilizamos una sonda de 249 pb que incluye los sitio predichos para la unión de CpxR y GolS sobre el promotor de *gesABC*, pero no el promotor de *golTS*, y cantidades crecientes de cada regulador por separado (Materiales y Métodos, sección 3.10). Como se observa en la figura 6.5 A, GolS produjo el retardo de la sonda a partir de una concentración de 0,125 μM,

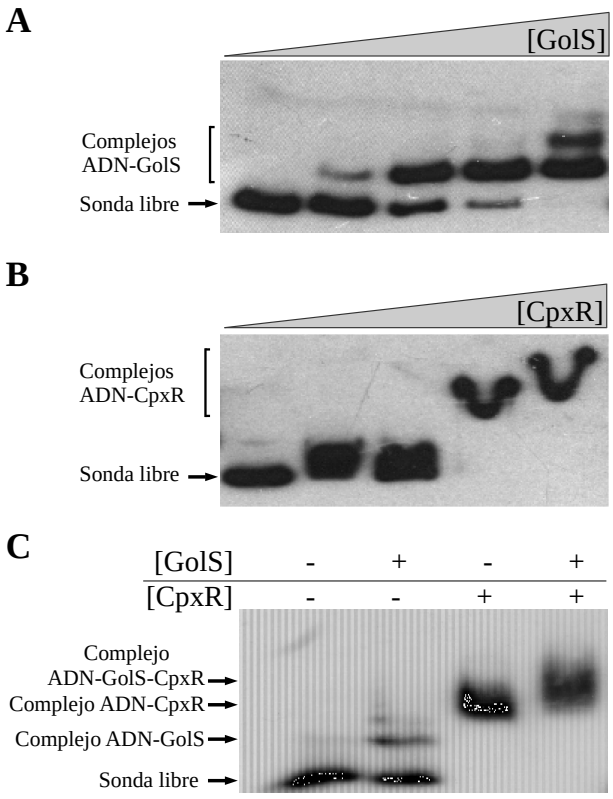



**Figura 6.5. GolS y CpxR interaccionan conjuntamente con la región promotor de gesABC.** Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida. Un fragmento de 249 pb que contiene la región promotora de *gesABC* marcado con $^{32}$P fue incubado con 0; 0,125; 0,25 y 0,5 μM de GolS (A); 0; 0,25; 0,5; 1 y 2 μM de CpxR (B); o con 0; 0,25 μM de GolS; 0,5 de CpxR μM; o una mezcla conteniendo 0,25 μM de GolS y 1 μM de CpxR (C).

lográndose el retardo completo a 0,5 μM. Estos resultados coinciden con lo previamente reportado (Pontel y col., 2007). Por su parte, CpxR produjo retardo en la movilidad electroforética de la sonda a partir de una concentración de 1 μM. (fig. 5B).

Por otra parte, decidimos evaluar si las dos proteínas son capaces de unirse a la sonda conjuntamente. Para ello realizamos un ensayo de retardo de la movilidad electroforética, con el agregado de ambos reguladores en una concentración de 0,25 μM GolS y 1 μM CpxR, utilizando un gel en gradiente de sacarosa de entre 3-8 % de acrilamida (Materiales y métodos, sección 3.10). Como se observa en la figura 6.5 C, el agregado de ambas proteínas producen un retardo mayor de la sonda que el agregado de cada uno por separado a la misma concentración. Cabe destacar que no se observaron diferencias cuando se cambió el orden de adición de los reguladores a la mezcla de reacción.

*El conjunto de resultados indica que tanto CpxR como GolS son capaces de unirse a la sonda independientemente y que la unión de uno de ellos aparentemente no interfiere en la interacción con el otro regulador. También es importante destacar que CpxR no se requiere de la unión previa de GolS para interaccionar con el sitio, aunque aparentemente la unión del regulador local es esencial para activar la transcripción de gesABC.*

### 6.2.4. Determinación del sitio de unión de CpxR.

Para verificar si el sitio de unión de CpxR en el promotor de *gesABC* coincide con el sitio predicho mediante análisis *in silico* (fig. 6.1), realizamos ensayos de protección a la digestión por ADNasa I (DNAsa *footprinting*) para el operón *gesABC*, comparando el patrón de protección frente al agregado de GolS o CpxR por separado o en presencia de ambos reguladores (figura 6.6).

La región protegida por GolS, de la posición -16 a -47 relativa al inicio de la transcripción (fig. 6.6), coincide con la previamente reportada (Pontel y col., 2007). Además, se observan las bandas hipersensibles a la digestión por ADNasa I características de este regulador en las posiciones -21 y -34. Por su parte, CpxR protegió una región (posición -39 a -66 relativa al sitio de inicio de transcripción) que se encuentra ubicada corriente arriba del sitio de unión de GolS y que se superpone

parcialmente con ella (fig 6.6). Además, la base -66 mostró hipersensibilidad a la digestión por ADNasa I. La región protegida por CpxR contiene el sitio de unión predicho GTAAAAACCCGTCAG mediante análisis bioinformático (fig. 6.1).

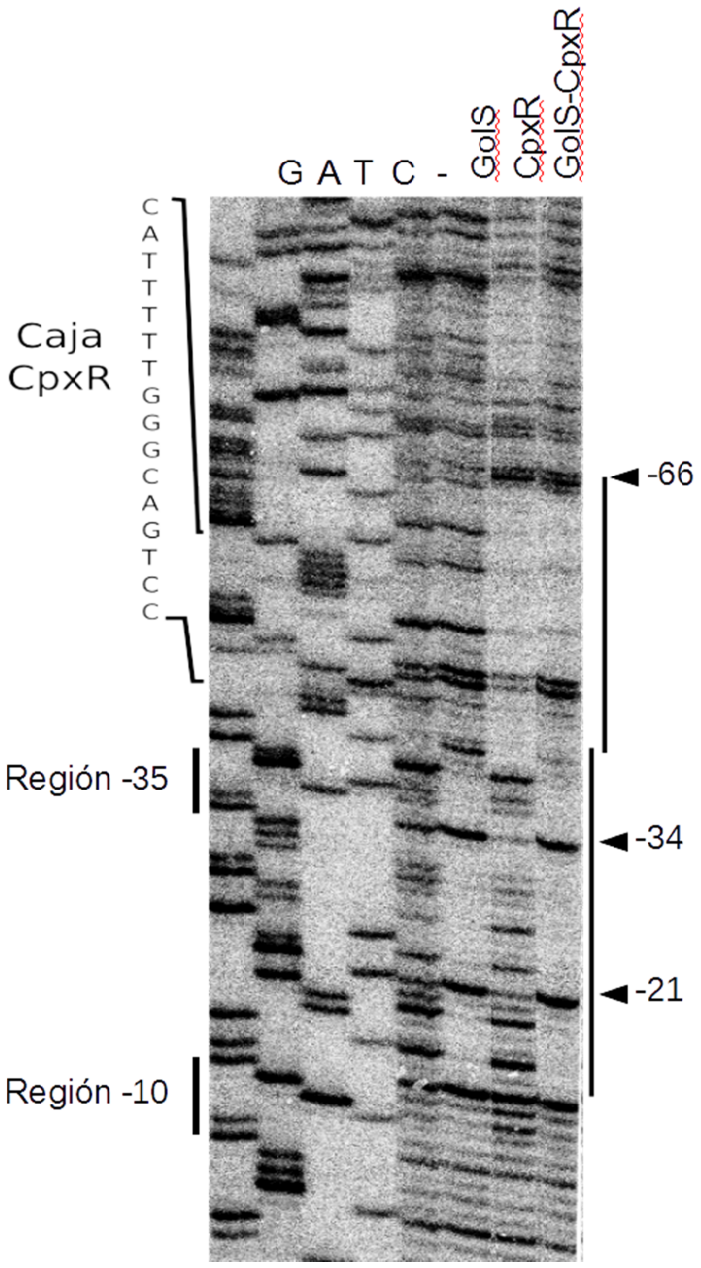



**Figura 6.6. Mapeo del sitio de unión de CpxR en la región promotora del operón *gesABC*.** Ensayos de protección a la digestión con ADNasa I. Se incubo la sonda marcada de 249 pb correspondiente a la hebra complementaria con 0,25 μM GolS y/o 0,5 μM CpxR según se indica. Se resaltan a la izquierda la caja de unión de CpxR y las regiones -10 y – 35 del promotor de *gesABC*; y a la derecha las regiones protegidas por GolS y CpxR y las posiciones de las bandas de hipersensibilidad a la digestión por ADNasa I.

La unión simultánea de GolS y CpxR genera una región de protección que incluye ambos sitios (desde la posición -16 a -66), manteniendo la hipersensibilidad de las bandas -21, -34 y -66. Estos resultados confirman que ambos reguladores son capaces interaccionar a la vez con la región promotora de *gesABC* y que la forma en que interaccionan con el ADN parece no diferir sustancialmente cuando la unión se da en forma conjunta o por separado. El hecho de que los sitios de unión para el regulador local y CpxR se superpongan parcialmente también había sido observada para otros genes modulados por CpxR, como *mdtABC* y *acrD (Hirakawa y col., 2005)*.

Para verificar *in vivo* la unión de CpxR al sitio predicho (caja CpxR), construimos un plásmido reportero para el promotor de *gesABC* en el que se introdujeron mutaciones puntuales en el sitio putativo de unión de este regulador, a fin de impedir la interacción (Materiales y Métodos, sección 3.3.1.10). Estas mutaciones reemplazan la secuencia silvestre 5'-GTAAAAACCCGTCAG-3' por la secuencia 5'-**cact**AAACCC**ca**C**t**G-3' en una región de ~300 pb que contiene la región promotora de *gesABC*. El plásmido reportero modificado, al que de nominamos PgesΔbox-*lacZ*, fue introducido en la cepa silvestre de *S.* Typhimurim o en mutantes ΔgolS, ΔcpxR o ΔgolS ΔcpxR para ensayar la expresión de la enzima β-galactosidasa en presencia o ausencia de Au, tanto a pH 5,5 como a pH 7,0. Como se observa en la figura 6.7, la actividad β-galactosidasa se incrementó en presencia de Au en la cepa silvestre. Sin embargo, los niveles de inducción fueron los mismos tanto a pH 5,5 como a pH 7,0, en contraste con lo observado en las cepas que transportan el plásmido reportero que lleva la construcción silvestre Pges-lacZ que mostró un aumento de dos veces en la actividad β-galactosidasa a pH7,0 (fig. 6.3). En concordancia, la mutante ΔcpxR mostró el mismo patrón de inducción del reportero PgesΔbox-lacZ que la cepa silvestre, en tanto que los niveles de expresión del reportero en las mutantes ΔgolS o ΔgolS ΔcpxR no se modificaron por la adición de Au, en ambas condiciones ensayadas, lo que permitió verificar además que el sitio de unión de GolS permanece intacto en esta construcción. La pérdida de la activación adicional del promotor a pH 7,0 observada en la cepa silvestre y atribuida CpxR, indica que el regulador ya no puede interaccionar correctamente con la región promotora mutada para modular la transcripción, permitiendo además corroborar la identidad del sitio de unión predicho.

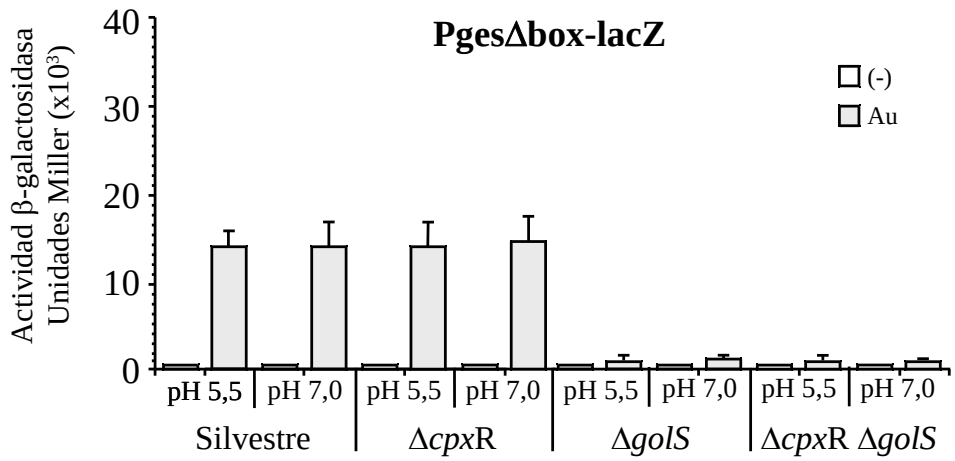



**Figura 6.7. CpxR interacciona *in vivo* con el sitio de unión predicho.** Medidas de actividad β-galactosidasa (unidades Miller) del reportero Pges-Δbox-lacZ en la cepa silvestre de *Salmonella* o en mutantes ΔcpxR; ΔgolS o ΔcpxR ΔgolS Todas las cepas fueron crecidas con agitación a 37 °C por un período de 18 horas en medio rico LB-MES-MOPS, pH 5,5 o 7,0 según se indica; y en ausencia de metal o en presencia de 5 μM $AuHCl_4$.

*El conjunto de resultados obtenidos hasta aquí demuestran que CpxR interacciona directamente con la región promotora de gesABC entre las bases en las posiciones -39 y -66 relativa al sitio de inicio de transcripción que coinciden con el sitio predicho para la unión del regulador, y que este sitio es esencial para que CpxR module la expresión gesABC in vivo. Por lo menos in vitro, no se requiere la unión previa de GolS al promotor para que CpxR se una. Sin embargo, la unión de CpxR solamente no es suficiente para activar la transcripción de gesABC in vivo, y se requiere de la presencia del regulador local GolS.*

### 6.2.5. La regulación mediada por CpxR de GesABC es importante para la resistencia a Au y a drogas orgánicas.

Las bombas de eflujo del tipo CBA como GesABC dirigen el eflujo de sus sustratos desde la membrana interna o desde el periplasma al exterior celular (Tal y Schuldiner, 2009). Por ello, el hecho de que CpxRA, involucrado en la respuesta al estrés periplasmático, module la expresión de GesABC podría tener relación con la funcionalidad de este sistema de eflujo. En este sentido, el sistema Cpx podría estar

incrementando la expresión de *gesABC* a fin de aliviar el estrés en el periplasma producto de los efectos tóxicos del Au en este compartimiento. Para comenzar a evaluar esta hipótesis, decidimos, evaluar la susceptibilidad a Au de la cepa silvestre y de mutantes Δ*gesABC*, Δ*cpxR*, Δ*gesABC* Δ*cpxR* a pH 7,0, condición en la que el sistema CpxAR está activo, mediante ensayos de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en placa. En los ensayos, incluimos además una mutante construida especialmente (Materiales y métodos, sección 3.6), a la que denominamos (ΔCpxR-box). En esta mutante se modificó en el cromosoma la secuencia del sitio de unión de CpxR en el promotor de *gesABC*, para generar el sitio **cact**AAACCC**ca**C**t**G, el mismo sitio incluido en el reportero PgesΔbox-lacZ. La inclusión de esta mutante en los ensayos tiene por objeto verificar si la contribución que la modulación CpxR-dependiente sobre la expresión del sistema GesABC tiene algún rol en la resistencia a Au, además de diferenciar esta contribución en particular de otros efectos que la carencia de otros determinantes cuya expresión está controlada por el regulador global CpxR pudieran tener sobre la resistencia a este metal.

Como se observa en la figura 6.8, en ausencia de metal, no se observa diferencias en el crecimiento de las cepas ensayadas. Por su parte, con el agregado de metal, la mutante Δ*gesABC* (CIM 125 μM de $AuHCl_4$) es más susceptible al metal que para la cepa silvestre (CIM 150 μM de $AuHCl_4$), valores similares a los reportados previamente (Pontel y col., 2007). La cepa ΔCpxR-box mostró un fenotipo intermedio, con un valor de CIM de 135 μM de Au (fig 6.8). Estos resultados sugieren que la modulación de la expresión de GesABC debida a CpxAR es importante para la resistencia a Au, probablemente a concentraciones elevadas del metal.

Las mutantes ΔcpxR y ΔgesABC ΔcpxR fueron las más afectadas, con valores de CIM de 90 μM $AuHCl_4$ (fig 6.9). El efecto producido por la carencia de CpxR es dominante y enmascara el efecto debido a GesABC. El fenotipo observado, no sólo revela la importancia de CpxAR en la resistencia a Au, probablemente como parte de un mecanismo no específico de resistencia a metales, como ya había sido reportado para Cu y Zn (Yamamoto y Ishihama, 2005), que asegura el mantenimiento de la integridad de la envoltura en estas condiciones de estrés. Sin embargo, será necesario realizar estudios complementarios para dilucidar la contribución real de CpxR en la resistencia a Au.

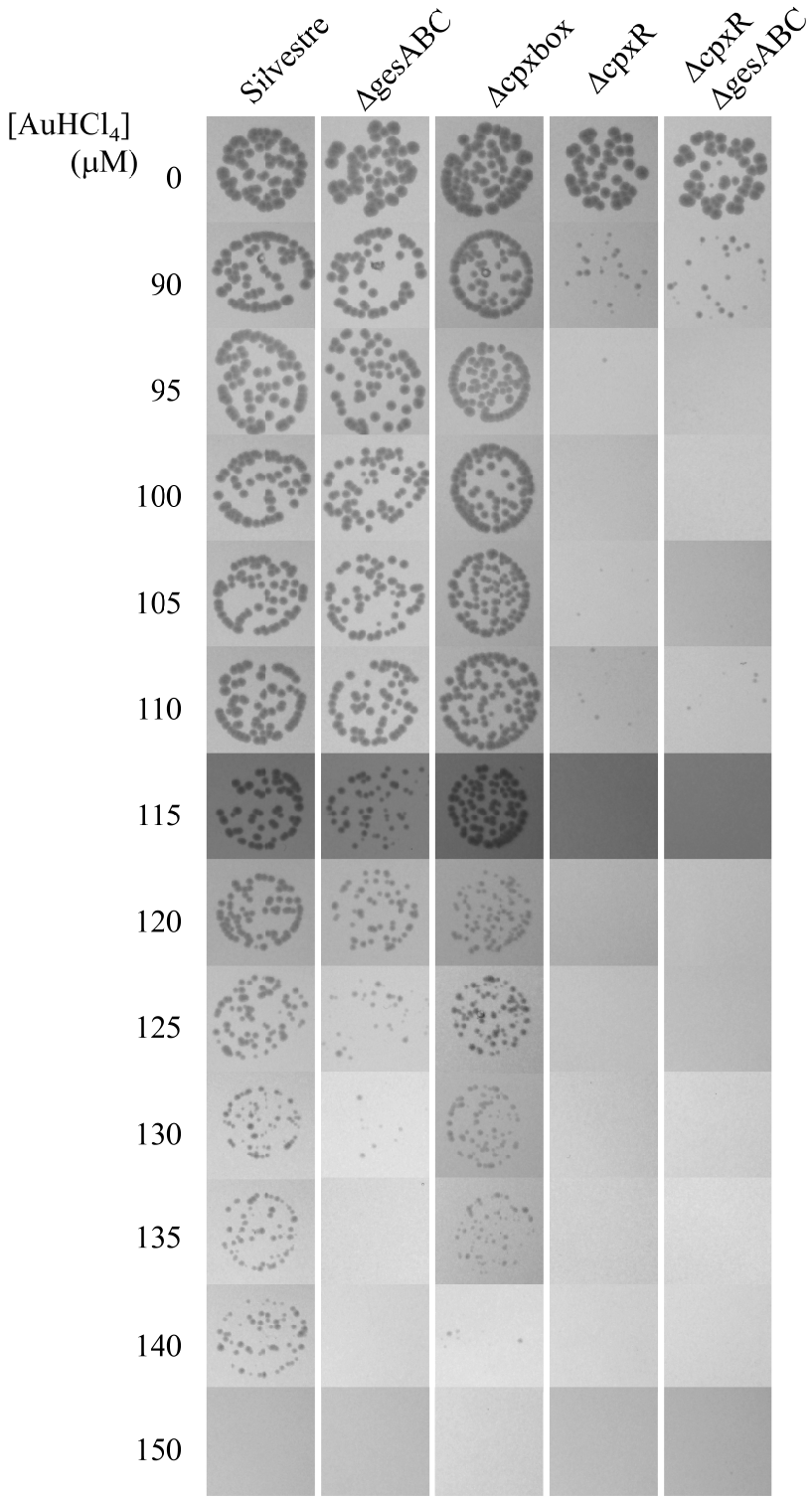



**Figura 6.8. Resistencia a Au**. Determinación de CIM en presencia de concentraciones crecientes de $AuHCl_4$ para las cepas indicadas. Se realizaron diluciones 5 x $10^{-7}$ de las cepas ensayadas que se sembraron en placas de LB-agar MES-MOPS a pH 7,0 conteniendo las concentraciones de metal indicadas. Las placas se incubaron 37 °C durante 18 horas. La foto corresponde a un experimento representativo.

Previamente en el laboratorio se observó que además de contribuir a la resistencia a Au, el sistema GesABC contribuye a la resistencia a drogas orgánicas como cristal violeta (CV) o azul de metileno (MB), aunque sólo cuando el sistema es inducido por Au a través de GolS y en un entorno genómico Δ*acr*AB, la principal bomba de eflujo de drogas en *Salmonella* (Pontel y col., 2007) o cuando el sistema de eflujo se sobreexpresa en este entorno genético (Nishino y col., 2006). Sobre la base de estas evidencias, nos preguntamos si la regulación mediada por CpxRA de GesABC puede contribuir también a la resistencia a drogas. Para ello, comparamos la resistencia a cristal violeta (CV) o azul de metileno (MB) realizando curvas de crecimiento de las cepas silvestre y de mutantes Δ*acr*AB, Δ*cpx*R, Δ*acr*AB Δ*cpx*R, Δ*acrA*B Δ*ges*ABC y Δ*acr*AB Δ*ges*ABC Δ*cpx*R; en presencia de una concentración de Au baja pero suficiente para activar la expresión de GesABC (5 μM) y en medio rico LB-MES-MOPS regulado a pH 7, condición en que el sistema CpxAR está activado. En estas condiciones, realizamos curvas de crecimiento en presencia de CV (0,0025 μg/ml) o MB (0,00625 mg/ml) o sin agregado de drogas.

Como se observa en la figura 6.9 A, en ausencia de las drogas CV o MB, no se evidencian diferencias en el crecimiento de las cepas ensayadas luego de 16 horas de incubación a 37 °C. Sin embargo, cuando se agregó al medio de crecimiento CV o MB (figura 6.9 B y C, respectivamente), la cepa Δ*acr*AB Δ*cpx*R mostró un retraso en el crecimiento respecto a la cepa silvestre, retraso que no se evidenció en las mutantes simples Δ*cpxR* o Δ*acrAB*. En las mismas condiciones, las mutantes Δ*acrAB ΔgesABC* y Δ*acrAB ΔgesABC ΔcpxR* son incapaces de crecer (fig. 6.9 B y C). Estos resultados sugieren que el sistema CpxAR podría participar en la resistencia a drogas como cristal violeta o azul de metileno, y que este efecto podría estar mediado a través de la modulación de la expresión de *gesABC*. Sin embargo, quedan por realizar experimentos complementarios para soportar esta hipotesis.

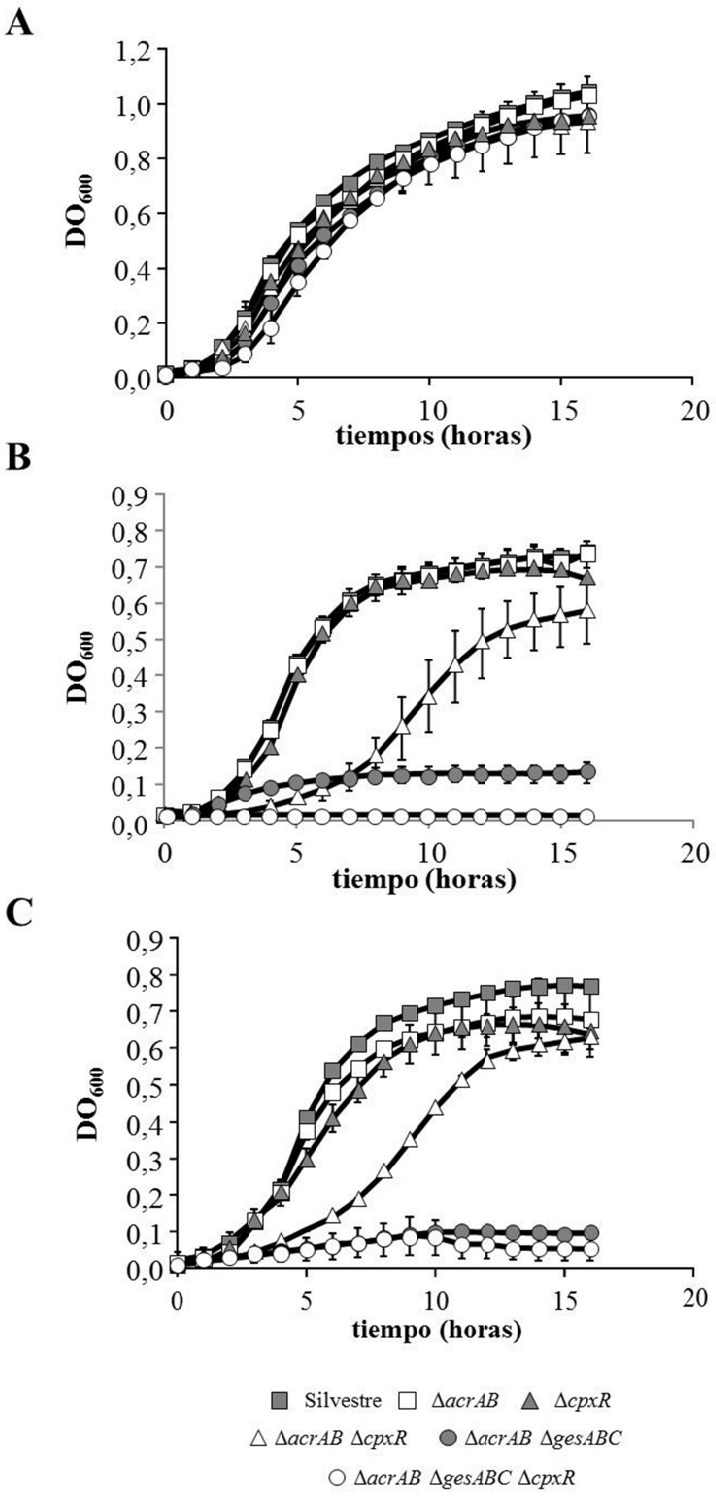



**Figura 6.9. Curvas de crecimiento en presencia de drogas orgánicas**.. Las cepas fueron crecidas medio LB-MES-MOPS, pH 7,0 y 5 μM de $AuHCl_4$; sin agregado de drogas (A) o suplementado con CV 0,0025 μg/ml (B) o MB, 0,00625 mg/ml (C), con agitación constante a 37 °C en un lector de microplacas Biotek Synergy2. Se determinó la $DO_{600}$ de los cultivos a los tiempos indicados en la figura.

### 6.2.6. GesABC exporta un compuesto capaz de disminuir la concentración efectiva de oro en el medio extracelular.

Como se comentó anteriormente, GesABC es más homologo a sistemas que detoxifican compuestos orgánicos como AcrAB-TolC que a los que detoxifican metales, como CusABC de *E. coli* (Pontel y col., 2007). Sin embargo, aún no se conoce cuál es el sustrato de la bomba de eflujo GesABC: iones de Au o algún compuesto con Au unido, o bien la bomba secreta al espacio extracelular un quelante capaz de acomplejar oro en el medio. Para comenzar a evaluar estas posibilidades, diseñamos un ensayo en el que se comparó la capacidad de los sobrenadantes de cultivo de la cepa silvestre y de la mutante Δ*ges*ABC de inducir la expresión de un gen reportero dependiente de GolS y por lo tanto de la presencia de Au en el medio. Para ello, se cultivaron las cepas en medio mínimo SM9 con cantidades crecientes de $AuHCl_4$ por 16 horas a 37°C. Luego los sobrenadantes de cultivo fueron filtrados, alicuotados y utilizados para cultivar la cepa que bioreportera que transporta el gen reportero *golB*::*lacZ* en el cromosoma (Checa y col., 2007).

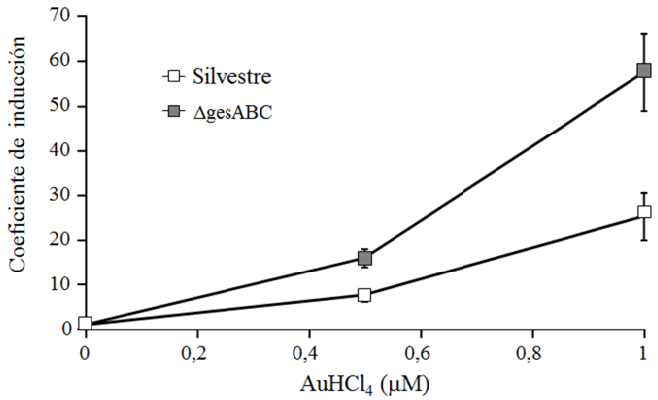



**Figura 6.10. El sobrenadante de cultivo de una cepa Δ*gesABC* posee más oro biodisponible que la cepa silvestre.** Las cepas de *Salmonella* silvestre 14028 y Δ*ges*ABC fueron crecidas en medio mínimo SM9 con cantidades crecientes de $AuHCl_4$ por 16 horas a 37°C. Luego los sobrenadantes de cultivo fueron filtrados, alicuotados y utilizados para cultivar la cepa que transporta el reportero *golB*::*lacZ*. . Coeficiente de inducción es la relación entre las actividades (en Unidades Miller) de reportero cultivado en medio proveniente de la cepa indicada cultivada en presencia de metal con respecto a la actividad del reportero cultivado en medio proveniente de la cepa cultivada en ausencia de metal. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Como se observa en la figura 6.10, el sobrenadante de la cepa mutante en el transportador GesABC cultivada en presencia de $AuHCl_4$ presenta una capacidad aproximadamente 1,5 veces mayor de inducir la expresión del reportero *golB*::*lacZ* que

el sobrenadante de la cepa silvestre crecida en las mismas condiciones. Estos resultados indican que en el sobrenadante de la mutante ΔgesABC el metal se encuentra más biodisponible que en el sobrenadante de la cepa silvestre, por lo que el transportador GesABC estaría exportando un compuesto capaz de acomplejar Au en el medio o bien un compuesto de Au que no libere fácilmente el metal al medio.

### 6.3. Conclusiones Capítulo III

En este capítulo y como parte de la caracterización de los componentes del regulón *gol*, se analizó si la expresión del sistema de eflujo GesABC podría estar regulada por otros factores además de GolS, con el fin de comprender mejor su función. Mediante un análisis bioinformático logramos identificar un sitio putativo para la unión del regulador de respuesta CpxR, componente del sistema de dos componentes CpxAR involucrado en la respuesta al estrés de envoltura.

Demostramos que CpxR activa la expresión de *gesABC* cuando las bacterias se cultivan a pH 7,0 y en presencia de Au. Sin embargo, se necesita de la presencia del regulador maestro del sistema, GolS, para que haya expresión del sistema de eflujo GesABC, indicando que CpxR estaría modulando la expresión en determinadas condiciones pero no es esencial.

Además, determinamos que el efecto modulador ejercido por CpxR es directo sobre la expresión de *gesABC*, e indirectamente a través de la expresión del regulador GolS, e identificamos el sitio de unión en el promotor. Este sitio coincide con el sitio predicho mediante análisis bioinformático. Por otra parte, también demostramos que este sitio es requerido *in vivo* para modular la expresión del sistema en condiciones de activación del sistema CpxAR.

Por otro lado, analizamos el papel de CpxR y en particular de modulación CpxR-dependiente en la resistencia a Au. Los resultados obtenidos indican que CpxR desempeña un rol importante aunque aún no caracterizado en la resistencia a Au, probablemente debido al papel general del sistema en la respuesta a estrés periplasmático. Se determinó además que el sitio de unión a CpxR en la región promotora de *gesABC* es necesario para alcanzar los niveles de resistencia observados en la cepa silvestre sugiriendo que la modulación de la expresión mediada por CpxR es

importante para aumentar los niveles de GesABC sobre todo a altas concentraciones del metal.

Además, CpxR podría contribuir también a la resistencia a drogas orgánicas como cristal violeta o azul de metileno mediante la modulación de la expresión del sistema GesABC ya que una mutante en el regulador presenta un retraso en el crecimiento respecto a la cepa silvestre mientras que en las mismas condiciones, las mutantes en *ΔgesABC* y *ΔgesABC ΔcpxR* son incapaces de crecer.

Finalmente, observamos mediante ensayos con medios condicionados que el sistema GesABC podría estar podría estar transportando al espacio extracelular un compuesto capaz de disminuir la concentración de oro en el medio, ya que en el sobrenadante de la mutante ΔgesABC el metal se encuentra más biodisponible.

# 7. Conclusiones Generales

En este trabajo de Tesis y como parte de la caracterización de los componentes de sistema *gol* de S. Typhimurium involucrado en la resistencia a Au, utilizamos el componente sensor/regulador del sistema, GolS, y una construcción reportera previamente desarrollada para diseñar y construir bacterias biosensoras de metales pesados, con aplicación potencial en monitoreo ambiental o minería. Además, avanzamos en la caracterización de la región promotora del operón *gesABC*, controlado por GolS, revelando nuevos mecanismos regulatorios que gobiernan la expresión de esta bomba de eflujo y que son relevantes para la funcionalidad.

En primer lugar validamos el uso del sistema *gol* para la construcción de biosensores bacterianos específicos para la detección de metales. Mediante la utilización de una construcción reportera que expresa el gen reportero *gfp*, bajo el control del promotor *golB*, regulado por GolS y la transferencia del sistema bioreportero a una cepa no patógena de *E. coli*, logramos desarrollar el primer biosensor bacteriano específico para la detección de Au en muestras acuosas. Este dispositivo es capaz de reconocer este metal como ion, (como $Au^{+1}$ u $Au^{+3}$, los estados de oxidación más comunes para este metal), tanto cuando el ion forma parte de sales inorgánicas como de complejos orgánicos. Las pruebas realizadas con muestras suplementadas con metales en el laboratorio indicaron que el biosensor de Au no detecta otros metales de transición, como el Zn o el Hg y muestra niveles mínimos de respuesta en presencia de iones de Cu o Ag, metales con los que el oro comparte varias características fisicoquímicas y con los que se encuentra comúnmente asociados en la naturaleza.

Luego de ensayar varias construcciones para incorporar el sistema bioreportero a una cepa no patógena *E. coli*, que carece naturalmente del regulón *gol*, observamos que se requiere de la expresión del sensor/regulador GolS junto con los transportadores GolT y GolB a partir de una única copia en el cromosoma para mejorar la selectividad del sistema de detección. Además, se optimizaron las condiciones de cultivo de las bacterias biosensoras, así como el tiempo de incubación requerido con el metal para maximizar la señal.

Los biosensores bacterianos para la detección de Au desarrollados se calibraron en condiciones de laboratorio a fin de determinar la sensibilidad y rango de detección de Au en las determinaciones. El biosensor EC-GolTSB fue capaz de detectar Au en un rango efectivo de concentraciones muy amplio, entre 3,91 – 350,6 ppb lo que, *a priori*,

lo hace apropiado para su uso para la detección del metal en muestras del ambiente, donde la abundancia del Au varía desde 4 ppb en la corteza terrestre hasta más de 4000 ppb en yacimientos económicamente rentables. Este biodetector es capaz de emitir una señal detectable hasta concentraciones de 80 μM (15757 ppb), concentraciones a las cuales el metal comienza a ser tóxico para los microorganismos biosensores, siendo de utilidad en un rango aún más amplio de concentraciones cuando se utiliza en ensayos cuantitativos, como ensayos de difusión en placa, permitiendo determinar de manera rápida y directa la presencia o no del metal biodisponible en una muestra.

Utilizando la misma plataforma de biodetección desarrollada y variantes no selectivas de GolS como módulo sensor, desarrollamos nuevos microorganismos biosensores para la detección de un amplio espectro de metales de transición, que incluyen metales altamente tóxicos como Hg, Pb y Cd. La calibración de estos dispositivos en condiciones de laboratorio reveló límites y rangos de detección adecuados para la detección de estos metales en muestras de aguas para determinar contaminación. El bioreportero EC-GoS$_{S77C}$ detecta Hg en el rango 4,37 nM-147,7 nM (0,88 – 29,63 ppb); Pb en el rango 39,68 - 290 nM (8,22 – 60,11 ppb); Cd, en un rango 248,65- 2580 nM (27,95 – 290 ppb) y Au en el rango 34,29 -1478 nM (6,75 – 291,96 ppb). Ensayos preliminares utilizando aguas aditivadas con metales, permitieron verificar el correcto funcionamiento de estos dispositivos para detectar los metales cuando estos se encuentran solos o formando parte de mezclas. Justamente por ser no selectivos y altamente sensibles, estas herramientas biotecnológicas son particularmente útiles para reportar contaminación debida a cualquiera de estos metales pesados de manera rápida y simple y utilizando ensayos de tipo cuantitativo o cualitativo. Estos resultaron sirvieron además como prueba de concepto para la utilización de estos dispositivos para la evaluación de muestras de agua del ambiente o aguas para consumo.

Finalmente, en esta Tesis se investigaron otros mecanismos que pudieran estar implicados en la regulación de la expresión del sistema GesABC de *Salmonella*, un componente del regulón *gol* que participa activamente en la resistencia a oro, pero que también puede contribuir a detoxificación compuestos orgánicos. Mediante un análisis bioinformático inicial para identificar sitios putativos de unión de reguladores involucrados en la respuesta general a estrés periplasmático, identificamos un sitio probable de unión del CpxR, regulador de respuesta del sistema de dos componentes CpxAR. Verificamos la regulación efectiva mediante el uso de mutantes y un reportero

*gesABC::lacZ* y la interacción con el sitio predicho mediante estudios de interacción *in vitro*.

Demostramos que CpxR activa la expresión de *gesABC* en presencia de Au, pero a diferencia del regulador local GolS, no es esencial para que se inicie la transcripción desde el promotor de *gesABC*. En presencia del metal, la inducción dependiente de CpxR resulta en un incremento de al menos dos veces en la expresión del reportero por sobre los niveles de activación alcanzados cuando el sistema CpxRA está inactivo o ausente, o cuando el regulador no puede unirse. Por el contrario, la expresión de *gesABC* en respuesta a Au es absolutamente dependiente de GolS, por lo que la activación mediada por CpxR tendría un rol auxiliar para contrarrestar el estrés metálico a nivel del periplasma.

Verificamos que CpxR se une a un sitio único de unión en la región promotora de *gesABC* que se superpone parcialmente con el sitio de unión de GolS, y que coincide con el sitio predicho en el análisis bioinformático. Además demostramos que este sitio se necesita *in vivo* para modular la transcripción de *gesABC*.

Finalmente, analizamos el papel de CpxR y en particular de la contribución de la activación CpxR-dependiente del sistema de eflujo GesABC, sobre la resistencia a Au y la detoxificación de compuestos orgánicos. Aunque los resultados obtenidos son aun preliminares, los datos obtenidos sugieren que el incremento en los niveles de la bomba de eflujo GesABC, en condiciones de activación del sistema CpxAR, son esenciales para incrementar los niveles de resistencia al metal, pero también para contribuir a la detoxificación de otros compuestos tóxicos. Estos estudios revelaron además la importancia de CpxAR en la defensa contra el estrés metálico generado por el metal toxico Au, actuando probablemente como un mecanismo no específico.

Por otro lado, continuando con la caracterización del sistema GesABC en la resistencia a Au, determinamos que el sistema estaría exportando un compuesto capaz de disminuir la concentración efectiva de oro en el medio extracelular.

# 8. Referencias bibliográficas

Achard, M. E. S., Tree, J. J., Holden, J. A., Simpfendorfer, K. R., Wijburg, O. L. C., Strugnell, R. A., Schembri, M. A., Sweet, M. J., Jennings, M. P. y McEwan, A. G. **2010**. The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is required for systemic virulence. Infect Immun. 78(5): 2312-2319.

Aiyar, A., Xiang, Y. y Leis, J. **1996**. Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. Methods Mol Biol. 57: 177-191.

Alekshun, M. N. y Levy, S. B. **2004**. Targeting virulence to prevent infection: to kill or not to kill? Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies. 1(4): 483-489.

Alon, U. **2007**. An Introduction to Systems Biology: Design Principles of Biological Circuits. London, Chapman & Hall/CRC

Ansari, A. Z., Chael, M. L. y O'Halloran, T. V. **1992**. Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR. Nature. 355(6355): 87-89.

Argüello, J. M. **2003**. Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases. J Membr Biol. 195(2): 93-108.

Argüello, J. M., Eren, E. y González-Guerrero, M. **2007**. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. Biometals. 20(3-4): 233-248.

Bachmann, B. J. **1972**. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. Bacteriol Rev. 36(4): 525-557.

Bagai, I., Rensing, C., Blackburn, N. J. y McEvoy, M. M. **2008**. Direct metal transfer between periplasmic proteins identifies a bacterial copper chaperone. Biochemistry. 47(44): 11408-11414.

Bailey, T. L. y Gribskov, M. **1998**. Methods and statistics for combining motif match scores. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology. 5(2): 211-221.

Bailey, T. L., Williams, N., Misleh, C. y Li, W. W. **2006**. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. Nucleic Acids Res. 34(Web Server issue): W369-373.

Barkay, T., Miller, S. M. y Summers, A. O. **2003**. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol Rev. 27(2-3): 355-384.

Barnes, H. L. y Seward, T. M. **1997**. Geothermal Systems and Mercury Deposits. En H. L. Barnes (Eds.), *Geochemsitry of Hydrothermal Ore Deposits*. New York, Wiley. 699-736.

Bartolomé, B., Jubete, Y., Martínez, E. y de la Cruz, F. **1991**. Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. Gene. 102(1): 75-78.

Barton, L. L., Goulhen, F., Bruschi, M., Woodards, N. A., Plunkett, R. M. y Rietmeijer, F. J. **2007**. The bacterial metallome: composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium Desulfovibrio desulfuricans. Biometals. 20(3-4): 291-302.

Batchelor, E., Walthers, D., Kenney, L. J. y Goulian, M. **2005**. The *Escherichia coli* CpxA-CpxR envelope stress response system regulates expression of the porins ompF and ompC. J Bacteriol. 187(16): 5723-5731.

Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. y Ghigo, J. M. **2004**. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. Mol Microbiol. 51(3): 659-674.

Bell, R. A. y Kramer, J. R. **1999**. Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: Critical review. Environmental Toxicology and Chemistry. 18(1): 9-22.

Binet, M. R. y Poole, R. K. **2000**. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions regulate expression of the metal-transporting P-type ATPase ZntA in *Escherichia coli*. FEBS letters. 473(1): 67-70.

Blair, J. M. y Piddock, L. J. **2009**. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. Curr Opin Microbiol. 12(5): 512-519.

Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., Kirkham, M. B. y Scheckel, K. **2013**. Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils - To mobilize or to immobilize? J Hazard Mater. 266C: 141-166.

Borremans, B., Hobman, J. L., Provoost, A., Brown, N. L. y van Der Lelie, D. **2001**. Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. J Bacteriol. 183(19): 5651-5658.

Boutron, C. F. y Patterson, C. C. **1983**. The occurrence of lead in Antarctic recent snow, firn deposited over the last two centuries and prehistoric ice. Geochimica et Cosmochimica Acta. 47(8): 1355-1368.

Brandt, K. K., Holm, P. E. y Nybroe, O. **2008**. Evidence for bioavailable copper-dissolved organic matter complexes and transiently increased copper bioavailability in manure-amended soils as determined by bioluminescent bacterial biosensors. Environmental science & technology. 42(8): 3102-3108.

Brocklehurst, K. R., Hobman, J. L., Lawley, B., Blank, L., Marshall, S. J., Brown, N. L. y Morby, A. P. **1999**. ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 31(3): 893-902.

Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P. y Hobman, J. L. **2003**. The MerR family of transcriptional regulators. FEMS Microbiol Rev. 27(2-3): 145-163.

Bruins, M. R., Kapil, S. y Oehme, F. W. **2000**. Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicology and environmental safety. 45(3): 198-207.

Buchinger, S., Grill, P., Morosow, V., Ben-Yoav, H., Shacham-Diamand, Y., Biran, A., Pedahzur, R., Belkin, S. y Reifferscheid, G. **2010**. Evaluation of chrono-amperometric signal detection for the analysis of genotoxicity by a whole cell biosensor. Analytica chimica acta. 659(1-2): 122-128.

Buelow, D. R. y Raivio, T. L. **2010**. Three (and more) component regulatory systems - auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. Mol Microbiol. 75(3): 547-566.

Bullas, L. R. y Ryu, J. I. **1983**. *Salmonella* typhimurium LT2 strains which are r- m+ for all three chromosomally located systems of DNA restriction and modification. J Bacteriol. 156(1): 471-474.

Bury-Mone, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Jacq, A. y Bouloc, P. **2009**. Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. PLoS genetics. 5(9): e1000651.

Butt, C. R. M. y Hough, R. M. **2009**. Why Gold is Valuable. Elements. 5(5): 277-280.

Cai, J. y DuBow, M. S. **1996**. Expression of the *Escherichia coli* chromosomal ars operon. Canadian journal of microbiology. 42(7): 662-671.

Cao, J., Woodhall, M. R., Alvarez, J., Cartron, M. L. y Andrews, S. C. **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): 857-875.

Carotti, S., Marcon, G., Marussich, M., Mazzei, T., Messori, L., Mini, E. y Orioli, P. **2000**. Cytotoxicity and DNA binding properties of a chloro glycylhistidinate gold(III) complex (GHAu). Chemico-biological interactions. 125(1): 29-38.

Casadaban, M. J. y Cohen, S. N. **1980**. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. J Mol Biol. 138(2): 179-207.

Cerminati, S. **2009**. Diseño y construcción de un biosensor bacteriano específico para oro Tesina de grado. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Collins, Y. E. y Stotzky, G. **1992**. Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacteria, yeasts, and clay minerals. Appl Environ Microbiol. 58(5): 1592-1600.

Condee, C. W. y Summers, A. O. **1992**. A *mer-lux* transcriptional fusion for real-time examination of in vivo gene expression kinetics and promoter response to altered superhelicity. J Bacteriol. 174(24): 8094-8101.

Corbisier, P., Ji, G., Nuyts, G., Mergeay, M. y Silver, S. **1993**. *luxAB* gene fusions with the arsenic and cadmium resistance operons of Staphylococcus aureus plasmid pI258. FEMS Microbiol Lett. 110(2): 231-238.

Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. y Tsien, R. Y. **1995**. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. Trends Biochem Sci. 20(11): 448-455.

Changela, A., Chen, K., Xue, Y., Holschen, J., Outten, C. E., O'Halloran, T. V. y Mondragón, A. **2003**. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. Science. 301(5638): 1383-1387.

Charrier, T., Durand, M.-J., Jouanneau, S., Dion, M., Pernetti, M., Poncelet, D. y Thouand, G. **2011**. A multi-channel bioluminescent bacterial biosensor for the on-line detection of metals and toxicity. Part I: design and optimization of bioluminescent bacterial strains. Anal Bioanal Chem. 400(4): 1051-1060.

Checa, S. K., Espariz, M., Audero, M. E. P., Botta, P. E., Spinelli, S. V. y Soncini, F. C. **2007**. Bacterial sensing of and resistance to gold salts. Mol Microbiol. 63(5): 1307-1318.

Checa, S. K. y Soncini, F. C. **2011**. Bacterial gold sensing and resistance. Biometals. 24(3): 419-427.

Checa, S. K., Zurbriggen, M. D. y Soncini, F. C. **2012**. Bacterial signaling systems as platforms for rational design of new generations of biosensors. Curr Opin Biotechnol. 23(5): 766-772.

Chen, K., Yuldasheva, S., Penner-Hahn, J. E. y O'Halloran, T. V. **2003**. An atypical linear Cu(I)-S2 center constitutes the high-affinity metal-sensing site in the CueR metalloregulatory protein. J Am Chem Soc. 125(40): 12088-12089.

Chen, P., Greenberg, B., Taghavi, S., Romano, C., van der Lelie, D. y He, C. **2005**. An Exceptionally Selective Lead(II)-Regulatory Protein from *Ralstonia metallidurans*: Development of a Fluorescent Lead(II) Probe. Angewandte Chemie International Edition. 44(18): 2715-2719.

Chen, P. y He, C. **2003**. A General Strategy to Convert the MerR Family Proteins into Highly Sensitive and Selective Fluorescent Biosensors for Metal Ions. Journal of the American Chemical Society. 126(3): 728-729.

Chen, P. R. y He, C. **2008**. Selective recognition of metal ions by metalloregulatory proteins. Current opinion in chemical biology. 12(2): 214-221.

Cherepanov, P. P. y Wackernagel, W. **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.

Chiang, S. M. y Schellhorn, H. E. **2012**. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. Archives of biochemistry and biophysics. 525(2): 161-169.

Chillappagari, S., Seubert, A., Trip, H., Kuipers, O. P., Marahiel, M. A. y Miethke, M. **2010**. Copper stress affects iron homeostasis by destabilizing iron-sulfur cluster formation in Bacillus subtilis. J Bacteriol. 192(10): 2512-2524.

Danese, P. N. y Silhavy, T. J. **1997**. The sigma(E) and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. Genes Dev. 11(9): 1183-1193.

Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. y Silhavy, T. J. **1995**. The Cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. Genes Dev. 9(4): 387-398.

Dartigalongue, C., Missiakas, D. y Raina, S. **2001**. Characterization of the *Escherichia coli* sigma E regulon. J Biol Chem. 276(24): 20866-20875.

Dartigalongue, C. y Raina, S. **1998**. A new heat-shock gene, *ppiD*, encodes a peptidyl-prolyl isomerase required for folding of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. The EMBO journal. 17(14): 3968-3980.

Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. **2000**. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(12): 6640-6645.

Daunert, S., Barrett, G., Feliciano, J. S., Shetty, R. S., Shrestha, S. y Smith-Spencer, W. **2000**. Genetically Engineered Whole-Cell Sensing Systems: Coupling Biological Recognition with Reporter Genes. Chemical Reviews. 100(7): 2705-2738.

De Wulf, P., Kwon, O. y Lin, E. C. **1999**. The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. J Bacteriol. 181(21): 6772-6778.

De Wulf, P., McGuire, A. M., Liu, X. y Lin, E. C. C. **2002**. Genome-wide Profiling of Promoter Recognition by the Two-component Response Regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry. 277(29): 26652-26661.

DiGiuseppe, P. A. y Silhavy, T. J. **2003**. Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. J Bacteriol. 185(8): 2432-2440.

Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R. y DuBow, M. S. **1995**. An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. J Bacteriol. 177(8): 2050-2056.

Dorel, C., Lejeune, P. y Rodrigue, A. **2006**. The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? Research in microbiology. 157(4): 306-314.

Durham, K. A., Porta, D., Twiss, M. R., McKay, R. M. y Bullerjahn, G. S. **2002**. Construction and initial characterization of a luminescent *Synechococcus* sp. PCC 7942 Fe-dependent bioreporter. FEMS Microbiol Lett. 209(2): 215-221.

Eisler, R. **2000**. Silver. En (Eds.), *Handbook of chemical risk assesment. Health hazards to humans, plants and animals*. Boca Raton, Lewis Publishers. 499-550.

Erbe, J. L., Adams, A. C., Taylor, K. B. y Hall, L. M. **1996**. Cyanobacteria carrying an *smt-lux* transcriptional fusion as biosensors for the detection of heavy metal cations. Journal of industrial microbiology. 17(2): 80-83.

Espariz, M., Checa, S. K., Audero, M. E. P., Pontel, L. B. y Soncini, F. C. **2007**. Dissecting the *Salmonella* response to copper. Microbiology. 153(Pt 9): 2989-2997.

Fàbrega, A. y Vila, J. **2013**. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin Microbiol Rev. 26(2): 308-341.

Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. y Heffron, F. **1986**. Mutants of *Salmonella* typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci U S A. 83(14): 5189-5193.

Fitzgerald, W. F., Engstrom, D. R., Mason, R. P. y Nater, E. A. **1998**. The Case for Atmospheric Mercury Contamination in Remote Areas. Environmental science & technology. 32(1): 1-7.

Fleischer, R., Heermann, R., Jung, K. y Hunke, S. **2007**. Purification, Reconstitution, and Characterization of the CpxRAP Envelope Stress System of *Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry. 282(12): 8583-8593.

Franke, S., Grass, G., Rensing, C. y Nies, D. H. **2003**. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. J Bacteriol. 185(13): 3804-3812.

Fraústo da Silva, J. J. R. y Williams, R. J. P. **1991**. The biological chemistry of the elements : the inorganic chemistry of life. Oxford, Clarendon Press.

Galas, D. J. y Schmitz, A. **1978**. DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. Nucleic Acids Res. 5(9): 3157-3170.

Galperin, M. Y. **2006**. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. J Bacteriol. 188(12): 4169-4182.

Giedroc, D. P. y Arunkumar, A. I. **2007**. Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches. Dalton Trans.(29): 3107-3120.

Gill, S. C. y von Hippel, P. H. **1989**. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal Biochem. 182(2): 319-326.

Goldschmidt, V. M. **1954**. Geochemistry. Oxford, Clarendon Press.

Gong, H., Rose, A. W. y Suhr, N. H. **1977**. The geochemistry of cadmium in some sedimentary rocks. Geochimica et Cosmochimica Acta. 41(12): 1687-1692.

González-Flecha, B. y Demple, B. **2000**. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. Ann N Y Acad Sci. 899: 69-87.

Grass, G., Grosse, C. y Nies, D. H. **2000**. Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant from *Ralstonia* sp. strain CH34. J Bacteriol. 182(5): 1390-1398.

Grass, G. y Rensing, C. **2001**. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. Biochem Biophys Res Commun. 286(5): 902-908.

Groisman, E. A. y Saier , M., , Jr. **1990**. *Salmonella* virulence: new clues to intramacrophage survival. Trends Biochem Sci. 15(1): 30-33.

Grosse, C., Anton, A., Hoffmann, T., Franke, S., Schleuder, G. y Nies, D. H. **2004**. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system Czc via promoter czcNp in *Ralstonia metallidurans*. Archives of microbiology. 182(2-3): 109-118.

Gu, M., Mitchell, R. y Kim, B. **2004**. Whole-Cell-Based Biosensors for Environmental Biomonitoring and Application. En J.-J. Zhong (Eds.), *Biomanufacturing*. Springer Berlin Heidelberg. 269-305.

Gupta, A., Matsui, K., Lo, J. F. y Silver, S. **1999**. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. Nat Med. 5(2): 183-188.

Gupta, S. D., Lee, B. T., Camakaris, J. y Wu, H. C. **1995**. Identification of *cutC* and *cutF* (*nlpE*) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 177(15): 4207-4215.

Guzzo, A. y DuBow, M. S. **1991**. Construction of stable, single-copy luciferase gene fusions in *Escherichia coli*. Archives of microbiology. 156(6): 444-448.

Guzzo, A. y DuBow, M. S. **1994**. A luxAB transcriptional fusion to the cryptic *celF* gene of *Escherichia coli* displays increased luminescence in the presence of nickel. Molecular & general genetics : MGG. 242(4): 455-460.

Guzzo, J., Guzzo, A. y DuBow, M. S. **1992**. Characterization of the effects of aluminum on luciferase biosensors for the detection of ecotoxicity. Toxicology letters. 64-65 Spec No: 687-693.

Hakkila, K., Green, T., Leskinen, P., Ivask, A., Marks, R. y Virta, M. **2004**. Detection of bioavailable heavy metals in EILATox-Oregon samples using whole-cell luminescent bacterial sensors in suspension or immobilized onto fibre-optic tips. Journal of applied toxicology : JAT. 24(5): 333-342.

Hakkila, K., Maksimow, M., Karp, M. y Virta, M. **2002**. Reporter genes l*ucFF, luxCDABE, gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. Anal Biochem. 301(2): 235-242.

Hansen, L. H. y Sorensen, S. J. **2000**. Versatile biosensor vectors for detection and quantification of mercury. FEMS Microbiol Lett. 193(1): 123-127.

Harms, H. **2007**. Biosensing of Heavy Metals. En D. H. Nies y S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Heilderberg, Springer. 143-156.

Hartman, P. E. y Kuo, D. C. **1987**. Cd2+ tolerance in *Escherichia coli* and *Salmonella* typhimurium. Environmental and molecular mutagenesis. 10(1): 89-95.

Heldwein, E. E. y Brennan, R. G. **2001**. Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. Nature. 409(6818): 378-382.

Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T. y Yamaguchi, A. **2005**. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 55(4): 1113-1126.

Hirano, Y., Hossain, M. M., Takeda, K., Tokuda, H. y Miki, K. **2007**. Structural studies of the Cpx pathway activator NlpE on the outer membrane of *Escherichia coli*. Structure. 15(8): 963-976.

Hobman, J. L., Wilkie, J. y Brown, N. L. **2005**. A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators. Biometals. 18(4): 429-436.

Hobman, J. L., Yamamoto, K. y Oshima, T. **2007**. Transcriptomic responses of bacterial cells to sublethal metal ion stress. En D. H. Nies y S. Silver (Eds.), *Molecular microbiology of heavy metals*. Heidelberg, Springer. 73-115.

Huckle, J. W., Morby, A. P., Turner, J. S. y Robinson, N. J. **1993**. Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. Mol Microbiol. 7(2): 177-187.

Hughes, M. N. y Poole, R. K. **1989**. Metals and microorganisms. London, Chapman and Hall.

Humbert, M. V., Rasia, R. M., Checa, S. K. y Soncini, F. C. **2013**. Protein signatures that promote operator selectivity among paralog MerR monovalent metal ion regulators. J Biol Chem. 288(28): 20510-20519.

Ibáñez, M. M. **2012**. Análisis de reguladores de metales de transición en *Salmonella enterica* Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

Ibáñez, M. M., Cerminati, S., Checa, S. K. y Soncini, F. C. **2013**. Dissecting the metal selectivity of MerR monovalent metal ion sensors in *Salmonella*. J Bacteriol. 195(13): 3084-3092.

Isaac, D. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J. y Silhavy, T. J. **2005**. The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(49): 17775-17779.

Ivask, A., Rolova, T. y Kahru, A. **2009**. A suite of recombinant luminescent bacterial strains for the quantification of bioavailable heavy metals and toxicity testing. BMC biotechnology. 9: 41.

Jian, X., Wasinger, E. C., Lockard, J. V., Chen, L. X. y He, C. **2009**. Highly sensitive and selective gold(I) recognition by a metalloregulator in *Ralstonia metallidurans*. J Am Chem Soc. 131(31): 10869-10871.

Jubelin, G., Vianney, A., Beloin, C., Ghigo, J.-M., Lazzaroni, J.-C., Lejeune, P. y Dorel, C. **2005**. CpxR/OmpR Interplay Regulates Curli Gene Expression in Response to Osmolarity in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 187(6): 2038-2049.

Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobe, T. y Sasakawa, C. **2000**. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol. 38(4): 805-816.

Karlin, K. D. **1993**. Metalloenzymes, structural motifs, and inorganic models. Science. 261(5122): 701-708.

Khalil, A. S. y Collins, J. J. **2010**. Synthetic biology: applications come of age. Nature reviews. Genetics. 11(5): 367-379.

Kiaune, L. y Singhasemanon, N. **2011**. Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity. Reviews of environmental contamination and toxicology. 213: 1-26.

Kidd, S. P., Djoko, K. Y., Ng, J., Argente, M. P., Jennings, M. P. y McEwan, A. G. **2011**. A novel nickel responsive MerR-like regulator, NimR, from Haemophilus influenzae. Metallomics : integrated biometal science. 3(10): 1009-1018.

Kim, J. S., Kim, M. H., Joe, M. H., Song, S. S., Lee, I. S. y Choi, S.-Y. **2002**. The *sctR* of *Salmonella enterica* serova Typhimurium encoding a homologue of MerR protein is involved in the copper-responsive regulation of *cuiD*. FEMS Microbiol Lett. 210(1): 99-103.

King, J. M., Digrazia, P. M., Applegate, B., Burlage, R., Sanseverino, J., Dunbar, P., Larimer, F. y Sayler, G. S. **1990**. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. Science. 249(4970): 778-781.

Kohlmeier, S., Mancuso, M., Tecon, R., Harms, H., van der Meer, J. R. y Wells, M. **2007**. Bioreporters: gfp versus lux revisited and single-cell response. Biosens Bioelectron. 22(8): 1578-1585.

Lampinen, J., Virta, M. y Karp, M. **1995**. Use of controlled luciferase expression to monitor chemicals affecting protein synthesis. Appl Environ Microbiol. 61(8): 2981-2989.

Lane, D., Prentki, P. y Chandler, M. **1992**. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. Microbiological reviews. 56(4): 509-528.

Laub, M. T. y Goulian, M. **2007**. Specificity in two-component signal transduction pathways. Annual review of genetics. 41: 121-145.

Lee, L. J., Barrett, J. A. y Poole, R. K. **2005**. Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. J Bacteriol. 187(3): 1124-1134.

Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C. y Nies, D. H. **2003**. Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. J Bacteriol. 185(15): 4354-4361.

Leopold, K., Foulkes, M. y Worsfold, P. **2010**. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters--a review. Analytica chimica acta. 663(2): 127-138.

Liao, V. H. y Ou, K. L. **2005**. Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. Environmental toxicology and chemistry / SETAC. 24(7): 1624-1631.

Lim, S. Y., Joe, M. H., Song, S. S., Lee, M. H., Foster, J. W., Park, Y. K., Choi, S. Y. y Lee, I. S. **2002**. CuiD is a crucial gene for survival at high copper environment in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Molecules and cells. 14(2): 177-184.

Lima, B. P., Antelmann, H., Gronau, K., Chi, B. K., Becher, D., Brinsmade, S. R. y Wolfe, A. J. **2011**. Involvement of protein acetylation in glucose-induced transcription of a stress-responsive promoter. Mol Microbiol. 81(5): 1190-1204.

Loftin, I. R., Franke, S., Roberts, S. A., Weichsel, A., Heroux, A., Montfort, W. R., Rensing, C. y McEvoy, M. M. **2005**. A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. Biochemistry. 44(31): 10533-10540.

Long, G. L. y Winefordner, J. D. **1983**. Limit of detection. A closer look at the IUPAC definition. Analytical Chemistry. 55(7): 712A-724A.

Ma, Z., Jacobsen, F. E. y Giedroc, D. P. **2009**. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. Chem Rev. 109(10): 4644-4681.

Macomber, L. y Imlay, J. A. **2009**. The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(20): 8344-8349.

Magnani, D. y Solioz, M. **2007**. How Bacteria Handle Copper. En D. H. Nies y S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metalas*. Heidelberg, Springer. 259-285.

Marchisio, M. A. y Rudolf, F. **2011**. Synthetic biosensing systems. The international journal of biochemistry & cell biology. 43(3): 310-319.

Martin, R. G., Gillette, W. K. y Rosner, J. L. **2000**. Promoter discrimination by the related transcriptional activators MarA and SoxS: differential regulation by differential binding. Mol Microbiol. 35(3): 623-634.

McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F., Hou, S., Layman, D., Leonard, S., Nguyen, C., Scott, K., Holmes, A., Grewal, N., Mulvaney, E., Ryan, E., Sun, H., Florea, L., Miller, W., Stoneking, T., Nhan, M., Waterston, R. y Wilson, R. K. **2001**. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature. 413(6858): 852-856.

Meighen, E. A. y Dunlap, P. V. **1993**. Physiological, biochemical and genetic control of bacterial bioluminescence. Advances in microbial physiology. 34: 1-67.

Melamed, S., Elad, T. y Belkin, S. **2012**. Microbial sensor cell arrays. Curr Opin Biotechnol. 23(1): 2-8.

Mergeay, M., Monchy, S., Vallaeys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D. y Wattiez, R. **2003**. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiol Rev. 27(2-3): 385-410.

Miller, J. H. **1972**. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor; NY, Cold Spring Harbor Laboratory.

Miller, P. F., Gambino, L. F., Sulavik, M. C. y Gracheck, S. J. **1994**. Genetic relationship between soxRS and mar loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 38(8): 1773-1779.

Miller, W. G., Leveau, J. H. y Lindow, S. E. **2000**. Improved *gfp* and *inaZ* broad-host-range promoter-probe vectors. Mol Plant Microbe Interact. 13(11): 1243-1250.

Mookherjee, A. **1962**. Certain aspects of the geochemistry of cadmium. Geochimica et Cosmochimica Acta. 26(2): 351-360.

Morel, F. M. M., Kraepiel, A. M. L. y Amyot, M. **1998**. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Annual Review of Ecology and Systematics. 29(1): 543-566.

Morin, J. G. y Hastings, J. W. **1971**. Energy transfer in a bioluminescent system. Journal of cellular physiology. 77(3): 313-318.

Munson, G. P., Lam, D. L., Outten, F. W. y O'Halloran, T. V. **2000**. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol. 182(20): 5864-5871.

Naylor, L. H. **1999**. Reporter gene technology: the future looks bright. Biochemical pharmacology. 58(5): 749-757.

Newberry, K. J. y Brennan, R. G. **2004**. The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. J Biol Chem. 279(19): 20356-20362.

Nies, D. **2007**. Bacterial transition metal homeostasis. En D. Nies y S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Heidelberg, Springer-Verlag. 117-219.

Nies, D. H. **1999**. Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol. 51(6): 730-750.

Nies, D. H. **2003**. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev. 27(2-3): 313-339.

Nies, D. H. **2004**. Incidence and function of sigma factors in *Ralstonia metallidurans* and other bacteria. Archives of microbiology. 181(4): 255-268.

Nikaido, H. y Takatsuka, Y. **2009**. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. Biochim Biophys Acta. 1794(5): 769-781.

Nishino, K., Latifi, T. y Groisman, E. A. **2006**. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol. 59(1): 126-141.

Nriagu, J. O. **1978**. The Biogeochemistry of Lead in the Environment. Part A. Ecological Cycles. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press.

Nybroe, O., Brandt, K. K., Ibrahim, Y. M., Tom-Petersen, A. y Holm, P. E. **2008**. Differential bioavailability of copper complexes to bioluminescent Pseudomonas fluorescens reporter strains. Environmental toxicology and chemistry / SETAC. 27(11): 2246-2252.

O'Halloran, T. y Walsh, C. **1987**. Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the merR gene: isolation and characterization. Science. 235(4785): 211-214.

Ochman, H. y Groisman, E. A. **1994**. The origin and evolution of species differences in *Escherichia coli* and *Salmonella* typhimurium. EXS. 69: 479-493.

Ogasawara, H., Teramoto, J., Hirao, K., Yamamoto, K., Ishihama, A. y Utsumi, R. **2004**. Negative regulation of DNA repair gene (*ung*) expression by the CpxR/CpxA two-component system in *Escherichia coli* K-12 and induction of mutations by increased expression of CpxR. J Bacteriol. 186(24): 8317-8325.

Ogasawara, H., Yamada, K., Kori, A., Yamamoto, K. y Ishihama, A. **2010**. Regulation of the *Escherichia coli csgD* promoter: interplay between five transcription factors. Microbiology. 156(Pt 8): 2470-2483.

Olukoya, D. K., Smith, S. I. y Ilori, M. O. **1997**. Isolation and characterization of heavy metals resistant bacteria from Lagos Lagoon. Folia Microbiol (Praha). 42(5): 441-444.

Organización Mundial de la Salud. **2011**. Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization.

Osman, D. y Cavet, J. S. **2011**. Metal sensing in *Salmonella*: implications for pathogenesis. Advances in microbial physiology. 58: 175-232.

Osman, D., Waldron, K. J., Denton, H., Taylor, C. M., Grant, A. J., Mastroeni, P., Robinson, N. J. y Cavet, J. S. **2010**. Copper homeostasis in *Salmonella* is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. J Biol Chem. 285(33): 25259-25268.

Otto, K. y Silhavy, T. J. **2002**. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(4): 2287-2292.

Outten, C. E., Tobin, D. A., Penner-Hahn, J. E. y O'Halloran, T. V. **2001**. Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. Biochemistry. 40(35): 10417-10423.

Patte, O. H. y Pain, D. J. **2003**. Handbook of ecotoxicology, 2nd edition. En D. J. Hoffman y B. A. Rattner (Eds.), *Handbook in ecotoxicology*. Lewis Publishers. 373-408.

Pearson, R. G. **1963**. Hard and Soft Acids and Bases. Journal of the American Chemical Society. 85(22): 3533-3539.

Peitzsch, N., Eberz, G. y Nies, D. H. **1998**. Alcaligenes eutrophus as a bacterial chromate sensor. Appl Environ Microbiol. 64(2): 453-458.

Pérez Audero, M. E., Podoroska, B. M., Ibáñez, M. M., Cauerhff, A., Checa, S. K. y Soncini, F. C. **2010**. Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors. Mol Microbiol. 78(4): 853-865.

Pérez, J. M., Pradeñas, G. A., Navarro, C. A., Henríquez, D. R., Pichuantes, S. E. y Vásquez, C. C. **2006**. Geobacillus stearothermophilus LV cadA gene mediates resistance to cadmium, lead and zinc in *zntA* mutants of *Salmonella* entérica serovar Typhimurium. Biological Research. 39: 661-668.

Piddock, L. J. V. **2006**. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. Society. 19(2): 382-402.

Pogliano, J., Lynch, A. S., Belin, D., Lin, E. C. y Beckwith, J. **1997**. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. Genes Dev. 11(9): 1169-1182.

Pontel, L. B., Audero, M. E. P., Espariz, M., Checa, S. K. y Soncini, F. C. **2007**. GolS controls the response to gold by the hierarchical induction of *Salmonella*-specific genes that include a CBA efflux-coding operon. Mol Microbiol. 66(3): 814-825.

Pontel, L. B. y Soncini, F. C. **2009**. Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. Mol Microbiol. 73(2): 212-225.

Price, N. L. y Raivio, T. L. **2009**. Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. J Bacteriol. 191(6): 1798-1815.

Raivio, T. L. **2013**. Everything old is new again: An update on current research on the Cpx envelope stress response. Biochim Biophys Acta.

Raivio, T. L., Leblanc, S. K. y Price, N. L. **2013**. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. J Bacteriol. 195(12): 2755-2767.

Raivio, T. L., Popkin, D. L. y Silhavy, T. J. **1999**. The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. J Bacteriol. 181(17): 5263-5272.

Raivio, T. L. y Silhavy, T. J. **1997**. Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. J Bacteriol. 179(24): 7724-7733.

Ramanathan, S., Shi, W., Rosen, B. P. y Daunert, S. **1997**. Sensing antimonite and arsenite at the subattomole level with genetically engineered bioluminescent bacteria. Anal Chem. 69(16): 3380-3384.

Reith, F., Lengke, M. F., Falconer, D., Craw, D. y Southam, G. **2007**. The geomicrobiology of gold. The ISME journal. 1(7): 567-584.

Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. y Rosen, B. P. **2000**. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(2): 652-656.

Rensing, C., Mitra, B. y Rosen, B. P. **1997**. The *zntA* gene of *Escherichia coli* encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(26): 14326-14331.

Reyes-Caballero, H., Campanello, G. C. y Giedroc, D. P. **2011**. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. Biophys Chem. 156(2-3): 103-114.

Riether, K. B., Dollard, M. A. y Billard, P. **2001**. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli zntAp::lux* and *copAp::lux*-based biosensors. Appl Microbiol Biotechnol. 57(5-6): 712-716.

Ripp, s., Layton, A. C. y Sayler, G. S. **2011**. The microbe as a reporter: microbial bioreporter sensing technologies for chemical and biological detection. En K. Sen y N. J. Ashbolt (Eds.),

*Environmental Microbiology: Current Technology and Water Applications*. Norfolk, Caister Academic Press. 281–308.

Roat-Malone, R. M. **2007**. Frontmatter. En (Eds.), *Bioinorganic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. i-xix.

Robbens, J., Dardenne, F., Devriese, L., De Coen, W. y Blust, R. **2010**. *Escherichia coli* as a bioreporter in ecotoxicology. Appl Microbiol Biotechnol. 88(5): 1007-1025.

Robinson, N. J. y Winge, D. R. **2010**. Copper metallochaperones. Annual review of biochemistry. 79: 537-562.

Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J. y Roberts, M. **2006**. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. Nat Rev Microbiol. 4(5): 383-394.

Ruiz, N. y Silhavy, T. J. **2005**. Sensing external stress: watchdogs of the *Escherichia coli* cell envelope. Curr Opin Microbiol. 8(2): 122-126.

Rutherford, J. C., Cavet, J. S. y Robinson, N. J. **1999**. Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase. J Biol Chem. 274(36): 25827-25832.

Saier, M. H., Jr., Tam, R., Reizer, A. y Reizer, J. **1994**. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Mol Microbiol. 11(5): 841-847.

Sambrook, J., Fritdch, E. F. y Maniatis, T. **1989**. Molecular cloning : a laboratory manual.

Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. **1977**. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 74(12): 5463-5467.

Sarkar, G. y Sommer, S. S. **1990**. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis. Biotechniques. 8(4): 404-407.

Scaria, J., Palaniappan, R. U. M., Chiu, D., Phan, J. A., Ponnala, L., McDonough, P., Grohn, Y. T., Porwollik, S., McClelland, M., Chiou, C.-S., Chu, C. y Chang, Y.-F. **2008**. Microarray for molecular typing of *Salmonella enterica* serovars. Mol Cell Probes. 22(4): 238-243.

Scherer, C. A. y Miller, S. I. **2001**. Chapter 7 - Molecular Pathogenesis of *Salmonella*e. En E. A. Groisman (Eds.), *Principles of Bacterial Pathogenesis*. San Diego, Academic Press. 265-XIII.

Selifonova, O., Burlage, R. y Barkay, T. **1993**. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg(II) in the environment. Appl Environ Microbiol. 59(9): 3083-3090.

Sennhauser, G., Bukowska, M. A., Briand, C. y Grutter, M. G. **2009**. Crystal structure of the multidrug exporter MexB from Pseudomonas aeruginosa. J Mol Biol. 389(1): 134-145.

Sharff, A., Fanutti, C., Shi, J., Calladine, C. y Luisi, B. **2001**. The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. European journal of biochemistry / FEBS. 268(19): 5011-5026.

Shaw, C. F. **1999**. Gold-Based Therapeutic Agents. Chemical Reviews. 99(9): 2589-2600.

Shen, S. y Fang, F. C. **2012**. Integrated stress responses in *Salmonella*. International journal of food microbiology. 152(3): 75-81.

Shi, H., Hudson, L. G. y Liu, K. J. **2004**. Oxidative stress and apoptosis in metal ion-induced carcinogenesis. Free Radic Biol Med. 37(5): 582-593.

Silver, S. y Phung, L. T. **2005**. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. J Ind Microbiol Biotechnol. 32(11-12): 587-605.

Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C. y Montfort, W. R. **2004**. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. J Bacteriol. 186(22): 7815-7817.

Smith, I. y Carson, B. **1977**. Silver. En (Eds.), *Trace metals in the environment*. Michigan, Ann Arbor Science Publishers.

Snyder, W. B., Davis, L. J., Danese, P. N., Cosma, C. L. y Silhavy, T. J. **1995**. Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. J Bacteriol. 177(15): 4216-4223.

Stocker, J., Balluch, D., Gsell, M., Harms, H., Feliciano, J., Daunert, S., Malik, K. A. y van der Meer, J. R. **2003**. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. Environmental science & technology. 37(20): 4743-4750.

Storz, G., Tartaglia, L. A., Farr, S. B. y Ames, B. N. **1990**. Bacterial defenses against oxidative stress. Trends Genet. 6(11): 363-368.

Stoyanov, J. V. y Brown, N. L. **2003**. The *Escherichia coli* copper-responsive copA promoter is activated by gold. J Biol Chem. 278(3): 1407-1410.

Stoyanov, J. V., Hobman, J. L. y Brown, N. L. **2001**. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. Mol Microbiol. 39(2): 502-511.

Tal, N. y Schuldiner, S. **2009**. A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(22): 9051-9056.

Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W. y Virta, M. **1997**. Recombinant luminescent bacteria for measuring bioavailable arsenite and antimonite. Appl Environ Microbiol. 63(11): 4456-4461.

Tauriainen, S., Karp, M., Chang, W. y Virta, M. **1998**. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead. Biosens Bioelectron. 13(9): 931-938.

Tecon, R. y Van der Meer, J. **2008**. Bacterial Biosensors for Measuring Availability of Environmental Pollutants. Sensors. 8(7): 4062-4080.

Tom-Petersen, A., Hansen, H. C. y Nybroe, O. **2004**. Time and moisture effects on total and bioavailable copper in soil water extracts. Journal of environmental quality. 33(2): 505-512.

Tottey, S., Harvie, D. R. y Robinson, N. J. **2007**. Understanding how cells allocate metals. En D. H. Nies y S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Heilderberg, Springer. 4-35

Tsang, T. S., Freeman, W. K., Barnes, M. E., Reeder, G. S., Packer, D. L. y Seward, J. B. **1998**. Rescue echocardiographically guided pericardiocentesis for cardiac perforation complicating catheter-based procedures. The Mayo Clinic experience. Journal of the American College of Cardiology. 32(5): 1345-1350.

Valko, M., Morris, H. y Cronin, M. T. D. **2005**. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem. 12(10): 1161-1208.

van der Lelie, D., Schwuchow, T., Schwidetzky, U., Wuertz, S., Baeyens, W., Mergeay, M. y Nies, D. H. **1997**. Two-component regulatory system involved in transcriptional control of heavy-metal homoeostasis in Alcaligenes eutrophus. Mol Microbiol. 23(3): 493-503.

van der Meer, J. R. y Belkin, S. **2010**. Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. Nat Rev Microbiol. 8(7): 511-522.

Van Der Meer, J. R., Tropel, D. y Jaspers, M. **2004**. Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. Environmental microbiology. 6(10): 1005-1020.

Vogt, S. L. y Raivio, T. L. **2012**. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. FEMS Microbiol Lett. 326(1): 2-11.

Wackett, L. P., Dodge, A. G. y Ellis, L. B. M. **2004**. Microbial genomics and the periodic table. Appl Environ Microbiol. 70(2): 647-655.

Waldron, K. J. y Robinson, N. J. **2009**. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? Nat Rev Microbiol. 7(1): 25-35.

Wanekaya, A. K., Chen, W. y Mulchandani, A. **2008**. Recent biosensing developments in environmental security. Journal of Environmental Monitoring. 10(6): 703-712.

Wilson, G. S. y Ammam, M. **2007**. In vivo biosensors. The FEBS journal. 274(21): 5452-5461.

Winfield, M. D. y Groisman, E. A. **2003**. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol. 69(7): 3687-3694.

Wolanin, P. M., Thomason, P. A. y Stock, J. B. **2002**. Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. Genome biology. 3(10): REVIEWS3013.

Wolfe, A. J., Parikh, N., Lima, B. P. y Zemaitaitis, B. **2008**. Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR. J Bacteriol. 190(7): 2314-2322.

Yamamoto, K. y Ishihama, A. **2005**. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. Mol Microbiol. 56(1): 215-227.

Yamamoto, K. y Ishihama, A. **2006**. Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 70(7): 1688-1695.

Yamamoto, K., Ogasawara, H. y Ishihama, A. **2008**. Involvement of multiple transcription factors for metal-induced spy gene expression in *Escherichia coli*. Journal of biotechnology. 133(2): 196-200.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. **1985**. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33(1): 103-119.

Zha, S., Xu, X. y Hu, H. **2012**. A high sensitivity iron-dependent bioreporter used to measure iron bioavailability in freshwaters. FEMS Microbiol Lett. 334(2): 135-142.

Zhang, F. y Keasling, J. **2011**. Biosensors and their applications in microbial metabolic engineering. Trends in microbiology. 19(7): 323-329.

Zoltan, S., Jörg, S. y Vipul, P. **2006**. System Modeling in Cell Biology: From Concepts to Nuts and Bolts. Boston, The MIT Press.