



| 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

**“Rol de la proteína periplásmica CueP en la
homeostasis de cobre en *Salmonella*”**

Presentada por: Lic. Alejandro Pezza

Director: Dr. Fernando C. Soncini

Rosario, Argentina

2015

**“Rol de la proteína periplásmica CueP en la
homeostasis de cobre en *Salmonella*.”**

Alejandro Pezza

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 2010 y el 1 de Abril de 2015, bajo la dirección del Dr. Fernando C. Soncini.

“Rol de la proteína periplásmica CueP en la homeostasis de cobre en
Salmonella”

Alejandro Pezza.

Licenciado en Biotecnología

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 (IBR-CONICET), Laboratorio de Patogénesis Bacteriana, Departamento de Microbiología, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre abril de 2010 y abril de 2015 bajo la dirección del Dr. Fernando Soncini.

Dr. Fernando Soncini:

Jurado 1:

Jurado 2:

Jurado 3:

Defendida:

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

Trabajos publicados:

Pontel L., **Pezza A.**, Soncini F. (2010) Copper Stress Targets the Rcs System To Induce Multiaggregative Behavior in a Copper-Sensitive *Salmonella* Strain. *J. Bacteriol.* 192(23): 6287-6290.

Presentaciones a Congresos y Reuniones Científicas:

Pezza A., Pontel L., Soncini F. “Co-Dependence on copper excess and periplasmic stress to control *Salmonella CueP expression*” L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Rosario. Argentina. Noviembre 2014. *Biocell* 38 (Supl. 2), pp. 74.

Pezza A.; Pontel L.; Soncini F. “Transcriptional control of copper-resistance in *Salmonella*”. 4th ASM Conference on *Salmonella*: The Bacterium, the Host and the Environment. Boston. Estados Unidos. 2013

Pezza A.; Pontel L.; Soncini F. “Transcriptional control of the copper-resistance regulon in *Salmonella enterica*” XXI Congreso Latinoamericano de Microbiología (XXI ALAM). Santos. Brasil. 2012

Pezza A., Pontel L., Soncini F. “Transcriptional control of the copper resistance regulon in *Salmonella enterica*” XLVII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes. Argentina. Noviembre 2011. *Biocell* 35 (Supl.), pp. 52.

Pontel L., **Pezza A.**, Soncini F. “Copper stress targets the Rcs system to induce *Salmonella enterica* multiaggregative behavior”. XLVI Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Puerto Madryn. Argentina. Noviembre 2010. *Biocell* 34 (Supl.), pp. 107

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Dr Fernando Soncini por guiarme con mucho empeño en la realización de este trabajo. Agradezco su continua presencia y dedicación a la hora de transferir todos sus conocimientos y experiencia y su entusiasmo por los nuevos experimentos y la actividad científica.

También quiero agradecer muy especialmente a Lucas Pontel quien me enseñó todo acerca del trabajo y fue un gran apoyo desde mis comienzos. Gracias por responder a todas mis preguntas y ayudarme en todo lo que estaba a tu alcance con tanta predisposición y buena onda.

De igual forma, agradezco profundamente al resto de los integrantes del laboratorio que siempre estuvieron para aconsejarme, ayudarme y proponer soluciones a los problemas con mucho afecto y predisposición generando un excelente ambiente laboral.

Finalmente agradezco a mi familia por estar siempre y por su apoyo imprescindible en esta última etapa.

Índice

Índice	1
Abreviaturas y símbolos	4
Resumen	6
1. Introducción	7
1.1. El género <i>Salmonella</i>	8
1.1.1. Clasificación.....	8
1.1.2. Modelo de infección sistémica de <i>Salmonella</i>	9
1.1.3. Modelo de sobrevivencia y replicación de <i>Salmonella</i> dentro de células eucariotas	10
1.1.4. <i>Salmonella</i> y el microbioma intestinal.....	11
1.2. Los metales de transición en los sistemas biológicos.....	11
1.2.1. Rol de los metales de transición en los microorganismos.....	11
1.2.2. Toxicidad de los metales.....	12
1.2.3. Particularidades del Cu	15
1.3. Homeostasis y resistencia al Cu.....	17
1.3.1. Homeostasis de Cu	17
1.3.2. Mecanismos específicos de tolerancia al Cu en <i>E. coli</i>	19
1.3.3. Homeostasis de Cu en <i>Salmonella</i>	25
1.3.4. La homeostasis de Cu y su importancia en el curso de una infección	33
1.4 Mecanismos no específicos de tolerancia al Cu.....	34
1.4.1. Sistemas globales de respuesta a estrés periplasmático	35
1.4.2. Homeostasis de puentes disulfuro en el periplasma y daño por Cu.....	47
2. Objetivos	50
3. Materiales y Métodos	52
3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	53
3.2. Medios de cultivo, antibióticos y condiciones de crecimiento.....	63
3.3. Técnicas moleculares.....	63
3.3.1. Ácidos nucleicos.....	63
3.4. Preparación de células competentes	67
3.5. Transformación y selección	67
3.6. Manipulación genética.....	67
3.6.1. Construcción de mutantes polares y no polares en <i>Salmonella</i>	67

3.6.2. Construcción de fusiones transcripcionales a <i>lacZY</i>	69
3.6.3. Construcción de fusiones FLAG	69
3.6.4. Mutagénesis sitio dirigida empleando la técnica de “mutagénesis en un solo paso”.70	
3.6.5. Mutagénesis dirigida empleando la técnica de “SOE PCR”	70
3.6.6. Utilización del bacteriófago P22	73
3.7. Ensayos de actividad β -galactosidasa.....	74
3.8. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	75
3.9 Ensayo de competencia en el crecimiento en medio sólido.....	76
3.10. Curvas de crecimiento	76
3.11. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína	76
3.11.1. Fosforilación de oligonucleótidos.....	76
3.11.2. Cuantificación de ADN marcado radiactivamente	77
3.11.3. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en geles de poliacrilamida	77
3.11.4. Ensayos de protección a la digestión por ADNasaI o ADN “ <i>footprinting</i> ”	78
3.11.5. Secuenciación del ADN	79
3.12. Expresión y purificación de CueR y CpxR nativas	79
3.12.1. Purificación de CueR	79
3.12.2. Purificación de CpxR.....	80
3.13. Determinación de la concentración de proteínas.....	81
3.14. Electroforesis de proteínas.....	82
3.15. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (<i>Western blot</i>).....	82
3.16. Medidas cualitativas de actividad SOD	83
3.17. Herramientas bioinformáticas	84
4. Capítulo I.....	85
4.1. En presencia de Cu, la cepa sensible $\Delta cuiD$ presenta un crecimiento de aspecto mucoso	86
4.2. El sistema Rcs es responsable del fenotipo mucoso observado en la mutante $\Delta cuiD$ expuesta al estrés por Cu	88
4.3. El sistema Rcs de <i>Salmonella</i> confiere resistencia a Cu.....	91
4.4. La sobreexpresión de CueP alivia el estrés generado por Cu en la mutante $\Delta cuiD$	92
4.5. La función protectora de CueP no está vinculada a la reparación de los puentes disulfuros incorrectos en el periplasma	94

4.6. Conclusiones Capítulo I.....	98
5. Capítulo II.....	100
5.1. <i>cueP</i> forma parte del regulón Cpx.....	101
5.1.1. La expresión transcripcional de <i>cueP</i> está regulada diferencialmente dentro del regulón Cue.....	101
5.1.2 La región comprendida entre las bases -45 y -80 en el promotor de <i>cueP</i> es responsable de la regulación transcripcional diferencial	102
5.1.3. CpxR y CueR co-regulan la expresión de <i>cueP</i>	105
5.2. Estudio de la implicancia fisiológica de la regulación de <i>cueP</i> por CpxR	117
5.2.1. Rol fisiológico de la regulación de <i>cueP</i> por CpxR en la resistencia al Cu	117
5.2.2. Rol fisiológico de la regulación de <i>cueP</i> por CpxR en la respuesta al estrés oxidativo	124
5.3.1 Nuevos componentes en el locus <i>cueP</i>	126
5.3.2. El sRNA STnc780 se extiende dentro del operon <i>cuePQ</i>	128
5.3.3. El sRNA STnc780 afecta la traducción de <i>cueQ</i>	132
5.3.4. La expresión de <i>cueP</i> no está afectada por el sRNA STnc780.....	134
5.4. Conclusiones Capítulo II	135
6. Conclusiones Generales.....	137
7. Referencias Bibliográficas	141

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
DNasaI	Desoxirribonucleasa I
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
E	Coefficiente 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-tiogalactopiranosido
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-galactopiranosido
P	Promotor
p/V	Peso en volumen
Pb	Pares de bases
Ppb	Partes por billón

PPi	Pirofosfato
Ppm	Partes por millón
R	Resistente
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundos
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato de sodio
sRNA	ARN regulatorio pequeño
Tc	Tetraciclina
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
U	Unidad
Ufp	Unidades formadoras de placas
UV	Ultravioleta
V	Voltio
V/V	Volumen en volumen

Resumen

Los iones metálicos están involucrados en todas las fases de la vida y juegan roles primordiales en el crecimiento celular y el funcionamiento metabólico pero pueden ser tóxicos cuando su concentración supera un umbral determinado. En particular, las bacterias han desarrollado sistemas que permiten monitorear estos iones y modular la expresión de factores involucrados en la remoción de los mismos para mantener su homeostasis y prevenir su toxicidad. *Salmonella* 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. Entre estos, es de destacar a CueR, que ante la presencia de Cu(I) en el citoplasma induce la transcripción de *copA*, *cuiD* y *cueP*. Los productos de estos genes participan en forma directa y específica en la resistencia al metal. *Salmonella* dispone además de sistemas no específicos de respuesta a estrés celular que son importantes moduladores de la respuesta global a metales.

En este trabajo, vinculamos la resistencia al estrés por Cu con el sistema de fosfotransferencia Rcs de respuesta a estrés en la envoltura. Observamos que este sistema se activa en presencia de concentraciones subletales de Cu provocando la síntesis de la cápsula de ácido colánico en la cepa sensible a Cu Δ *cuiD*. Determinamos que el sistema Rcs confiere resistencia al Cu y que la sobreexpresión de CueP impide la activación de dicho sistema provocada por Cu.

Por otro lado, demostramos la participación del sistema de dos componentes CpxAR de respuesta a estrés periplasmático, que junto con CueR regulan transcripcionalmente la expresión de *cueP*. Estudiamos los aspectos mecanísticos de esta co-regulación y analizamos su relevancia fisiológica para la supervivencia en condiciones de estrés.

Finalmente, identificamos nuevos componentes en el locus *cueP*; un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 3,5 kDa que denominamos CueQ y que es cotranscripta junto a *cueP*, y un ARN regulatorio codificado en *cis* que afecta específicamente la traducción de *cueQ* dentro del operón.

1. Introducción

1.1. El género *Salmonella*

1.1.1. Clasificación

El género *Salmonella* está compuesto por dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*. Esta última está a su vez dividida en seis subespecies, clasificadas en más de 50 serogrupos basados en el antígeno O, somático, y divididos en 2400 serotipos basados en el antígeno H, flagelar (de Jong *et al.* 2012).

S. enterica es un organismo anaerobio intracelular facultativo Gram negativo de amplia importancia mundial que causa alrededor de 115 millones de casos de enfermedad en humanos reportados anualmente (Chaudhuri *et al.* 2013). Típicamente se adquiere por ingestión oral, y es agente causal de cuatro síndromes diferentes: fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis/diarrea, bacteremia y carga crónica asintomática (Coburn *et al.* 2007). La manifestación de la enfermedad depende tanto de la susceptibilidad del hospedador como del serotipo causante de la infección. En humanos, los serotipos Typhi, Paratyphi y Sendai causan fiebre entérica, mientras que la mayoría del resto de los serotipos de *S. entérica* están comúnmente asociados a enterocolitis/diarrea (Fierer y Guiney 2001). Mientras que el serotipo Typhi solo se restringe a infecciones humanas, otros serotipos están adaptados a una variedad de hospedadores, como es el caso de los serotipos Dublin, Typhimurium y Choleraesuis, que causan enfermedad tanto en humanos como en animales, provocando distintos síndromes en cada caso. Por ejemplo, el serotipo Dublin causa inflamación intestinal, bacteremia y aborto en vacas, el serotipo Typhimurium causa una enfermedad sistémica similar a la fiebre tifoidea en ratones, y el serotipo Choleraesuis causa septicemia en cerdos (Coburn *et al.* 2007).

Tanto en el desarrollo de la fiebre tifoidea como en la enterocolitis, las especies de *Salmonella* provocan un significativo daño inflamatorio empleando una serie de programas de virulencia que interactúan con los mecanismos de defensa del hospedador en varios tejidos y en diferentes estadios de la infección. De esta manera, se genera una inmunopatología que puede causar un importante deterioro en el organismo e inclusive la muerte (Garai *et al.* 2012).

La mayor parte del entendimiento de la patogénesis de la fiebre entérica surge del estudio de la infección de ratones con *S. enterica* serotipo Typhimurium (Broz *et al.* 2012). Justamente, en este trabajo de Tesis, se utilizó como organismo silvestre, la

cepa *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (ATCC® 14028TM) y que a partir de ahora se nombrará como *Salmonella* Typhimurium o *S.* Typhimurium.

1.1.2. Modelo de infección sistémica de *Salmonella*

Seguido a la ingestión oral, *Salmonella* es capaz de sobrevivir la acidez gástrica y colonizar el íleon y el ciego. En el intestino delgado, se adhiere a la mucosa e invade células epiteliales y fagocíticas como las células M que recubren las placas de Peyer (nódulos linfoides del íleon terminal), o bien es captada por células dendríticas, siendo capaz de atravesar el epitelio intestinal accediendo así al tejido linfoide subyacente (Figura 1.1.) (Velge *et al.* 2012).

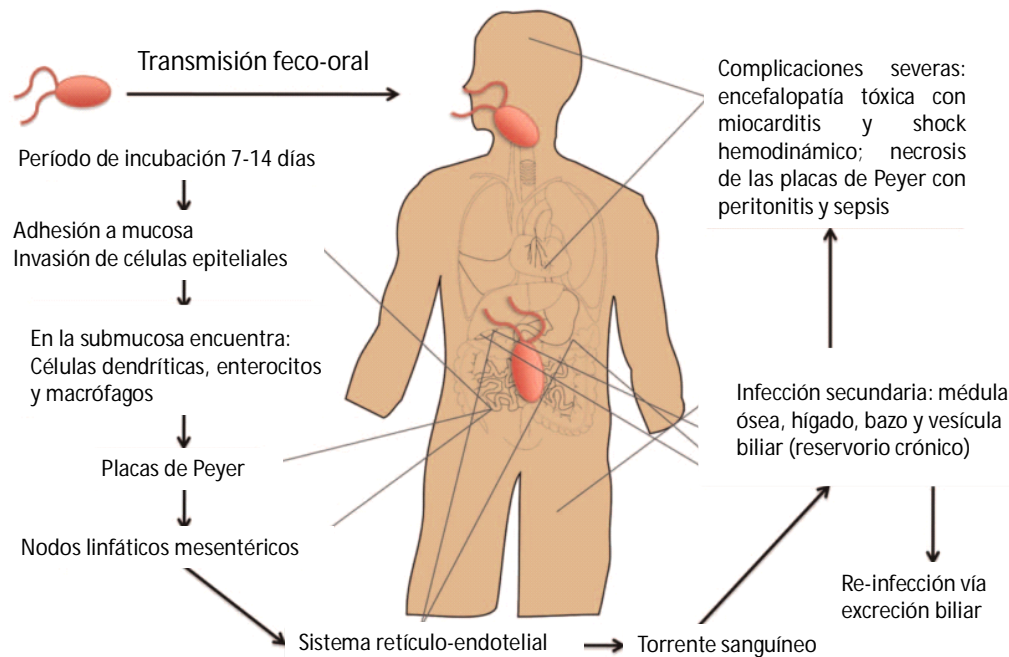


Figura 1.1. Diseminación de *S. Typhi* durante la infección sistémica. La descripción del proceso se encuentra en el texto. Adaptado de De Jong *et al.* 2012.

Una vez que ha penetrado la barrera epitelial, *Salmonella* se trasloca a los folículos linfoides intestinales e infecta los ganglios linfáticos mesentéricos logrando pasar a las células retículo-endoteliales del hígado y el bazo (Santos *et al.* 2001). Durante la bacteriemia, *Salmonella* se disemina por todo el cuerpo, pudiendo ocurrir infecciones secundarias en hígado, bazo, médula ósea, vesícula biliar y placas de peyer, siendo la vesícula biliar el principal reservorio durante una infección crónica con *S.* Typhi (Crawford *et al.* 2010). La habilidad de *Salmonella* de formar

biopelículas en la vesícula biliar es probablemente un factor crítico en el establecimiento de la carga y diseminación crónica de *S. Typhi*. La bacteria que es excretada en la bilis puede luego invadir nuevamente la pared intestinal o ser excretada en las heces (de Jong *et al.* 2012).

1.1.3. Modelo de sobrevivencia y replicación de *Salmonella* dentro de células eucariotas

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

Siguiendo el curso de la internalización, *Salmonella* permanece dentro de un fagosoma modificado conocido como la vacuola que contiene a *Salmonella* (SCV, del inglés *Salmonella containing vacuole*). La formación y mantenimiento de la SCV involucra eventos que son controlados por la SPI-2. Los genes codificados en dicha isla no son esenciales para causar gastroenteritis pero son indispensables para la infección sistémica ya que promueven la sobrevivencia intracelular de *Salmonella* dentro de la célula hospedadora (Garai *et al.* 2012). La principal función de la SPI-2 es la de remodelar la vacuola, formando un nicho de replicación intracelular mediante la alteración del tráfico endocítico. Las actividades realizadas por los diversos efectores incluyen la alteración de la fusión entre lisosomas y la SCV (Uchiya *et al.* 1999), la evasión de la muerte de macrófagos dependiente de la NADPH oxidasa (Volkman *et al.* 2001), el retraso de la muerte celular similar a la apoptosis (van der Velden *et al.* 2000), la alteración de la membrana vacuolar y la manipulación del citoesqueleto asociado a la SCV (Poh *et al.* 2008; Ruiz-Albert *et al.* 2002).

1.1.4. *Salmonella* y el microbioma intestinal

En los últimos años quedó claro que el microbioma intestinal, que consta de más bacterias que el número total de células en el cuerpo humano, puede ser visto como un órgano exteriorizado que ejerce numerosas funciones en la respuesta del hospedador contra la salmonelosis (Thiennimitr *et al.* 2012). El microbioma intestinal saludable puede proteger contra la invasión a células epiteliales mediante la producción de metabolitos tóxicos que reprimen la expresión de genes de virulencia de *Salmonella*, además de optimizar el sistema inmune del hospedador, y mediar la desaparición del patógeno en el lumen intestinal después de una diarrea no tifoidea (Endt *et al.* 2010).

Se observó que la respuesta inflamatoria del hospedador favorece el crecimiento de *S. Typhimurium* en el intestino (Raffatellu *et al.* 2010; Barman *et al.* 2008). Esta bacteria es capaz de explotar nutrientes derivados del microbioma, como la etanolamina, adquiriendo una ventaja en el crecimiento en el lumen del intestino inflamado respecto a otros potenciales patógenos (Thiennimitr *et al.* 2012). Además, dentro del ambiente del intestino inflamado *S. Typhimurium* puede respirar anaeróbicamente tomando ventaja frente a los microbios intestinales fermentadores (Liu *et al.* 2012). Las especies reactivas del oxígeno (EROS) generadas durante la inflamación, reaccionan con compuestos de azufre endógenos del lumen (tiosulfatos) para formar un nuevo aceptor de electrones de la cadena respiratoria (tetracionato). Por lo tanto, la capacidad para desencadenar la inflamación intestinal es crucial para la biología de este patógeno diarreico (Winter *et al.* 2011). Es por esto, que el potencial de las terapias basadas en la microbiota para curar a los pacientes infectados con *Salmonella* ha abierto toda una nueva área de investigación (de Jong *et al.* 2012).

1.2. Los metales de transición en los sistemas biológicos

1.2.1. Rol de los metales de transición en los microorganismos

Los metales están involucrados en todas las fases de la existencia microbiana y juegan roles primordiales en el crecimiento celular y el funcionamiento metabólico (Nies 2007). Además de los principales elementos químicos, carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O), nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S), utilizados como componentes de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y azúcares, las células requieren

de metales para su desarrollo normal. Algunos, como sodio (Na), magnesio (Mg), potasio (K) y calcio (Ca), son requeridos en grandes cantidades por lo que se los denomina macronutrientes, mientras que otros, entre los que se incluye metales de transición o “metales pesados” como manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), vanadio (V), molibdeno (Mo), zinc (Zn), cobre (Cu) y wolframio (W), son requeridos en cantidades mucho menores (Hobman *et al.* 2007). Debido al potencial redox único de algunos de estos metales de transición, también denominados micronutrientes, muchos tienen importantes roles como cofactores en enzimas y se requieren para la transferencia de electrones (Wackett *et al.* 2004). Se estima que entre el 30-45% de las enzimas son metalo-proteínas cuyas funciones requieren de un cofactor metálico (Porcheron *et al.* 2013).

En el caso de los micronutrientes metálicos esenciales, se ha visto que tanto niveles insuficientes o excesivos de los mismos resultan perjudiciales y son factores desencadenantes de estrés por lo que el correcto funcionamiento celular requiere mantener un fino balance en la concentración intracelular de estos elementos (Nies 1999).

Además de los elementos mencionados, en la naturaleza existen otros metales de transición, tales como aluminio (Al), oro (Au), plata (Ag), bismuto (Bi), cadmio (Cd), cromo (Cr), mercurio (Hg), plomo (Pb), estaño (Sn) y talio (Tl), que no poseen un rol biológico conocido y que resultan tóxicos aún en mínimas cantidades (Hobman *et al.*, 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 (Wackett *et al.* 2004; Silver y Phung 2005).

1.2.2. 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 puedan participar en el metabolismo del organismo (Magrisso *et al.* 2008). 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 (Collins y Stotzky 1992; Bolana *et al.* 2014). 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 (Bolana *et al.* 2014).

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 (Finney y O'Halloran 2003). 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 Irving-Williams (Fraústo da Silva y Williams 1991), que para la primera fila de metales de transición de la tabla periódica es la siguiente:



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 (Braymera y Giedroc 2014). Estos metales también pueden unirse a tioles de bajo peso molecular como glutatión y cisteína, reduciendo la disponibilidad celular de estos compuestos, interactuar 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 *et al.* 2007; Nies 2003).

C. La capacidad de participar en reacciones de óxido-reducción

Las células producen EROS como producto de la utilización de la molécula de oxígeno (O_2) en diversos procesos metabólicos (Kashmiri y Mankar 2014). El oxígeno molecular forma el anión superóxido (O_2^-) al aceptar un electrón, o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) cuando este último se reduce (González-Flecha y Demple, 2000; Storz *et al.*, 1990). Los metales de transición pueden causar estrés oxidativo por acumulación de EROS ya sea en forma directa o indirecta (Cabiscol *et al.* 2000).

Los denominados metales “redox” como el Fe, Cu, Cr, Co y V, pueden reaccionar con el anión superóxido o con el peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton (Neyens y Baeyens 2003), o bien con ambos en la reacción de Haber-Weiss (Sutton y Winterbourn 1989), formando el radical hidroxilo, OH^* (Figura 1.2). 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 inter e intramoleculares que pueden involucrar a proteínas, o incluso otras biomoléculas, como por ejemplo ácidos nucleicos (Shi *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2005).

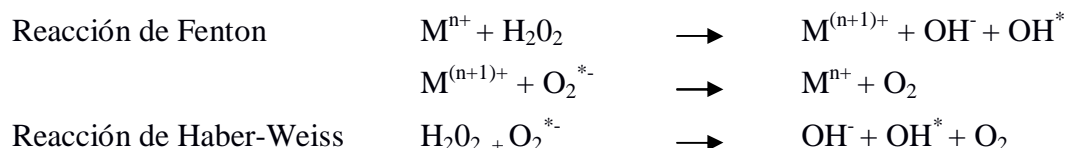


Figura 1.2. Generación de especies reactivas del oxígeno mediante el poder reductor de los iones metálicos. Reacción de Fenton y reacción de Haber-Weiss (Lemire *et al.* 2013). Los iones metálicos se representan como M^{n+} o $M^{(n+1)+}$ de acuerdo a la valencia (n) que tengan.

Aquellos metales que no tienen propiedades de óxido-reducción, pero sí 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 *et al.* 2007).

1.2.3. Particularidades del Cu

1.2.3.1. Rol del Cu en los microorganismos

El cobre, es un elemento común en el planeta y se distribuye en el ambiente a través de procesos naturales. Su concentración media en la corteza terrestre es de 60 ppm (Kiaune y Singhasemanon 2011), donde se encuentra formando compuestos como piritita ($CuFeS_2$), calcocita (Cu_2S), cuprita (Cu_2O) y malaquita ($Cu_2CO_3(OH)_2$) (Magnani y Solioz 2007). Por otra parte, es 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 del mismo tanto en el aire, como en el suelo y en el agua (Kiaune y Singhasemanon 2011).

Es un bioelemento joven ya que en las condiciones reductoras prevalentes previas al advenimiento del oxígeno atmosférico, el Cu se encontraba en el estado Cu(I), insoluble en agua en forma de sulfuros y por lo tanto no biodisponible. Con el advenimiento de los microorganismos fotosintéticos como las cianobacterias y la

concomitante acumulación de oxígeno molecular, ocurrieron cambios irreversibles en la vida sobre la Tierra (Rensing y Grass 2003). Mientras las enzimas involucradas en el metabolismo anaeróbico necesitan trabajar en la porción baja del espectro redox, la presencia de oxígeno molecular creó la necesidad de utilizar un metal activo con potenciales $E_0 M^{n+1} / E_0 M^n$ de 0 a 0,8 V. El potencial redox Cu(II)/Cu(I) es usualmente mayor que el del Fe(III)/Fe(II) y la mayoría de las cupro-enzimas trabajan entre 0,25 y 0,75V. Este alto potencial, puede ser utilizado para la oxidación directa de compuestos fácilmente oxidables como superóxido, ascorbato, catecol o fenolato. Es por esta razón, que las cuproproteínas están ampliamente distribuidas entre los organismos aeróbicos y principalmente llevan a cabo dos funciones: la transferencia de electrones y el transporte y activación de O₂, estando presentes en procesos vitales tales como la respiración, el transporte de hierro, la protección al estrés oxidativo, la coagulación sanguínea y pigmentación (Rensing y Grass 2003).

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

1.2.3.2. Toxicidad del Cu en los microorganismos

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



Cuando la reacción análoga es generada *in vivo* por Fe, los radicales hidroxilos son potentes oxidantes del ADN causando mutagénesis y letalidad (Imlay *et al.* 1988). Sin embargo, el crecimiento de cepas de *E. coli* sensibles al Cu que acumulan mayor cantidad del catión intracelularmente, se ve favorecido frente a la exposición a H₂O₂

cuando se agrega Cu al medio (Macomber *et al.* 2007). Esto se debe a que el Cu, además de no generar cantidades significativas de EROS que dañen al ADN, disminuye la generación de radicales tóxicos generados a causa del Fe, que finalmente conduce a una menor cantidad de lesiones en el genoma. Este efecto se debe en parte a que la mayor proporción del Cu con actividad redox estaría presente en el periplasma sin acceso directo al ADN (Macomber *et al.* 2007). Estos estudios, sumado al hecho de que el Cu ejerce su efecto tóxico aún en condiciones anaeróbicas motivaron a investigar sobre el origen del mecanismo primario de toxicidad del metal. Recientemente, se observó en cepas de *E. coli* que niveles micromolares de Cu inhiben el crecimiento de las células y que el agregado de aminoácidos de cadena ramificada es suficiente para restablecerlo, indicando que el Cu bloquea la biosíntesis de dichos aminoácidos (Macomber y Imlay 2009). Efectivamente, el tratamiento con el metal rápidamente inactiva enzimas de la familia de las dehidratasas que contienen centros Fe-S entre las cuales se encuentra la isopropilmalato dehidratasa implicada en la ruta de biosíntesis de aminoácidos ramificados (Jang y Imlay 2007). Dicha inactivación ocurre tanto *in vivo* como *in vitro* y el daño sucede concomitantemente con el desplazamiento de átomos de Fe desde los centros Fe-S expuestos al solvente, sugiriendo que Cu(I) inactiva a estas proteínas actuando como ligando de coordinación con los átomos de azufre. Tanto el exporte del cobre mediante las bombas específicas, el quelado del mismo con glutatión, como los sistemas de ensamblado que reparan los centros Fe-S aumentan la resistencia de las células a este metal (Pontel *et al.* 2015).

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

1.3. Homeostasis y resistencia al Cu

1.3.1. Homeostasis de Cu

Dada la naturaleza dual del Cu, todos los organismos vivos han elaborado

diferentes mecanismos para mantener la homeostasis de dicho metal. En eucariotas, desde levaduras a humanos, las células poseen sistemas altamente conservados para adquirir Cu, dirigirlo hacia los centros metálicos de las enzimas apropiadas y a los compartimentos intracelulares adecuados, o bien expulsarlo fuera de la célula (Peña *et al.* 1999). El ensamblaje de estas actividades mantiene la cantidad de Cu celular dentro de los rangos aceptables, dependiendo de las condiciones de crecimiento y del fondo genético y bioquímico del organismo (Zhen *et al.* 2010).

E. coli mantiene su cuota de Cu dentro de un rango estrecho de concentraciones, aproximadamente 10^4 átomos por célula o lo que equivale a $\sim 10 \mu\text{M}$ (Changela *et al.* 2003). Hasta el momento, en dicho organismo, no se han identificado sistemas de importe específicos, reflejando posiblemente el hecho de que no se requiere de dicho ion metálico en el citosol, y se desconoce el mecanismo por el cual el mismo ingresa a las células (Osman y Cavet 2008). El Cu^{+1} es la forma preferida y más abundante dentro del ambiente reductor del citoplasma donde generalmente se encuentra formando complejos con glutatión u otras moléculas pequeñas (Waldron y Robinson 2009).

En contrapartida, la presencia de Cu en el periplasma es muy importante. Es en este compartimiento donde se localizan las cuproproteínas caracterizadas, tanto en *E. coli* como *Salmonella*, y se sugiere que el metal alcanza el ambiente periplásmico atravesando la membrana externa a través de porinas (Osman y Cavet 2008). En este contexto, los microorganismos utilizan diferentes estrategias para controlar la concentración y localización del metal de forma que esté disponible para las enzimas que lo requieren (Changela *et al.* 2003).

La homeostasis de Cu en las bacterias se mantiene como resultado de un conjunto complejo de procesos celulares. Las estrategias utilizadas para eliminar el exceso del metal son diversas, incluyendo diferentes sistemas regulatorios que modulan la expresión de factores involucrados en el secuestro y la expulsión activa del ion metálico así como también, la oxidación del mismo en el espacio periplásmico (Espariz *et al.* 2007).

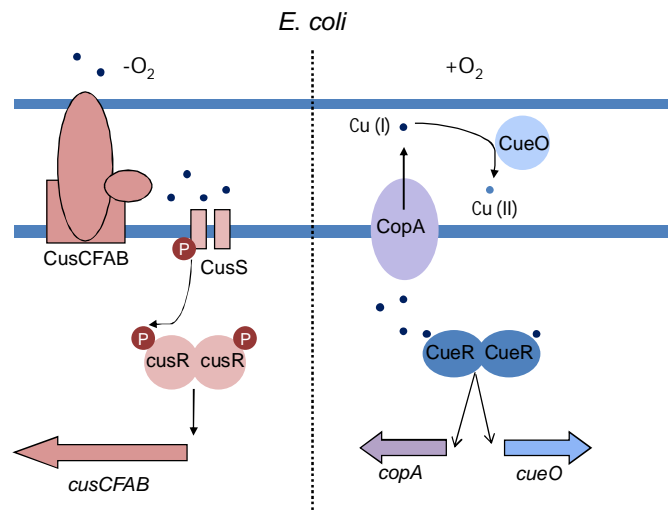
Se han identificado dos sistemas cromosomales involucrados en la tolerancia al Cu en *E. coli*. Ambos catalizan el eflujo del exceso del catión desde la célula hacia el espacio extracelular. Uno de ellos es el sistema Cue, del inglés Cu efflux, y el otro, es el sistema de eflujo de Cu Cus, del inglés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

1.3.2. Mecanismos específicos de tolerancia al Cu en *E. coli*

1.3.2.1. El regulón Cue

Uno de los principales sistemas de detoxificación directa de Cu es el regulón Cue, esquematizado en la Figura 1.3, y cuyos componentes se detallan a continuación.

Figura 1.3. Resistencia a Cu en *E. coli*. La detoxificación de cobre está a cargo de los sistemas Cue y Cus. En presencia de Cu en el citoplasma interviene el sistema Cue. CueR detecta la presencia de Cu y activa la expresión de *copA* y *cueO* que brindan resistencia al metal principalmente en aerobiosis. El sistema Cus, detecta Cu en el periplasma activando la expresión de la bomba de eflujo CusCFBA de importancia en la resistencia al Cu en anaerobiosis.



A. CueR

En presencia de Cu en el citoplasma, el regulador transcripcional CueR activa la expresión de los genes de resistencia al Cu *copA* y *cueO*. Dicho regulador pertenece a la familia MerR; por lo tanto para entender su funcionamiento conviene describir brevemente el mecanismo con el cual MerR actúa sobre los promotores de sus genes blanco.

MerR (del inglés Mercury Resistance Regulator), fue identificado inicialmente como el gen responsable de la activación de los genes que otorgan resistencia al mercurio (Hg) en bacterias en el año 1986 (Lund *et al.* 1986). La posterior expresión recombinante y estudios bioquímicos determinaron que se trataba de una proteína capaz de unirse a la región operadora de los promotores que están bajo su control, reconociendo una secuencia palindrómica entre las cajas -10 y -35, tanto en presencia como ausencia de Hg (O'Halloran y Walsh 1987).

Hasta ese momento se conocían una variedad de señales físicas y químicas del ambiente extracelular que podían provocar una transducción de dicha señal generando, a través de diferentes pasos, cambios en la expresión de genes. Sin

embargo, no se conocía ningún mecanismo capaz de disparar una respuesta celular al estrés por metales pesados (Cashin *et al.* 2006). En 1989, se demostró que tal mecanismo emplea una única proteína receptora del metal pesado (MerR) para activar en forma directa la expresión del operón de resistencia al Hg; con lo cual se determinó que MerR es un activador transcripcional modulado alostéricamente (O'Halloran *et al.* 1989)

En ausencia del regulador MerR, los promotores *mer* tienen una actividad constitutiva débil. Estudios posteriores, demostraron que la transcripción desde los promotores *mer* es ligeramente reprimida por MerR en ausencia de Hg^{2+} y fuertemente activada por el mismo regulador en presencia del metal (O'Halloran *et al.* 1989). Estos datos, sumados a las evidencias de cambios conformacionales provenientes de estudios físicos y del análisis de los patrones de digestión con nucleasas de los complejos ADN-MerR en sus estados activados y reprimidos lograron dilucidar los detalles moleculares de la regulación. Mientras que el espaciamiento óptimo entre las cajas -10 y -35 en un promotor típico es de 17 pb, los promotores *mer* operan con un espaciamiento subóptimo de 19 pb; esta es una característica crucial de los promotores modulados por MerR y es el centro del mecanismo de distorsión del ADN con el cual operan estos reguladores (Figura 1.4).

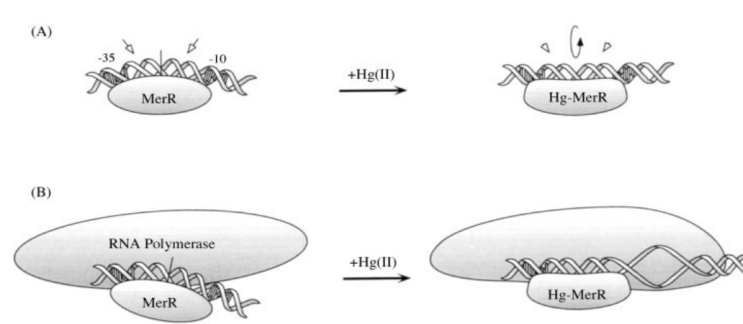


Figura 1.4. Modelo de distorsión de MerR. (A) Apo MerR dobla la molécula de ADN produciendo dos pliegues (flechas) espaciados simétricamente en torno al centro del operador (línea vertical). Cuando une Hg(II), MerR produce una torsión que relaja el centro del operador (flecha circular) (B) Cuando Apo-MerR se une al operador, la ARNP sólo es capaz de acceder a la caja -35 y la transcripción está reprimida. La torsión que provoca Hg-MerR permite a la ARNP acceder tanto a las cajas -35 como -10 activando así la transcripción. Adaptado de Outten *et al.*, 1999.

El hecho de que el espaciamiento entre sus elementos -10 y -35 difiera de los 17 pb consenso, hace que estos promotores sean malos sustratos para la ARN Polimerasa (ARNP) (Outten *et al.* 1999). En el mecanismo de distorsión del ADN provocado por MerR, la transición desde la represión a la activación involucra varias alteraciones locales en la estructura del ADN y se propone que una serie de

distorsiones específicas convierten al promotor en un sustrato propicio para la ARNP (Philips *et al.* 2015). El mecanismo propuesto consiste en que el regulador en su forma Apo-MerR provoca una curvatura en el ADN produciendo dos pliegues en la estructura de dicha molécula y el agregado del inductor libera la tensión de esta curvatura a la altura de los pliegues.

Cuando el metal se une a MerR se produce un sub-enrollamiento del ADN (diferente al estado natural sin apo-MerR) cuyo efecto es ubicar a las cajas -10 y -35 en un alineamiento apropiado para la unión de la ARNP con lo cual se produce la formación del complejo abierto y el posterior comienzo de la transcripción. El sub-enrollamiento además podría ayudar energéticamente a la separación de las hebras para la formación del complejo abierto. Así, tanto la pérdida de la curvatura generada por apo-MerR, como el sub-enrollamiento actúan para generar un promotor que es mucho mejor sustrato para la ARNP incrementando drásticamente la tasa del inicio de transcripción (Changela *et al.* 2003). La delección de 2 pb en la región espaciadora (generando un distanciamiento óptimo de 17 pb) provoca un efecto similar a la unión del regulador MerR junto a su efector, alineando las cajas -10 y -35 en una conformación apropiada para la unión de la ARNP generando así un promotor “constitutivo” para el regulador de tipo MerR involucrado (Outten *et al.* 1999).

Estudios recientes de FRET llevados a cabo con marcas fluorescentes tanto en la ARNP como en la región promotora del promotor de tipo *mer* demuestran que dicha interacción puede ocurrir generando 3 estados diferentes (E_{FRET}): uno que corresponde al promotor libre (E_0), otro a la ARNP unida al promotor en un complejo cerrado (E_1) y otro correspondiente a la formación del complejo abierto (E_2) (Martell *et al.* 2015). Los estados E_1 y E_2 no son interconvertibles sino que la presencia de holo-MerR incrementa notablemente la proporción de E_2 por sobre E_1 aumentando tanto la constante de velocidad de unión de la ARNP en el estado E_2 como la de desunión del E_1 (Martell *et al.* 2015). La unión de la ARNP para formar el complejo ternario, mantiene la forma específica en la cual MerR se une a su promotor, probablemente reforzando los cambios estructurales en el ADN provocados por apo y holo-MerR, con lo cual la ARNP y MerR actúan sinérgicamente en la regulación de la transcripción de estos promotores (Martell *et al.* 2015).

Con el paso del tiempo, se caracterizaron otros miembros pertenecientes a la familia MerR. Se trata de reguladores transcripcionales que poseen regiones N-terminales similares con un dominio hélice-giro-hélice de unión al ADN y regiones C-

terminales de unión al efector que varían y son específicas para el reconocimiento del mismo (Newberry y Brennan 2004). Reguladores del tipo MerR han sido encontrados en un amplio género de bacterias pero no se han encontrado en arqueas o eucariotas y la mayoría responden a estímulos ambientales como estrés oxidativo, metales pesados y antibióticos (Brown *et al.* 2003). Un subgrupo de esta familia activa la transcripción en respuesta a iones metálicos mostrando similitud de secuencia tanto en las regiones N como C-terminales (Hobman *et al.* 2005).

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

La calibración termodinámica para CueR revela una sensibilidad zeptomolar (10^{-21}) para la unión de Cu^{1+} libre, que representa menos de un átomo por célula (Changela *et al.* 2003), sugiriendo que no habría átomos de Cu libres en el citoplasma.

B. CueO

CueO es una multi-cobre oxidasa periplásmica que cataliza la oxidación de varios sustratos tales como polifenoles, poliaminas aromáticas, L-ascorbato e iones metálicos, transfiriendo los electrones liberados a un grupo de iones Cu con la concomitante reducción de oxígeno molecular a agua (Sakurai y Kataoka 2007). Esta proteína requiere de O_2 para su actividad y por lo tanto está inactiva en anaerobiosis. Aunque aún se debe establecer su rol con mayor precisión, se propone que CueO contribuye a la detoxificación del Cu convirtiendo el Cu(I) en Cu(II), menos tóxico para la célula (Osman y Cavet 2008).

CueO une 4 iones de Cu y es exportada al periplasma por el sistema TAT (para proteínas pre-plegadas), donde exhibe actividad oxidasa inducida por el ión metálico (Roberts *et al.* 2002; Singh *et al.* 2004). Sin embargo, no se conoce si CueO adquiere el Cu en el periplasma o si se exporta pre-metalada contribuyendo así, al transporte de Cu desde el citosol. Mutantes de *E. coli* con una delección en *cueO*,

muestran una marcada reducción en la tolerancia al metal bajo condiciones aeróbicas, pero no presentan fenotipo en ausencia de O₂ (Outten *et al.* 2001; Grass y Rensing 2001).

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

C. CopA

CopA es una ATPasa de tipo P que expulsa Cu(I) desde el citosol hacia el periplasma, con un rol crucial en el transporte del ión metálico tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas (Osman y Cavet 2008; Espariz *et al.* 2007). Mutantes por delección en *copA* son hipersensibles al Cu tanto en presencia como en ausencia de O₂, mientras que la tolerancia a otros metales (Ag, Cd, Zn y Pb) no se ve afectada, al menos bajo condiciones aeróbicas (Rensing *et al.* 2000). Estas mutantes muestran una disminución en el eflujo de Cu, acumulando el ión metálico dentro de las células, mientras que la expresión de CopA en vesículas evertidas, produce en ellas una acumulación del catión acoplada a ATP en presencia del agente reductor ditioneitol (DTT), indicando que CopA transporta Cu¹⁺ desde el citosol impulsada energéticamente por ATP (Rensing *et al.* 2000). De hecho, CopA puede catalizar la hidrólisis de ATP para formar un intermediario acil fosfato en presencia de Cu(I) o Ag(I), pero no Zn(II), Cu(II) o Co(II) (Stoyanov *et al.* 2003).

1.3.2.2. El sistema Cus

Además del regulón Cue, *E. coli* cuenta con el sistema Cus de detoxificación de Cu. Éste, está codificado por el operón *cusCFBA*, controlado transcripcionalmente por el sistema de transducción de señal de dos componentes CusR/CusS que en presencia de Cu periplásmico activa su expresión (Figura 4.3) (Outten *et al.* 2001).

Mientras que el sistema Cue confiere tolerancia al Cu bajo niveles moderados a altos del metal, el sistema Cus solamente es requerido bajo condiciones extremas de estrés por Cu y es particularmente importante en ambientes anaeróbicos (Bondarczuk y Piotrowska-Seget 2013). CusR/CusS monitorea la envoltura celular respondiendo al exceso de Cu(I) periplásmico. Se ha reportado que mientras que la expresión máxima de los promotores de *cueO* y *copA* ocurre a una concentración de

10 μM Cu, la inducción máxima de *cusCFBA* ocurre a niveles mucho mayores (200 μM Cu), sugiriendo que el sistema Cus, sólo se activa una vez que el sistema Cue está sobrepasado (Osman y Cavet 2008). En contraste, bajo condiciones anaeróbicas, la expresión máxima para el promotor de *cusCFBA* ocurre a niveles menores de Cu que los observados en aerobiosis (70 μM), mientras que los niveles de Cu requeridos para la inducción máxima de *cueO* se incrementan a 60 μM , sugiriendo un rol más importante para el sistema Cus bajo condiciones anaeróbicas, posiblemente relacionado a un aumento en la proporción periplasmática de Cu(I) (Osman y Cavet 2008). En concordancia con estas observaciones, mutantes con deleciones en *cusR* o *cusA* poseen una tolerancia normal al Cu en presencia de O_2 , pero la sensibilidad y el incremento de la acumulación del metal se evidencian en anaerobiosis (Outten *et al.* 2001). Sin embargo, la doble mutante $\Delta\text{cueR } \Delta\text{cusR}$, muestra una reducción substancial en la tolerancia al Cu en aerobiosis, comparada ya sea con la cepa silvestre o con las simples mutantes, y la deleción de los genes estructurales *cusCFBA* en simultáneo con *cueO* también causan pérdida de tolerancia al Cu respecto a la simple mutante *cueO* (Grass y Rensing 2001; Franke *et al.* 2003), por lo que se postula que el sistema Cus posee un rol de respaldo en condiciones aeróbicas cuando el sistema Cue no puede funcionar correctamente.

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

1.3.3. Homeostasis de Cu en *Salmonella*

Como se menciona anteriormente, la homeostasis de Cu en *E. coli* involucra la acción coordinada de los sistemas Cue y Cus. En contraste, *Salmonella* Typhimurium sólo posee el regulón Cue (Espariz *et al.* 2007). El homólogo de *cueO* en *Salmonella* también se denomina *cuiD* (Lim *et al.* 2002) y será nombrado de esta manera a lo largo de este trabajo. Entre las diferencias que surgen al comparar el sistema Cue entre ambas especies, se puede mencionar que en *Salmonella*, la inactivación de *cuiD*, muestra el fenotipo más severo en la resistencia al Cu y además se ha visto que también es requerido para la tolerancia al Cu en condiciones anaeróbicas, aunque en menor medida que en aerobiosis (Pontel *et al.* 2015). Además, la delección de *copA* provoca un efecto moderado en aerobiosis, pero afecta drásticamente la resistencia al cobre en ausencia de oxígeno (Rademacher y Masepohl 2012). Una de las diferencias más interesantes respecto a *E. coli* es que *Salmonella* posee una segunda ATPasa tipo P, GoIT, que puede sustituir el transporte de Cu, disminuyendo el efecto de la delección en *copA* (Tabla 1.1) (Espariz *et al.* 2007).

Sin embargo, la diferencia más notable entre estas dos especies en cuanto a la homeostasis de Cu, es que en *Salmonella*, el regulón Cue también es responsable del control de la toxicidad del cobre en anaerobiosis, ya que la resistencia en esta condición requiere de un gen controlado por CueR denominado *cueP*, del inglés CueR- induced periplasmic protein (Pontel y Soncini 2009).

En resumen, tal como ocurre en *E. coli*, el sistema Cue de *Salmonella* protege al citosol del exceso de Cu. Por otra parte, y aunque *Salmonella* carece del sistema de eflujo de Cu periplasmático CusCFBA, puede soportar concentraciones del metal más altas que *E. coli* bajo condiciones anaeróbicas. Esta resistencia está dada, en gran medida, por *cueP*, que está ausente en *E. coli* y forma parte del regulón Cue de *Salmonella* (Figura 1.5).

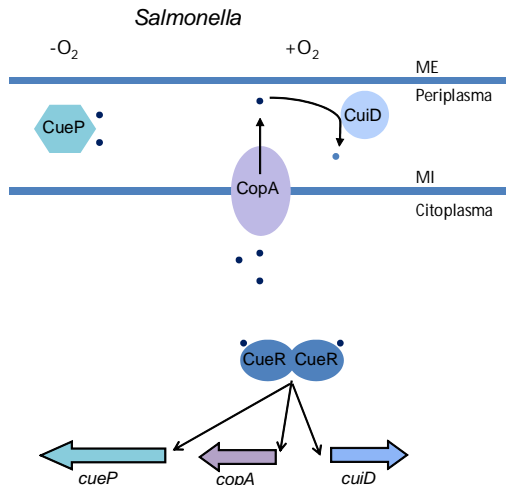


Figura 1.5. Resistencia a Cu en *Salmonella*. A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*; en *Salmonella*, tanto en anaerobiosis como en aerobiosis los componentes del regulón Cue intervienen en la resistencia al Cu ya que CueR activa la expresión de *copA* y *cuiD* (importantes en la resistencia al Cu en presencia de oxígeno) como la de *cueP* (crucial para la tolerancia al Cu en ausencia de oxígeno).

El gen *cueP* es el principal objeto de estudio de esta Tesis, y por lo tanto se hará una descripción detallada de este gen y de su producto.

1.3.3.1. CueP

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

En condiciones aeróbicas, CueP no sería de vital importancia en la resistencia al Cu ya que no se observan diferencias en las medidas de concentración inhibitoria mínima (CIM) para dicho metal respecto a la cepa silvestre (Tabla 1.1). Sin embargo, se hace evidente la ausencia de *cueP* en una mutante en *cuiD*, y la sobreexpresión de CueP aumenta la CIM para Cu de la cepa Δ *cuiD* (Tabla 1.1) aunque no alcanza los niveles resistencia de la cepa silvestre (Pontel y Soncini 2009).

cepa	CIM Cu (mM)			
	+O ₂		-O ₂	
	vector	pCueP	vector	pCueP
Silvestre (14028)	5,50	nd	0,40	nd
$\Delta copA$	4,50	nd	0,30	nd
$\Delta cuiD$	1,25	1,75	0,35	0,40
$\Delta cueP$	5,50	nd	0,20	0,45
$\Delta cuiD \Delta cueP$	1,00	1,75	0,15	0,40
$\Delta golT$	5,50	nd	0,70	nd

Tabla 1.1. Resistencia al Cu en aerobiosis y anaerobiosis en *Salmonella*. Valores de CIM determinados en placas de LB conteniendo cantidades crecientes de CuSO₄ en presencia (+O₂) y ausencia (-O₂) de oxígeno. Como vector de expresión se utilizó el plásmido pUH21-2lac^I y la inducción CueP se produjo por el agregado de IPTG a 0,2 mM de concentración final. Nd: no determinado. Adaptado de Espariz *et al.* 2007 y Pontel y Soncini 2009.

Como se mencionó anteriormente, *Salmonella* Typhimurium puede soportar mayores concentraciones de Cu que cepas de laboratorio de *E. coli* tales como MC4100 y W3110 a pesar de carecer del locus *cus*. En este contexto, CueP cobra un valor crucial en la resistencia al Cu en condiciones anaeróbicas observándose una disminución en la CIM de 0,4 mM CuSO₄ para la cepa silvestre a 0,2 mM CuSO₄ para una cepa mutante $\Delta cueP$ (Tabla 1.1) (Pontel y Soncini 2009). En ausencia de oxígeno, una cepa mutante en *cueP* es más sensible al Cu que una cepa mutante en *copA*, en *cuiD* o en una doble mutante *copA cuiD* con lo cual se reafirma que CueP es requerida principalmente para la resistencia al cobre en anaerobiosis (Pontel y Soncini 2009).

CueP tiene la capacidad de sustituir en forma parcial al sistema *Cus*. Este hecho fue observado cuando se insertó una copia de la fusión CueP-3xFLAG con el promotor nativo de *cueP* que alberga al operador reconocido por CueR reemplazando al sistema *Cus* en el cromosoma de *E. coli* (Pontel y Soncini 2009). Si bien no se recupera totalmente la CIM para Cu exhibida por la cepa silvestre, se recupera algo de la resistencia al metal respecto a la cepa mutante Δcus (Tabla 1.2) (Pontel y Soncini 2009).

Se han identificado marcos abiertos de lectura que codifican para homólogos de CueP en todos los genomas secuenciados de *Salmonella*, *Yersinia*, *Erwinia carotovora*, *Citrobacter koseri*, *Vibrio shilonii* AK1 y *Magnetospirillum magnetotacti*- cum MS-1. Además, los marcos abiertos de lectura que codifican para proteínas tipo CueP se identificaron en los genomas de dos especies de *Shewanella*, aunque con menos del 40% de identidad a nivel de proteínas (Pontel y Soncini 2009).

cepa	CIM Cu (mM)			
	+O ₂		-O ₂	
	vector	pCueP	vector	pCueP
silvestre (W3110)	nd	nd	0,225	0,225
Δcus	nd	nd	0,050	0,125
$\Delta cus cueP::3xFLAG$	nd	nd	0,100	nd
$\Delta cueR$	3,250	3,250	nd	nd
$\Delta cueR \Delta cus$	2,000	3,250	nd	nd

Tabla 1.2. Rol de CueP en la resistencia al Cu en *E. coli*. Valores de CIM determinados en placas de LB conteniendo cantidades crecientes de CuSO₄ en presencia (+O₂) y ausencia (-O₂) de oxígeno. Como vector de expresión se utilizó el plásmido pUH21-2lacI^q y la inducción CueP se produjo por el agregado de IPTG a 0,2 mM de concentración final. Nd: no determinado. Adaptado de Pontel y Soncini 2009.

Interesantemente, también se observó la presencia de genes que codifican para proteínas homólogas a CueP en los genomas de unas pocas especies Gram positivas, incluyendo todas las especies secuenciadas de *Corynebacterium*; *Brevibacterium linens* BL2; *Bacillus* sp. B14905; *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 y *Thermus termophilus* HB27. En la mayoría de estas especies el gen homólogo a *cueP* se encuentra en las proximidades de otros genes que codifican para proteínas implicadas en la resistencia al cobre (Pontel y Soncini 2009). Muchas de las bacterias en las cuales se encontraron homólogos de CueP son patógenas, incluyendo a *Yersinia*, *Citrobacter*, *Erwinia caratovora*, *Corynebacterium*, y *Shewanella*, con lo cual es posible que represente un mecanismo de resistencia al Cu que de alguna manera está adaptado a la virulencia (Osman *et al.* 2010).

Si se analiza la presencia de los componentes conocidos de los dos sistemas principales de resistencia a Cu en Gram negativas, se encuentra que las especies que contienen homólogos de CueP bajo el control de los reguladores de tipo CueR no contienen el locus *cus* o contienen un locus incompleto. Este es el caso de las especies de *Salmonella*, *Erwinia* y *Yersinia*. Esto permitió postular que CueP de *Salmonella* puede reemplazar funcionalmente al sistema Cus de *E. coli* para la resistencia de cobre periplásmico, en particular, en condiciones anaeróbicas.

1.3.3.2. Avances en el estudio de CueP

Durante el transcurso de este trabajo, se reportaron nuevos avances sobre la función fisiológica y las características funcionales y estructurales de CueP; los cuales se detallan a continuación.

La ausencia de un sistema Cus y la presencia de CueP en *S. Typhimurium* sugieren que el transporte de Cu hacia el periplasma por parte de CopA y GolT no contribuye a una reducción en el contenido de Cu celular total sino que es funcional a la relocalización del exceso de Cu en el periplasma. Mediante medidas de Cu total celular por técnicas de ICP-MS se observó que la ausencia simultánea de *copA* y *golT* aumentan sustancialmente el contenido de Cu total en las células; dichas ATPasas participan del transporte del catión desde el citoplasma al espacio periplásmico aunque se desconoce si el eflujo desde el periplasma hacia el exterior celular sugerido por las medidas de ICP-MS es facilitado por algún exportador no identificado y/o como resultado de difusión pasiva (Osman *et al.* 2010). Para determinar si CueP está involucrada en este proceso de secreción del catión se determinó la cantidad de Cu total en una cepa mutante en *cueP* crecida en medio mínimo suplementado con concentraciones no inhibitorias de Cu y se observó que la misma presenta un incremento de aproximadamente 3 veces en el contenido de átomos de Cu por célula, lo cual indica que CueP también puede contribuir a la homeostasis de Cu participando en algún mecanismo que expulsa el exceso del ión metálico hacia el espacio extracelular (Osman *et al.* 2010).

Recientemente, se reportó una nueva función fisiológica para CueP, determinando que la misma posee un rol en el metalado de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa SodCII (Osman *et al.* 2013). Las Cu-Zn superóxido dismutasas son metaloenzimas importantes para proteger a las células de las EROS (Bannister *et al.* 1987). Su localización en el espacio periplasmático sugiere que protege a las bacterias del superóxido extracelular generado por ejemplo por células fagocíticas (Desideri y Falconi 2003) aumentando la virulencia bacteriana (Piddington *et al.* 2001; Gee *et al.* 2005). Teniendo en cuenta que las Cu-Zn superóxido dismutasas también están en microorganismos no patogénicos se propone que tienen funciones que no están directamente relacionadas con la patogénesis como por ejemplo en la detoxificación de anión superóxido generado en el periplasma durante el crecimiento aeróbico (Korshunov y Imlay 2006). Todas las cepas de *Salmonella enterica* poseen

el gen que codifica para SodCII que es ortólogo al gen *sodC* de *E. coli* (Fang *et al.* 1999). Además, muchas cepas virulentas de *Salmonella* poseen un gen que codifica para SodCI, que tiene una mayor tasa de actividad catalítica que SodCII (Ammendola *et al.* 2005). SodCII es un monómero, mientras que SodCI es una proteína dimérica que además de poseer mayor actividad posee mayor estabilidad térmica, mayor afinidad por el metal y mayor resistencia a proteasas (Gabbianelli *et al.* 2004; Battistoni *et al.* 1998). La expresión de SodCII es despreciable tanto en anaerobiosis como dentro de células eucariotas, mientras que la síntesis de SodCI está regulada positivamente en dichas condiciones lo cual se condice con un mayor aporte en la virulencia de SodCI por sobre SodCII (Ammendola *et al.* 2008).

Mediante la examinación de la actividad SOD en las fracciones periplásmicas se observó que una mutante en *cueP* provoca una acumulación de SodCII inactiva cuando se sobreexpresa dicha enzima (Osman *et al.* 2013). Acorde a los resultados de actividad, cuando se llevaron a cabo medidas del contenido metálico de SodCII en una mutante en *cueP*, se evidenció que la proteína presenta iones de Zn unidos pero no de Cu; y la suplementación con un exceso de este último catión en las fracciones que contenían a la enzima restableció la actividad SOD a los niveles observados en las fracciones obtenidas de la cepa silvestre (Osman *et al.* 2013).

Sin embargo, estos resultados solo serían capaces de esclarecer el rol fisiológico de CueP a concentraciones bajas de Cu, donde puede participar como chaperona en el metalado de SodCII, pero no explica el mecanismo de resistencia a altas concentraciones del ión metálico. Aumentando el conocimiento tendiente a entender el mecanismo por el cual CueP confiere resistencia a altas concentraciones de Cu; en el año 2014, se reportó que CueP, específicamente media la reducción de los iones Cu^{2+} usando electrones provenientes de la formación de su puente disulfuro intramolecular y de esta manera es capaz de bloquear la reacción de Fenton mediada por iones Cu en presencia de peróxido de hidrógeno (Yoon, Yeom, *et al.* 2014).

Para corroborar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* de espectroscopia de masas determinando que el agregado de Cu^{2+} promueve la formación de un enlace disulfuro intramolecular entre los residuos de cisteína 96 y 104 a diferencia de la oxidación generada por el O_2 que promueve la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 96 y 172 (Yoon, Yeom, *et al.* 2014). Estudios de reactividad con DTNB y EPR confirman que la estequiometría CueP/ Cu^{2+} es de 1/1 (se requiere de 1 átomo de Cu^{2+} para formar un enlace disulfuro en CueP) y

se sugiere que el Cu^{2+} se reduce a Cu^0 . De esta forma, CueP bloquea la reacción de Fenton *in vitro* depletando los iones Cu^{2+} (Yoon, Yeom, *et al.* 2014). En este escenario, se planteó que CueP podría ser importante para sobrevivir en ambientes ricos en Cu tales como el fagosoma de los macrófagos donde también se estimula la producción de las EROS. Respaldando esta hipótesis, se observó que una cepa mutante en *cueP* presenta una sobrevivida intracelular disminuida en un 60% aproximadamente utilizando como modelo la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7 a las 4 horas post-infección (Yoon, Yeom, *et al.* 2014). Teniendo en cuenta el fenotipo observado en la sobrevivida en macrófagos en la mutante en *cueP*, y relacionándolo a la capacidad de dicha proteína de reducir el Cu^{2+} a Cu^0 vale aclarar que si bien los iones Fe también median la reacción de Fenton en presencia de H_2O_2 , los mismos son secuestrados del fagosoma de los macrófagos para limitar el crecimiento bacteriano; mientras que los iones Cu son transportados a dicho compartimento para incrementar la toxicidad de las EROS y las especies reactivas del nitrógeno (Yoon, Yeom, *et al.* 2014). Mediante el tratamiento con CuCl_2 y H_2O_2 , se observó que la introducción de *cueP* en una cepa de *E. coli* mutante en *cusB* aumenta la sobrevivida frente al estrés oxidativo generado (Yoon, Yeom, *et al.* 2014). Este mecanismo es factible tanto en aerobiosis como en anaerobiosis lo cual podría explicar el fenotipo de una mutante en *cueP* respecto a la toxicidad por Cu en ausencia de oxígeno, que conferiría una ventaja a CueP por sobre CuiD. En presencia de H_2O_2 , el producto de reacción de CuiD (Cu^{2+}), contribuye a la reacción de Fenton, aunque reduce la proporción de radical hidroxilo generado por Cu^{1+} ; sin embargo, en el modelo que proponen Yoon y colaboradores, CueP puede bloquear totalmente la reacción de Fenton convirtiendo los iones Cu en Cu elemental (Yoon, Yeom, *et al.* 2014).

Completando el mecanismo propuesto, se encontró que la disulfuro isomerasa periplasmática DsbC posee un rol crucial en el mantenimiento de CueP en su estado reducido, actuando sobre las cisteínas 104 y 172 (Yoon, Kim, *et al.* 2014). De hecho, el rol protector de CueP frente al tratamiento con Cu y H_2O_2 no es posible si la cepa de *E. coli* es mutante para *dsbC*.

Estas observaciones están respaldadas con la estructura de CueP (Yoon *et al.* 2013). Se determinó que se trata de un dímero con forma de V unido no covalentemente, cuyas cisteínas e histidinas conservadas se encuentran agrupadas sobre un lado del dominio C-terminal, sugiriendo que esta región es importante para

la función de CueP. Dicha caracterización se llevó a cabo por difracción de rayos X y el cálculo de la estructura corresponde a la forma no metalada. La celda unitaria cristalográfica contiene un dímero no covalente de dos dímeros no covalentes asociados entre sí por dos interfaces (Yoon *et al.* 2013). Se propone un sitio de unión a Cu inaccesible al solvente que involucra a la histidina 99 y a las 3 cisteínas (Cys96, Cys104 y Cys172). En la estructura cristalográfica Cys96 y Cys172 forman un puente disulfuro (Yoon *et al.* 2013), aunque los enlaces Cys96-Cys104 y Cys172-Cys104 también pueden formarse dependiendo de las condiciones (Yoon, Yeom, *et al.* 2014; Yoon, Kima, *et al.* 2014). Análisis biofísicos adicionales muestran que CueP une Cu y Zn con buena afinidad y que una mutación en la Cys104, presente en la región rica en cisteínas e histidinas, reduce dramáticamente dicha afinidad, sugiriendo que tal región es responsable de la unión del Cu (Yoon *et al.* 2013). CueP presentaría un equilibrio en su estado de oligomerización más allá de las interacciones no covalente descrita por Yoon y colaboradores, incluyendo uniones de puente disulfuro en una nueva interfase. Dicha interfase involucra rulos conservados, interfiere con la unión de Cu, y contiene residuos críticos para la función de CueP *in vivo* (Abriata *et al.* 2014). La expresión de CueP en *E. coli* en ausencia de Cu seguida de un análisis de SDS-PAGE muestra la presencia de una única banda de 17 kDa correspondiente al monómero. Sin embargo, en condiciones no reductoras se observa un patrón complejo con dos bandas principales a 30-34 kDa, dos bandas a alrededor de 15-17 kDa y otra a 68 kDa, correspondientes a las especies dimérica, monomérica y tetramérica, respectivamente (Abriata *et al.* 2014). En presencia de Cu se observan las mismas especies pero aumentan las bandas correspondientes al monómero y en menor medida al tetrámero y baja la proporción del dímero. Estos resultados sugieren que el estado de oligomerización de CueP incluye la formación de dímeros por puentes disulfuro y que la unión al Cu interfiere en dicho proceso (Abriata *et al.* 2014). La sustitución de la Cys104 y Cys172 por serina (pero no la de la Cys96) disminuye la formación del dímero e impide la formación del tetrámero. Estudios *in vitro* de titulación con Cu de la proteína silvestre como de las mutantes en las cisteínas tanto en sus formas reducidas como oxidadas, muestran que existe un equilibrio complejo que acopla la dimerización con la formación de enlaces disulfuros intra e intercatenarios y con la unión de Cu. Abriata y colaboradores proponen que la dimerización dinámica a través de esta nueva interfase puede acoplar la actividad funcional de CueP con el monitoreo

del estado redox del periplasma, con la transferencia de equivalentes de reducción a través de DsbC, o con el suministro de Cu a SodCII (Abriata *et al.* 2014).

1.3.4. La homeostasis de Cu y su importancia en el curso de una infección

Como se menciona anteriormente, el control de la homeostasis de iones metálicos es crucial para todos los microorganismos y particularmente relevante para microorganismos patógenos durante el curso de su infección (Samanovic *et al.* 2012; Shi *et al.* 2014). Es por esto, que entre las estrategias de defensa del hospedador se encuentran tanto el hambreado por secuestro del ion metálico así como también la toxicidad por la liberación de elevadas concentraciones del metal en algún ambiente donde el patógeno esté confinado (Becker y Skaar 2015).

En el caso particular del Cu, se evidenció que el mismo es un micronutriente esencial, necesario para el buen funcionamiento del sistema inmune del hospedador, observándose una mayor susceptibilidad para las infecciones bacterianas en animales deficientes en dicho micronutriente (Chaturvedi y Henderson 2014). Utilizando la línea de macrófagos RAW264.7, se demostró que ciertos agentes pro-inflamatorios incrementan la expresión del importador de Cu de alta afinidad CTR1 estimulando la adquisición del metal hacia el interior celular (White *et al.* 2009). Este proceso va acompañado por el tráfico del exportador de Cu ATP7A desde el Golgi hacia las vesículas que se fusionan parcialmente con los compartimentos fagosomales. El silenciamiento de la expresión de ATP7A atenúa el efecto tóxico sobre las bacterias, sugiriendo un rol para ATP7A en la actividad bactericida de los macrófagos. En concordancia con lo expuesto, una cepa mutante sensible a cobre de *E. coli* ($\Delta copA$) es hipersensible a la muerte por parte de los macrófagos (White *et al.* 2009).

En el caso de *Salmonella* Typhimurium, utilizando el promotor de *copA*, fusionado al reportero *lacZ* se monitoreó la disponibilidad del ión metálico en las SCV dentro del macrófago revelando que dicho compartimento contiene una elevada concentración de Cu, con lo cual se deduce que la resistencia al metal es de importancia para la sobrevivencia de la bacteria. Esto se correlaciona con una mayor tasa de muerte de una cepa mutante $\Delta copA \Delta golT$ respecto a la cepa silvestre pasadas las 12 horas de infección en macrófagos en cultivo (Osman *et al.* 2010).

Por otra parte, en un modelo de infección murino, no se detectaron diferencias entre la cepa silvestre y la mutante en las bombas que exportan Cu en la carga

bacteriana en el hígado y bazo, sugiriendo que otros determinantes pueden enmascarar el requerimiento de las ATPasas en este modelo (Osman *et al.* 2010). De todas maneras, una cepa mutante de *S. Typhimurium* en la multicobre oxidasa $\Delta cueO$, está atenuada en un modelo murino de infección, recuperando menos bacterias desde el bazo y el hígado respecto a la cepa silvestre, destacando el rol de los mecanismos de resistencia a cobre y la virulencia en este patógeno (Achard *et al.* 2010). Todos estos estudios revelan la importancia de la homeostasis del cobre en *S. Typhimurium* para la virulencia, y sugieren que los diferentes componentes contribuyen en mayor o menor medida en los distintos estadios de la infección.

En el caso de patógenos como *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*, el Cu juega un rol crucial en el control de la enfermedad. Utilizando como modelo conejillos de india, se observa que los mismos responden a una infección con *Mtb* incrementando la concentración de Cu en las lesiones pulmonares (Ward *et al.* 2011). La pérdida del transportador de Cu de la membrana de la bacteria (MtbB) es muy importante en la resistencia al metal y reduce la carga bacteriana entre 1000 y 100 veces en pulmones y nodos linfáticos respectivamente (Shi *et al.* 2014). En ratones, el efecto de dicha mutación en la virulencia de *Mtb* fue exacerbado por la adición de Cu a la dieta, evidenciando que el ión metálico es utilizado por los mamíferos para controlar las infecciones por *Mtb*. Es importante destacar que *Mtb* es muy susceptible al Cu respecto a las otras bacterias, mostrando efectos tóxicos del metal incluso a concentraciones menores a aquellas encontradas en los fagosomas de los macrófagos (Wolschendorf *et al.* 2011).

1.4 Mecanismos no específicos de tolerancia al Cu

Como se mencionó anteriormente, el Cu puede dañar diferentes componentes celulares como consecuencia de su reactividad química o por desplazamiento de metales esenciales de sus sitios de unión. Estos daños pueden ser detectados por sistemas de respuesta al estrés global, como por ejemplo SoxR que está involucrado en la respuesta al estrés oxidativo (Pontel *et al.* 2014). Además, y teniendo en cuenta la importancia de la homeostasis de Cu en el periplasma, se han vinculado a algunos de los sistemas de respuesta a estrés periplásmico globales con el daño producido por el Cu, como es el caso del sistema Cpx (Hobman *et al.* 2007). Finalmente, también se ha vinculado el estrés por Cu con el estado de los puentes disulfuros en las proteínas

del periplasma (Hiniker *et al.* 2005; Shepherd *et al.* 2013). A continuación se describen algunos de los sistemas globales de respuesta a daños en la envoltura que se relacionarán con el estrés por Cu a lo largo de este trabajo.

1.4.1. Sistemas globales de respuesta a estrés periplasmático

En bacterias Gram negativas tales como *Escherichia coli*, la envoltura bacteriana comprende una membrana interna, un espacio periplásmico que contiene la pared celular, una membrana externa y los apéndices bacterianos tales como pili y flagelos (Duguay y Silhavy 2004; Silhavy *et al.* 2010). La envoltura bacteriana está implicada en procesos necesarios que incluyen el transporte de nutrientes, la respiración, la secreción, la adhesión, la virulencia y el mantenimiento de la integridad celular general (Bury-Moné *et al.* 2009).

La envoltura bacteriana constituye la primera línea afectada por la mayoría de las condiciones externas que generan estrés ya sea de naturaleza física (hipertermia, osmolaridad, etc.), química (etanol, pH, detergente, etc.) o biológica (adhesión, infección, etc.). Sus componentes detectan perturbaciones y transmiten señales para inducir la reprogramación transcripcional, que conduce a una respuesta adaptativa (Rowley *et al.* 2006). Se han identificado al menos cinco vías inducidas en respuesta al estrés de la envoltura en *E. coli*, llamadas Bae, Cpx, Psp, Rcs y σ^E (Bury-Moné *et al.* 2009). Hasta la fecha, estas vías se han estudiado principalmente de forma individual, y las interconexiones y/o solapamientos entre ellas no se han caracterizado extensamente. Sin embargo, se conocen dos características importantes de la respuesta al estrés de envoltura en *E. coli*: primero, que un estrés determinado requiere la respuesta combinada de varias vías; y segundo, que cada vía individualmente controla un conjunto discreto de genes implicados en la respuesta y muestra poca superposición con las otras vías (Connolly *et al.* 1997; Leblanc *et al.* 2011) Se propone que un estrés ambiental, probablemente impacta en la envoltura celular mediante la inducción de numerosas alteraciones, cada una de las cuales pueden ser percibidas por diferentes sistemas de respuesta contribuyendo a la adaptación de la célula a diferentes aspectos del daño que genera el estrés (Raivio *et al.* 2013).

Las vías controladas por σ^E y el sistema Psp (del inglés phage shock protein) responden a señales específicas generadas por la acumulación en el periplasma de ciertas proteínas de membrana externa mal plegadas a través del secuestro y

liberación de un factor transcripcional (Bury-Moné *et al.* 2009; Danese y Silhavy 1997).

En el caso de la vía Cpx (del inglés conjugative plasmid expression) y Bae (del inglés bacterial adaptative response) se trata de sistemas regulatorios de dos componentes clásicos (Vogt *et al.* 2010; Appia-Ayme *et al.* 2011). El sistema Rcs (del inglés regulator of colanic acid capsule synthesis) es una vía de señalización compleja de fosfotransferencia que también participa en la respuesta al estrés extracitoplasmático (Laubacher y Ades 2008).

A continuación se describen en mayor detalle los sistemas Cpx y Rcs abordados en gran medida en este trabajo. Finalmente, se hará mención de los sistemas de homeostasis de puentes disulfuro en el periplasma y su relación con el daño por Cu.

1.4.1.1. Sistema Rcs

Los sistemas regulatorios de dos componentes y los sistemas más complejos de fosfotransferencia poseen roles críticos en la regulación de la expresión de genes en todas las bacterias (Buelow y Raivio 2010). En el caso de Rcs, se trata de un sistema de fosfotransferencia cuyos componentes están codificados por genes ubicados en una misma región del genoma ocupando un mismo locus génico. Hasta el presente, se han hallado homólogos a los genes *rcs* exclusivamente en la familia *Enterobacteriaceae*, estando ausente en bacterias endosimbióticas entéricas con genoma de tamaño reducido como *Buchnera spp.* y *Wigglesworthia spp.* (Clarke 2010; Huang *et al.* 2006).

El sistema Rcs fue identificado inicialmente por su rol en la regulación transcripcional de los genes que participan en la síntesis de la cápsula de ácido colánico en *E. coli* codificados en un operón de 19 genes (genes *cps*) (Gottesman y Stout 1991). *fhlDC* es otro operón regulado por este sistema, y codifica para el sistema de regulación maestro responsable de la expresión del flagelo (Francez-Charlot *et al.* 2003). También se hallaron genes involucrados en la producción de estructuras asociadas a la superficie celular como el LPS, fimbrias, y proteínas involucradas en el mantenimiento y/o modificación de la superficie celular bajo control del sistema Rcs (Clarke 2010; Huang *et al.* 2006). Además, regula positivamente la expresión de los genes de división celular *ftsA* y *ftsZ* (Carballès *et al.*

1999), el ARN regulatorio *rprA* (Majdalani *et al.* 2002), y los genes que codifican para la proteína inducible osmóticamente OsmC (Davalos-Garcia *et al.* 2001), para la catalasa KatE , y para la lipoproteína de membrana externa OsmB (Boulangier *et al.* 2005). En *Salmonella*, Rcs regula la expresión de *ugd*, cuyo producto es requerido para la modificación del lípido A del LPS, necesario para promover la resistencia a la acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos (Mouslim *et al.* 2003).

El mecanismo de señalización mediante el cual funciona el sistema de fosfotransferencia Rcs implica, en un primer paso, la activación de la proteína quinasa sensora RcsC que se fosforila en presencia de determinadas señales en el periplasma.

Dicha proteína se localiza en la membrana interna y posee un dominio sensor quinasa clásico y un dominio “receptor”, ambos citoplasmáticos. En el proceso de señalización, RcsC se fosforila en una histidina conservada del dominio histidin quinasa y luego transfiere el fosfato a un residuo de aspartato en el dominio “receptor”. Siguiendo la transducción de la señal, el próximo paso es la fosforilación de la proteína de membrana interna RcsD en un residuo de histidina, que finalmente es capaz de fosforilar al regulador respuesta RcsB en un residuo de aspartato (Figura 1.6) (Chen *et al.* 2001).

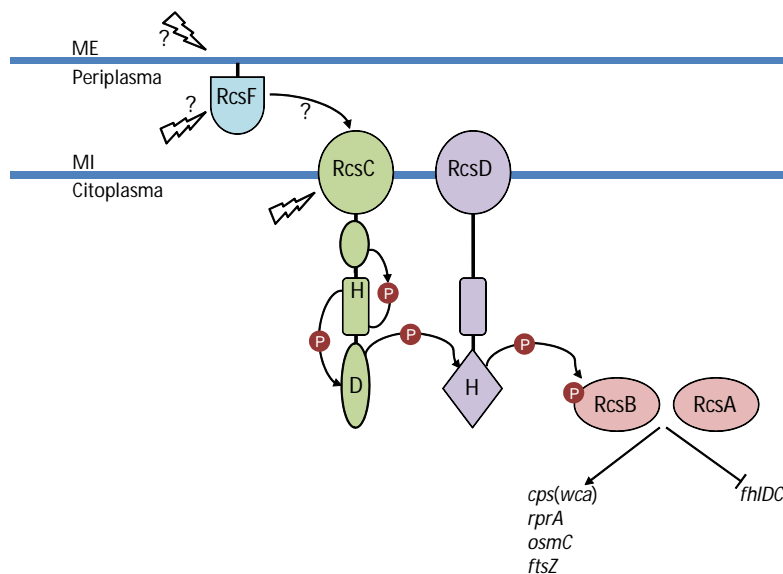


Figura 1.6. Modelo de la vía de transducción de la señal para la regulación de genes dependientes de RcsB/RcsB-RcsA. Se muestra la transferencia del fosfato desde RcsC hasta RcsB. Las flechas dentadas indican las señales percibidas desde fuera de la célula y por perturbaciones en la superficie y periplasma. Adaptado de Majdalani y Gottesman, 2006.

Un componente importante en la señalización del sistema Rcs es la proteína RcsF. Se trata de una lipoproteína anclada a la membrana externa identificada

inicialmente ya que su sobreexpresión conduce a una activación de dicho sistema (Gervais y Drapeau 1992). Análisis genéticos sugieren que RcsF está corriente arriba de RcsC en la cascada de señalización (Shiba *et al.* 2012). RcsF fue identificada como sustrato de DsbA, responsable de la creación de puentes disulfuro en las proteínas del periplasma (Leverrier *et al.* 2011) y en ausencia de DsbA se encuentra totalmente reducida y aún no está claro si este enlace disulfuro es sensible al estado redox del periplasma o si la presencia o ausencia del mismo afecta el estado de señalización de RcsF pero se trata de una posibilidad interesante (Gervais y Drapeau 1992; Kadokura 2004)

Volviendo al último paso de la transducción de la señal, el regulador de respuesta RcsB es una proteína de 24KDa, compuesta por un dominio aceptor D2 ubicado en su extremo N-terminal, y un dominio C-terminal que presenta un motivo de unión al ADN del tipo hélice-giro-hélice (H-T-H) y forma parte de la familia de reguladores transcripcionales del tipo LuxR (Clarke *et al.* 2002). Dicha proteína, puede ejercer su función reguladora uniéndose a las secuencias promotoras de los genes blancos en forma de homodímero. Sin embargo, también se ha reportado que es capaz de formar heterodímeros con proteínas reguladoras auxiliares, principalmente RcsA aunque también con otras como GadE y BglJ (Castanié-Cornet *et al.* 2010; Salscheider *et al.* 2014). Estas proteínas auxiliares también forman parte de la familia de reguladores LuxR que presentan un motivo de unión al ADN del tipo H-T-H en su extremo C-terminal.

Tanto en el caso de la activación de la transcripción de los genes responsables de la síntesis de la cápsula (*cps*) como en la represión del regulador maestro *fhlDC*, RcsA actúa en conjunto con RcsB aunque de forma accesoria. Esto es evidente ya que la sobreexpresión de RcsB es suficiente para activar la expresión de los genes *cps* aún en ausencia de RcsA pero no se detecta expresión en ausencia de RcsB, independientemente de los niveles de RcsA (Brill *et al.* 1988).

El mecanismo de acción propuesto sugiere que RcsB se une como homodímero en sitios inmediatamente corriente arriba de la región -35, probablemente interaccionando con la ARNP para estabilizar su unión y permitir así la formación del complejo abierto y posterior inicio de la transcripción (Johnson *et al.* 2003). En el caso de la represión de la transcripción del gen que codifica para el regulador maestro del flagelo, RcsB en conjunto con RcsA reprimen la expresión del

mismo interaccionando con una región entre las bases +3 y +20 del promotor en cuestión (Francez-Charlot *et al.* 2003).

En cuanto a los estímulos percibidos, la complejidad del sistema Rcs permite la posibilidad de percibir señales en varios puntos de la cascada, afectando la fosforilación o desfosforilación de RcsB, RcsD y RcsC. Las señales podrían también conducir a cambios en los niveles de síntesis de estos reguladores y el nivel de acumulación de RcsA, ya sea incrementando la síntesis o disminuyendo la degradación. Actualmente, la mayor parte del conocimiento concierne a la activación del sistema vía la detección de la señal por parte de RcsC (Wang *et al.* 2011). Se ha observado que la sobreexpresión de la chaperona de membrana DjlA induce la activación del sistema Rcs (Kelley y Georgopoulos 1997), como así también las mutantes *mdoH*, *pgsA* y el locus *rfa* (Shiba *et al.* 2004). MdoH produce los oligosacáridos derivados de membrana, PgsA es requerido para la síntesis de fosfolípidos aniónicos y el locus *rfa* es necesario para la biosíntesis del LPS. Asimismo, mutaciones en los genes para la formación de los puentes disulfuro en el periplasma, particularmente en *dsbA*, también conduce a la activación del sistema Rcs, especialmente en presencia del agente reductor DTT (Lin *et al.* 2009). Se desconoce si tal activación es producida por un efecto generalizado o únicamente por RcsF (Leverrier *et al.* 2011).

La activación del regulón Rcs por mutaciones o sobreexpresiones provee indicios sobre los procesos de señalización pero no identifican los determinantes medioambientales y/o nutricionales que presumiblemente actúan como inductores naturales. Se han identificado distintas condiciones de crecimiento que conducen a la inducción pero se requiere profundizar en el análisis de la vía de detección de señales para entender si todas ellas son aspectos del mismo estrés o si reflejan distintivamente condiciones de activación diferentes (Majdalani *et al.* 2005). Entre las señales de interés, se ha reportado que la desecación induce la transcripción del operón *cps* posiblemente debido a la generación de un estrés osmótico, dicha inducción es dependiente tanto de RcsB como RcsC y la cápsula ayuda a las células a sobrevivir al disecado (Ophir y Gutnick 1994). Pruebas directas de *shock* osmótico confirman que ésta es una señal inductora transitoria dependiente de RcsC (Gottesman 1996). Las temperaturas bajas combinado con altos niveles de cinc también inducen la vía de señalización dependiente de RcsC y RcsF (Hagiwara *et al.* 2003). La clorpromacina, una molécula catiónica anfipática que puede insertarse en la bicapa lipídica y se

piensa que perturba la curvatura de las membranas de la misma forma que lo hace el estrés osmótico, también es capaz de activar el sistema (Stout y Gottesman 1990).

Si bien se ha descrito que la cápsula es importante para la supervivencia de la bacteria frente a condiciones ambientales adversas (deseccación, shock osmótico, etc.), también se ha reportado que cumple un importante rol en la patogénesis de las bacterias que la expresan. En *Salmonella* y *Klebsiella*, el sistema Rcs regula la expresión de la cápsula tipo I, que protege a estas bacterias de la acción del sistema inmune del hospedador (Majdalani y Gottesman 2005). Por su parte, en *Erwinia amylovora*, Rcs regula la expresión del exopolisacárido amilovorán, necesario para que este fitopatógeno colonice el xilema de la planta y establezca la infección (Kelm *et al.* 1997).

Rcs participa en la regulación de la virulencia de las enterobacterias, ya que controla la expresión de genes implicados en los procesos patogénicos de las mismas. Se ha reportado que en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, el sistema Rcs interviene en la regulación de algunos de los genes de la SPI-1 y que se induce en condiciones que mimetizan el interior de una célula invadida por *Salmonella* durante el crecimiento intracelular (Arricau *et al.* 1998; Erickson y Detweiler 2006). En otros estudios se demostró que mutantes nulas en la quinasa *rscC* presentan un fenotipo atenuado en la infección sistémica en un modelo de ratón (Detweiler *et al.* 2003). Sin embargo, una mutante con activación constitutiva del sistema Rcs de *Salmonella* también presenta una disminución de su capacidad de infección a ratones tanto por vía oral como intraperitoneal, sugiriendo que posiblemente un exceso en la producción de la cápsula intervendría con el proceso de fagocitosis mediada por los macrófagos (Mouslim *et al.* 2004). Esto demuestra que el sistema Rcs juega un rol importante en la regulación temporal de la virulencia de *Salmonella*, ya que una inapropiada activación o represión de determinados genes lleva a un fenotipo virulento atenuado en esta bacteria (Clarke 2010).

En *Yersinia enterocolitica*, el sistema Rcs regula positivamente la expresión del sistema de secreción tipo III Ysa, necesario para la colonización de la porción terminal del intestino delgado en ratones (Walker y Miller 2009). También regula la expresión del sistema de secreción tipo III en *E. coli* enterohemorrágica (Tobe *et al.* 2005).

Por otra parte, se vincula al sistema Rcs con el desarrollo de biopelículas. La regulación negativa de *fhlDC* concuerda con una variedad de otras evidencias que se

relacionan a una menor movilidad bajo condiciones que inducen la síntesis de los genes *cps*. Una posibilidad atractiva es que los genes regulados por el sistema Rcs tengan un rol en determinar el momento apropiado del desarrollo de biopelículas (Majdalani y Gottesman 2005). La producción de exopolisacáridos por parte de los genes *cps* es crucial para el desarrollo de biopelículas, lo que sugiere que el sistema Rcs posee un rol en los estadios tardíos en el desarrollo de las mismas, luego de la unión a la superficie sólida e importante en la estructura tridimensional final (Danese *et al.* 2000). De hecho, en estadios tempranos se requiere del flagelo y otros apéndices de la superficie; estos genes están negativamente regulados por el sistema Rcs y los apéndices pueden ser enmascarados por la cápsula una vez inducida (Francez-Charlot *et al.* 2003). Tanto en *E. coli* como en *Salmonella* se encontró que el sistema Rcs es importante en la regulación de la motilidad tipo *swarming* (Takeda *et al.* 2001), frecuentemente utilizada como un paso temprano en la formación de las biopelícula (Stoodley *et al.* 2002).

De acuerdo al gran número y diversidad de genes regulados por el sistema Rcs, podría designarse al mismo como una red regulatoria global, que controla diversos procesos celulares, tales como división celular, síntesis de exopolisacáridos, biogénesis flagelar y mecanismos de virulencia.

1.4.1.2. Sistema Cpx

El sistema de regulación de dos componentes Cpx modula la expresión de genes en respuesta al estrés periplasmático (Pogliano *et al.* 1997). Está compuesto CpxA, una 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 tales como el pH alcalino a neutro, la sobre-expresión de NlpE, subunidades P del pilus y otras proteínas de la envoltura, 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 Cu y Zn también activan el sistema por mecanismos que aún no han 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 2014). Los primeros miembros descritos del regulón Cpx codifican para proteínas involucradas en el plegamiento o la degradación de proteínas en la envoltura celular como *degP*, una serina

endoproteasa periplasmática; la disulfuro oxidoreductasa *dsbA*; y *ppiA*, una peptidil isomerasa A periplasmática (Pogliano *et al.* 1997; Danese y Silhavy 1997). Posteriormente, otros estudios condujeron a la identificación de otros miembros del regulón que pueden ser activados o reprimidos por el sistema 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 *et al.* 2007; De Wulf *et al.* 1999; De Wulf *et al.* 2002; Yamamoto y Ishihama 2006).

La detección de las señales por parte de este sistema no se restringe únicamente al componente sensor, pudiendo involucrar incluso a diferentes dominios de la histidina quinasa, sino también al regulador de respuesta o proteínas accesorias (Buelow y Raivio 2010). En el caso del sistema Cpx en *E. coli*, al menos cuatro proteínas en diferentes compartimentos celulares (Figura 1.7) 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 (Raivio 2014).

NlpE se identificó por primera vez como un supresor de la toxicidad de la proteína de fusión de la envoltura LamB-LacZ-PhoA, y su expresión está regulada por CpxR (Snyder *et al.* 1995; Danese y Silhavy 1997). En el año 2002, se demostró 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 el pH alcalino o el estrés generado por la sobre-expresión de la subunidad 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 motivo de discusión.

La proteína periplasmática CpxP inhibe la actividad de la vía Cpx cuando se sobre-expresa, probablemente por interacción directa con el dominio periplasmático de CpxA. La observación de que la presencia de proteínas mal plegadas en el periplasma activa el sistema Cpx de manera dependiente de CpxP ha llevado a proponer que las proteínas no nativas secuestran CpxP impidiendo su unión a CpxA y

en consecuencia la quinasa se activa (DiGiuseppe y Silhavy 2003; Isaac *et al.* 2005). Sin embargo, el papel de CpxP en la señalización es poco conocido. De hecho, mutantes en *cpxP* conservan su capacidad de detectar señales tales como la sobre-expresión de NlpE, el pH alcalino, la sobre-expresión de PapE y PapG, y otros tipos de estrés (DiGiuseppe y Silhavy 2003; Raivio *et al.* 1999).

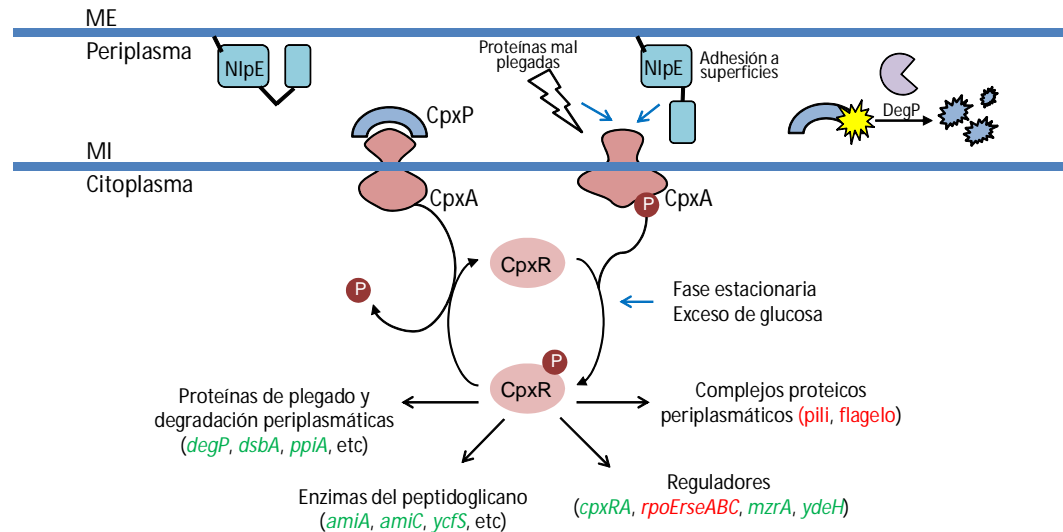


Figura 1.7. Descripción general de la vía de Cpx en *Escherichia coli*. En condiciones no inductoras (lado izquierdo del diagrama), la histidina quinasa de membrana interna (MI) CpxA actúa como una fosfatasa del regulador de respuesta CpxR, manteniéndolo desfosforilado y por lo tanto inactivo. CpxP inhibe la activación de CpxA, posiblemente a través de una interacción directa. Las señales inductoras entran en la vía en varios puntos (indicados por las flechas azules): la adhesión a la superficie es detectada por la lipoproteína de membrana externa (ME) NlpE; proteínas periplasmáticas mal plegadas pueden ser detectados directamente por CpxP; y señales metabólicas o fases de crecimiento son detectadas por CpxR. Bajo condiciones inductoras (lado derecho del diagrama), CpxP es degradada por DegP, CpxA actúa como un autoquinasa y fosforila a CpxR, que fosforilado se une al ADN para regular la transcripción. Los genes regulados positivamente por CpxR-P (indicado por el texto en verde) son los que codifican para proteínas plegado y degradación periplasmática; enzimas metabólicas de pared celular y algunos reguladores. Los genes reprimidos por CpxR-P (indicadas por el texto en rojo) incluyen los complejos proteicos del periplasma y reguladores. Adaptado de Vogt y Raivio, 2011.

El dominio periplasmático de la histidina quinasa CpxA, si bien actúa como sensor de algunas señales como pH alcalino y la sobre-expresión de PapE y PapG, es también el punto de integración de señales detectadas a través de NlpE y de CpxP (Raivio *et al.* 1999; Raivio y Silhavy 1997; DiGiuseppe y Silhavy 2003). 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 transducida a través de la membrana interna al dominio quinasa que lleva a cabo la transferencia de un grupo fosfato al regulador de respuesta CpxR (Fleischer *et al.* 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 *et al.* 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, tales como la glucosa y el piruvato (Wolfe *et al.* 2008). Se postula que esta activación está mediada por la vía Pta-ackA, que genera acetil fosfato a partir de acetil-CoA (Wolfe *et al.* 2008). De hecho, el acetil fosfato puede fosforilar CpxR *in vitro* y, bajo determinadas condiciones de crecimiento, *in vivo* (Lima *et al.* 2011; Pogliano *et al.* 1997; Raivio y Silhavy 1997; Wolfe *et al.* 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 CpxAR 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 para CpxR, previamente determinado como GTAAA-N₄₋₈-GTAAA (Yamamoto y Ishihama 2006), no influyen en la regulación. Sin embargo, la ubicación del sitio de unión de CpxR, sí 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 de 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-N₄₋₈-GTAAA, mientras que la otra mitad tienen sitios de unión CpxR orientadas en la orientación inversa, TTTAC-N₄₋₈-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 tampoco parece ser predictivo (Price y Raivio 2009).

En la mayoría de los casos, CpxR actúa en conjunto con otros reguladores para controlar la expresión de los genes. 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 (Batchelor *et al.* 2005; Hirakawa *et al.* 2005). En ausencia del regulador principal de *acrD* y *mdtA*, BaeR o de *ompC*, OmpR, CpxR es

incapaz de activar la transcripción de estos genes. Estos resultados indican que CpxR actúa en conjunto con el activador principal para intensificar la transcripción (Hirakawa *et al.* 2005). Ensayos de protección a la digestión por ADNasaI sobre estos genes, indican que CpxR se une 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* (Dorel *et al.* 2006). CpxR se une cooperativamente a múltiples sitios de la región promotora de *csgB* y *csgF* (Ogasawara *et al.* 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 ARNP o genera una perturbación en la unión de OmpR (Ogasawara *et al.* 2010). Para el caso de *ompF*, los ensayos de protección a la digestión por ADNasaI 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 en *E. coli*, que una mutante delecionada en el operón *cpxRA*, es más sensible al Cu y al Zn que la cepa silvestre (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 *yqiA*, la mayoría de función desconocida) en presencia de Cu y que esta activación depende de CpxAR (Yamamoto *et al.* 2005; Yamamoto y Ishihama 2006; Yamamoto y Ishihama 2005; Pogliano *et al.* 1997). Por otro lado, la observación de que una mutante de *E. coli* deficiente en NlpE es más sensible a Cu que la cepa silvestre y que el dominio N-terminal de NlpE contiene un motivo CXXC, característico de proteínas de unión a Cu sugiere que esta proteína podría estar implicada en la activación del sistema Cpx en presencia de Cu (Gupta *et al.* 1995; Robinson 2010; Hirano *et al.* 2007). Por otra 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 *et al.* 2005).

En cuanto a la relación entre el sistema Cpx y la infección, se ha descrito que el regulón está implicado en la virulencia de varias especies de bacterias patógenas. En *Shigella flexneri*, se ha visto que CpxA está involucrada en la regulación dependiente de pH de *virF*, un regulador positivo de los genes de invasión *ipaBCD* (Nakayama *et al.* 2003). Del mismo modo, en *Salmonella Typhimurium*, también se vio que el sistema Cpx está involucrado en la regulación dependiente de pH del regulador positivo de genes de invasión HilA (Nakayama *et al.* 2003). Además, DsbA (cuya expresión está regulada por CpxR) es requerida para el plegado y la secreción de las proteínas IpaBCD por parte de *S. flexneri* y para otros factores de virulencia tales como la enterotoxina producida por *Vibrio cholerae* (Humphreys *et al.* 2004).

Para evaluar la participación del sistema Cpx de *Salmonella Typhimurium* en la entrada y replicación dentro de células eucariotas, se hicieron ensayos de invasión y persistencia en macrófagos y en células epiteliales con mutantes $\Delta cpxR$, $\Delta cpxA$ y *cpxA**; esta última mantiene la activación del sistema de forma constitutiva (De Wulf y Lin 2000). Las mutantes $\Delta cpxR$ y $\Delta cpxA$ invadieron los macrófagos de igual forma que la cepa silvestre mientras que la cepa mutante *cpxA** fue significativamente menos invasiva. A las 24 horas post-infección, el número de bacterias intracelulares se incrementó, indicando que en ninguna de las mutaciones en Cpx se vio afectada la sobrevivencia o replicación intracelular (utilizando células epiteliales HEP2 o Caco-2 se obtuvieron resultados similares) (Humphreys *et al.* 2004). Los mismos estudios llevados a cabo con moléculas que previenen la internalización celular sugieren que es la adhesión a las células eucariotas y el ingreso a las mismas lo que está afectado principalmente en la mutante *cpxA**. Alternativamente, mediante ensayos de competencia se evaluó la capacidad de las mutantes $\Delta cpxR$, $\Delta cpxA$ y *cpxA** para competir con la cepa silvestre en el crecimiento en tejidos murinos. Nuevamente, la cepa $\Delta cpxR$ no se vio afectada respecto a la parental silvestre mientras que sí se evidenció una disminución significativa en el recuento para las mutantes $\Delta cpxA$ y *cpxA**, siendo esta última la más afectada (Humphreys *et al.* 2004).

Para investigar si las mutaciones en Cpx afectan la habilidad de *S. Typhimurium* de infectar ratones oralmente por la vía natural de infección, se

determinaron el número de unidades formadoras de colonias (CFU), en diferentes tejidos post-infección. Nuevamente, no hubo diferencias significativas entre la cepa $\Delta cpxR$ y la parental silvestre pero ambas fueron más virulentas q la mutante $\Delta cpxA$ que a su vez fue más virulenta que la cepa $cpxA^*$ (Humphreys *et al.* 2004). Es esperable que la mutante $cpxA^*$ tenga un exceso de CpxR fosforilado (CpxR-P); por lo tanto, la virulencia pareciera correlacionarse inversamente con los niveles de CpxR-P. Si este es el caso, entonces CpxR-P podría estar regulando negativamente genes que son importantes para la infección de ratones o bien, podría regular positivamente genes que interfieren con los procesos de infección (Humphreys *et al.* 2004).

1.4.2. Homeostasis de puentes disulfuro en el periplasma y daño por Cu

Entre los sistemas que participan indirectamente en la tolerancia al Cu se encuentran aquellos que tienden a mantener los puentes disulfuros de las proteínas periplasmáticas en sus estados nativos ya que el Cu tiene la capacidad de generar daño catalizando la formación de puentes disulfuros incorrectos en las proteínas (Hiniker *et al.* 2005). La mayoría de las proteínas periplásmicas contienen al menos 2 residuos de cisteínas, y muchas son estables y activas solo cuando estas cisteínas forman su correspondiente puente disulfuro nativo (Heras *et al.* 2010). En *Escherichia coli*, una familia de tiol-disulfuro oxido-reductasas asegura que las poteínas periplásmicas y secretadas formen los puentes disulfuros correctos. DsbA es la principal disulfuro oxidoreductasa en el periplasma y su mecanismo de acción consiste en donar rápidamente su enlace disulfuro de forma directa a las proteínas sustrato oxidándolas (Kadokura 2004). Se considera que DsbA actúa de una forma relativamente inespecífica uniendo cualesquiera dos cisteínas próximas entre sí (Hiniker *et al.* 2005). Para completar el ciclo y tendiente a mantener a la proteína DsbA funcional, la misma es reoxidada por DsbB; la cual es una proteína de membrana interna con dos rulos periplásmicos, cada uno de los cuales posee un par de residuos de cisteína (Lin *et al.* 2009). Mutantes en *dsbA* o *dsbB* exhiben fenotipos pleiotrópicos, debidos por ejemplo, al ensamblado incorrecto del flagelo que conlleva a una movilidad bacteriana reducida. En varios patógenos, mutantes en *dsbA* presentan una disminución en la virulencia debido a que factores como el pili, toxinas y sistemas de

secreción tipo III requieren de los enlaces disulfuros apropiados para funcionar correctamente (Lin *et al.* 2009).

Por otra parte, las bacterias cuentan con la proteína DsbC que es la principal isomerasa de disulfuros que probablemente corrige los enlaces incorrectos generados en las proteínas del periplasma (Hiniker *et al.* 2005). Dada la dependencia que existe entre la función de una proteína y la formación de sus puentes disulfuros correctos, es sorprendente que una cepa mutante para *dsbC* no presente ningún fenotipo fácilmente detectable. Sin embargo, se ha demostrado que mutaciones en la vía entera de isomerización de los puentes disulfuros dependiente de DsbC, causa un incremento en la sensibilidad al Cu. Debido a su actividad redox, estos iones metálicos pueden catalizar la formación de enlaces disulfuros periplasmáticos bajo condiciones aeróbicas, sugiriendo que la sensibilidad de la cepa mutante en *dsbC* al metal surge de la incapacidad de la célula para reorganizar los puentes disulfuros no nativos generados en esta condición (Hiniker *et al.* 2005).

El sistema de formación de puentes disulfuro está mayormente caracterizado en *E. coli* y se puede considerar que está compuesto de dos vías: una vía oxidante, que incluye las proteínas DsbA y DsbB y una vía de isomerización que utiliza las proteínas DsbC, DsbG, DipZ (DsbD) y TrxA (Bouwman *et al.* 2003).

Algunas bacterias Gram negativas producen parálogos de DsbA y/o DsbB que suplementan o reemplazan la actividad de DsbA y DsbB. Por ejemplo, el plásmido de virulencia de *Salmonella enterica*, codifica para SrgA, que es una proteína paróloga a DsbA cuya actividad es dependiente de DsbB (Bouwman *et al.* 2003). Se sugiere que SrgA es más específica para los sustratos que DsbA y que su actividad de disulfuro oxidoreductasa es necesaria para la producción de las fimbrias codificadas por el plásmido (Bouwman *et al.* 2003). Asimismo, *Salmonella Typhimurium* también codifica para proteínas parálogas del par DsbA/DsbB. Se trata de las proteínas DsbL y DsbI que funcionan como un par redox contribuyendo a la formación de enlaces disulfuro en el periplasma (Grimshaw *et al.* 2008).

Finalmente, se han identificado distintos clones de una biblioteca genómica de *Salmonella Typhimurium* capaces de suprimir el fenotipo sensible a Cu de la cepa mutante de *E. coli cutF*. El análisis de la secuencia de uno de estos clones revela la presencia de 4 marcos abiertos de lectura organizados en dos operones. Uno de ellos consiste en un único gen, *scsA*; mientras que el otro contiene 3 genes, *scsB*, *scsC* y *scsD*. Estos genes fueron denominados como *scs* debido a que son capaces de

suprimir el fenotipo sensible al Cu (del inglés *suppression of copper sensitivity*). La comparación de la secuencia aminoacídica de estos genes muestra que *scsB*, *scsC*, y *scsD* presentan una homología significativa con las proteínas de intercambio de tio-disulfuros (CutA2, DipZ, CysZ, y DsbD) de *E. coli*, a una proteína de membrana externa (Com1) de *Coxiella burnetii*, y a proteínas tioredoxinas, respectivamente. Análisis de complementación indican que las 4 proteínas son requeridas para el incremento en la tolerancia al Cu de la cepa mutante de *E. coli cutF* (Gupta *et al.* 1997).

Se ha reportado que mutaciones o tratamientos que interfieren con la formación de puentes disulfuro en el periplasma están entre las señales que activan el sistema Rcs. Efectivamente, la cepa doble mutante *dsbA srgA* es mucoide debido a la activación vía Rcs de los genes *cps* que participan de la síntesis de la cápsula de ácido colánico (Lin *et al.* 2008; Grimshaw *et al.* 2008).

En este trabajo de Tesis se abordará la homeostasis de Cu en *Salmonella Typhimurium* haciendo hincapié en la proteína CueP, miembro del regulón Cue de detoxificación directa de Cu. Se evaluará su regulación transcripcional y su rol fisiológico, vinculándola además a sistemas de respuesta a estrés periplasmático relacionados al daño por Cu como los sistemas Cpx y Rcs

2. Objetivos

En este trabajo de Tesis, nos propusimos como Objetivo General avanzar en el estudio de la regulación de la expresión de *cueP* y en el entendimiento de su rol en el mantenimiento de la homeostasis de Cu de *Salmonella* Typhimurium. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la participación de otros sistemas de regulación para modular la expresión de *cueP*, analizando tanto aspectos mecanísticos del proceso de transcripción como también la relevancia fisiológica de la regulación en relación a la homeostasis del Cu.
- Evaluar la relación entre la homeostasis del Cu y el sistema de respuesta a estrés de la envoltura celular Rcs, analizando la participación de CueP.
- Evaluar posibles mecanismos de acción llevados a cabo por CueP para el mantenimiento de la homeostasis periplasmática de Cu en *Salmonella*.

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 ADNasaI 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y se guardaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 3.1. Cepas utilizadas

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F-Z-(tp8O <i>lacZ</i> AM15) <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>hsdR17</i> <i>relA1</i> (<i>lacZYA-argF</i>)U169	(Sambrook <i>et al.</i> 1989)
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F', <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacIq</i> , <i>lacZ</i> , Δ ::Tn10(Tet ^R)]	Stratagene
M15 [pREP4]	F-, Φ 80 Δ <i>lacM15</i> , <i>thi</i> , <i>lac</i> -, <i>mtl</i> -, <i>recA</i> ⁺ , Km ^R	Qiagen
<i>Salmonella Typhimurium</i>		
14028	Silvestre	(Fields <i>et al.</i> 1986)
7065 (LB5010)	<i>metA22</i> <i>metE551</i> <i>trpD2</i> <i>ilv</i> ⁻ 452 <i>leu</i> ⁻ <i>pro</i> ⁻ <i>hsdSA29</i> <i>hsdB</i> ⁻ <i>strA120</i> <i>galE</i> ⁻	(Bullas y Ryu 1983)
PB3167	<i>cuiD</i> ::MudJ-Km ^R	(Checa <i>et al.</i> 2007)
PB3743	<i>rcaA</i> ::Tn10-Tet ^R	(Costa y Antón 2001)
PB3844	<i>wcaJ</i> ::MudJ	(Costa y Antón 2001)
PB5292	<i>copA</i> :: <i>lacZY</i> ⁺	(Checa <i>et al.</i> 2007)

Continuación Tabla 3.1

PB5449	$\Delta cueR$	(Espariz <i>et al.</i> 2007)
PB5948	$P_{cueP}::lacZ-Cm^R$	(Pontel y Soncini 2009)
PB5949	$\Delta cueR cueP::lacZ-Cm^R$	(Pontel y Soncini 2009)
PB6028	$cueP::3xFLAG-Km^R$	(Pontel y Soncini 2009)
PB6127	$\Delta cueP::Cm^R$	(Pontel y Soncini 2009)
PB7210	$\Delta rcsD::Cm^R$	(Pescaretti <i>et al.</i> 2010)
PB7211	$\Delta rcsB::Cm^R$	(Pescaretti <i>et al.</i> 2010)
PB7212	$\Delta rcsC::Cm^R$	(Pescaretti <i>et al.</i> 2009)
PB7887	$cuiD::Cm^R$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB7937	$\Delta cuiD$	(Pontel y Soncini 2009)
PB8057	$\Delta dsbA::Cm^R$	Colección del laboratorio
PB8214	$P_{cueP}::lacZ$	Este trabajo
PB8335	$rcsA::Tn10-Tet^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB8363	$wcaJ::MudJ \Delta dsbA$	Colección del laboratorio
PB8385	$wcaJ::MudJ \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB8582	$\Delta rcsF::Cm^R$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB8720	$\Delta rcsF::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB8742	$\Delta rcsB::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB8743	$\Delta rcsC::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB8744	$\Delta rcsD::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB9342	$wcaJ::MudJ rcsA::Tn10-Tet^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB9343	$wcaJ::MudJ \Delta rcsB::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB9344	$wcaJ::MudJ \Delta rcsC::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB9345	$wcaJ::MudJ \Delta rcsD::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB9346	$wcaJ::MudJ \Delta rcsF::Cm^R \Delta cuiD$	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
PB9408	$\Delta scsA::Cm^R$	Este trabajo

Continuación Tabla 3.1

PB9409	$\Delta scsBCD::Cm^R$	Este trabajo
PB9410	$\Delta dsbC::Cm^R$	Este trabajo
PB9411	$\Delta srgA::Cm^R$	Este trabajo
PB9434	$wcaJ::MudJ \Delta scsA::Cm^R$	Este trabajo
PB9435	$wcaJ::MudJ \Delta scsBCD::Cm^R$	Este trabajo
PB9436	$wcaJ::MudJ \Delta dsbC::Cm^R$	Este trabajo
PB9437	$wcaJ::MudJ \Delta srgA::Cm^R$	Este trabajo
PB9438	$wcaJ::MudJ \Delta dsbA \Delta scsA::Cm^R$	Este trabajo
PB9439	$wcaJ::MudJ \Delta dsbA \Delta scsBCD::Cm^R$	Este trabajo
PB9440	$wcaJ::MudJ \Delta dsbA \Delta dsbC::Cm^R$	Este trabajo
PB9441	$wcaJ::MudJ \Delta dsbA \Delta srgA::Cm^R$	Este trabajo
PB9559	$wcaJ::MudJ \Delta dsbA \Delta srgA \Delta cueP::Cm^R$	Este trabajo
PB9833	$PcueP::lacZ PcueP::Cm$	Este trabajo
PB9636	$PcueP::lacZ-Cm^R \Delta$ caja ácida	Este trabajo
PB9958	$PcueP::lacZ$ caja $cpxR^*-Cm^R$	Este trabajo
PB9996	$\Delta hfq::Cm^R cueQ::lacZ$ (transcrpcional)	Colección del laboratorio
PB10009	$PcueP::lacZ-Cm^R$ constitutivo	Este trabajo
PB10010	$\Delta cpxR PcueP::lacZ-Cm^R$ constitutivo	Este trabajo
PB10029	$\Delta cueR::Km^R \Delta cpxR PcueP::lacZ-Cm^R$	Este trabajo
PB10123	$\Delta cpxR PcueP::lacZ-Cm^R$	Este trabajo
PB10289	$PcueP::lacZ -10copA::Cm^R$	Este trabajo
PB10290	$\Delta cpxR PcueP::lacZ -10copA::Cm^R$	Este trabajo
PB10293	$PcueP::lacZ -10cuiD::Cm^R$	Este trabajo
PB10294	$\Delta cpxR PcueP::lacZ -10cuiD::Cm^R$	Este trabajo
PB10326	$\Delta cpxR::Cm^R cueP::3xFLAG- Km^R$	Este trabajo
PB10399	$\Delta cueR cueP::3xFLAG-Km^R$	Este trabajo

Continuación Tabla 3.1

PB10400	$\Delta cueR \Delta cpxR cueP::3xFLAG- Km^R$	Este trabajo
PB10423	$\Delta cueR::Km^R \Delta cpxR PcueP::lacZ-Cm^R$ constitutive	Este trabajo
PB10424	$\Delta cueR::Km^R PcueP::lacZ::Cm^R$ constitutivo	Este trabajo
PB10569	Δhfq	Colección del laboratorio
PB10612	$sodCI::3xFLAG-Km^R$	Este trabajo
PB10613	$\Delta cpxR sodCI::3xFLAG-Km^R$	Este trabajo
PB10616	$sodCII::3xFLAG-Km^R$	Este trabajo
PB10617	$\Delta cpxR sodCII::3xFLAG-Km^R$	Este trabajo
PB10620	$cueQ::lacZ-Cm^R$ (traduccional)	Este trabajo
PB10622	$\Delta hfq cueQ::lacZ-Cm^R$ (traduccional)	Este trabajo
PB10864	$cpxP::lacZ$	Este trabajo
PB11177	$\Delta STnc780$	Este trabajo
PB11450	$\Delta cpxR::Cm^R cpxP::lacZ$	Colección del laboratorio
PB11609	$PcopAcueP$	Este trabajo
PB11671	$\Delta golTSB \Delta copA \Delta cuiD \Delta cueP::Cm^R$	Este trabajo
PB11672	$\Delta golTSB \Delta copA \Delta cuiD$ $PcopAcueP::Cm^R$	Este trabajo
PB11673	$\Delta golTSB \Delta copA \Delta cuiD$	Este trabajo

Tabla 3.2. Plásmidos utilizados

Plásmido	Propiedades relevantes	Referencia
pCP20	flp, Amp^R	(Cherepanov y Wackernagel 1995)
pJB20	$lacZ$ clonado en $BstBI$ del plásmido pKD3	(Beaber <i>et al.</i> 2002)
pKD3	Ori R6K, Cm^R, Amp^R	(Datsenko y Wanner 2000)

Continuación Tabla 3.2

pKD4	Ori R6K, Km ^R , Amp ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD46	P _{araB-γ-β-exo} , Amp ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pMC1871	pBR322. Tet ^R , <i>lacI</i>	Amersham Pharmacia
pQE32	Ori ColE1, Amp ^R , P _{T5-lac} , N-His	Qiagen
pSUB11	Ori R6K, 3xFLAG, Km ^R	(Uzzau <i>et al.</i> 2001)
pUHE21-2 <i>lacI</i> ^q	reppMB1 Amp ^R <i>lacI</i> ^q	(Soncini <i>et al.</i> 1995)
pPB1205	pUH:: <i>cueR</i>	(Espariz <i>et al.</i> 2007)
pPB1257	pUH:: <i>cueP</i>	(Pontel y Soncini 2009)
pPB1315	pUH:: <i>cuiD</i>	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
pPB1335	pUH:: <i>cuePQ</i>	Este trabajo
pPB1413	pBBR1-MCS1:: <i>mcherry</i>	Colección del laboratorio
pPB1466	pUH:: <i>cpxR</i>	Este trabajo
pPB1467	pQE32:: <i>cpxR</i>	Este trabajo
pPB1468	pUH:: <i>cpxAR</i>	Este trabajo
pPB1469	pUH:: <i>STnc780</i>	Este trabajo
pPB1470	pMC1871:: <i>PcueP-170</i>	Este trabajo
pPB1471	pMC1871:: <i>PcueP-135</i>	Este trabajo
pPB1472	pMC1871:: <i>PcueP-80</i>	Este trabajo
pPB1473	pMC1871:: <i>PcueP-45</i>	Este trabajo
pPB1474	pBBR1-MCS2:: <i>gfpmut3.1</i>	(Fedrigo <i>et al.</i> 2011)

Tabla 3.3. Oligonucleótidos utilizados

cpxR BamHI F	ACGGGATCCATATGAATAAAATCCTGTTAG	Este trabajo
cpxR HindIII Rv	AGCAAGCTTTCATGAAGCGGAAACCATC	Este trabajo
cpxA Rv HindIII	AGCAAGCTTTTAGGTTGCTTGTAC	Este trabajo
cueP prext Rv	TCTGAGGATGCCGCAAGCGCGGAGCC	(Pontel y Soncini 2009)
cueP fwd ft prin	GCATTTTGAATCCCTGCCTGATGG	(Pontel y Soncini 2009)
P1 Rv	CGAAGCAGCTCCAGCCTACAC	Colección del Laboratorio
P1CueP constitutivo	GTCCCTTTGACCTCCCTTAGGGGAACCCCTATAGTAGGCAGGGAGATTGT TCACAAGGAATTGAAGTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Este trabajo
P2CueP constitutivo	TATAGGCCCGATAACCCATTATGTTATCGGGCATTTCATATGAATATCC TCCTTA	Este trabajo
cpxR P1 Fwd	CCTGATGACGTAATTTCTGCCTCGGAGGTACGTAAACAGTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG	Este trabajo
cpxR int P2 Rv	CGGCGTCAGGCGCTTACCCAGCACTTCCTGACTTAAATGCATATGAATAT CCTCCTTA	Este trabajo
cpxR P2 Rv	CCAGAAGATGGCGAAGATGCGCGCGGTAAACTTCCTACATATGAATATC CTCCTTA	Este trabajo
P1 sitio CpxR	CTGATGGCGGGGATTTTTTTTATTCCAATTCCCCCTCGTGTAGGCTGGAG CTGCTTCG	Este trabajo
P2 Cpx wt	GGACGCAGGGTAAAGTAATGCAAAGTTATGCTGGGGGACATATGAATAT CCTCCTTA	Este trabajo

Continuación Tabla 3.3

P2-CpxMut-kpn-Rv	GGACGCAGGCACTAGTAATCCATGGTTATGCTGGGGGACATATGAATATC CTCCTTA	Este trabajo
CpxMut-kpn F	TCCCCCAGCATAACCATGGATTACTAGTGCCTGCGTCC	Este trabajo
P-int-cueP-Rv	ACTTCAATTCCTTGTGAACAATC	(Pontel y Soncini 2009)
RcsF-P1Fw	CAATATCTGGCAATTAGAACATTCATTGAGGAAATATTGTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
RcsF-P2Rv	GCAGCTTTCAGTTTGAACAAATCGGCGTTATTCGCTCCATATGAATATCCT CCTTA	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
CuiD-NTF	CGCGGATCCATGTTACGCCGTGATTTTC	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
CuiD-CTR	CCCAAGCTTATCAGTGATGGTGATGGACCGTAAATCCTAACATC	(Pontel <i>et al.</i> 2010)
CueP wt sitio	CTACACAACTTCAATTCCTTGTAAACAATCTCCCTGCCTACTATAGGGGTT CCCCTAAG	Este trabajo
cueP -10cuiD-3	CTACACAACTTCAATTCCTTGTAAACAATCTCCTGTCTAAGCTTAGACCTT CCCCAAG	Este trabajo
cueP -10copA-3	CTACACAACTTCAATTCCTTGTAAACAATCTCCTGATAAAGGTAAACCTT CCCCTAAG	Este trabajo
Prom cueP Repeat	AGCCCGGGTCCCCCAGCATAACTTTG	Este trabajo
Prom cueP Mer	AGCCCGGGCGTCCCTTTGACCTTTCC	Este trabajo
Prom cueP Long	AGCCCGGGACGTAACCAGCCTGTAAG	Este trabajo
Prom cueP Short	AGCCCGGGGCATTTTGAATCCCTGCCTG	Este trabajo

Continuación Tabla 3.3

Prom cueP Rv	AGCCCGGGCAAAGTAATAACCATGATG	Este trabajo
cueP Δ Acidbox F	CTGATGGCGGGGATTTTTTTTATTCCAATTCCCCCTCGTGTAGGCTGGAG CTGCTTCG	Este trabajo
cueP Δ Acidbox Rv	CTACTATAGGGGTTCCCCTAAGGGAAAGGTCAAAGGGACGCATATGAATA TCCTCCTTA	Este trabajo
cpxP wt-Fwd P1	TGAAATTATTGAGTAGTAGCAACTCACGTTCCCAGTAAGTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG	Este trabajo
cpxP-Rv P2	GAAGACAGGGATGGTGTCTATGGCAAGGAAAACAGGGTTGCATATGAAT ATCCTCCTTA	Este trabajo
P1 cueQlacZ trad	AATTAACAGAGTGCCTTGAGAATGCATAACGCCACAAGAACCATGATTAC GGATTCCTG	Este trabajo
3UTR-Wt P1 F	GACAGATTAACCGAGGCATCAGCGAAAGAGTCCATTTAAGTGTAGGCTGG AGCTGCTTCG	Este trabajo
3UTR CueP P2 Rv	GTTATTTAGTTATAGCCAGAAACAAAAAAGAGCCCATGTACATATGAATA TCCTCCTTA	Este trabajo
sRNA Rv HindIII	CCCAAGCTTGATGACAGCCAGACCTGTC	Este trabajo
sRNA fwd prom pUH	CCGGAATTCATTCTCAAGGCACTCTG	Este trabajo
sodCII P1 3xFLAG	CGGCGGCGGCGGAATGCGTTACGCCTGCGGCGTCATTAAAGACTACAAAG ACCATGACGG	Este trabajo

Continuación Tabla 3.3

sodCII P2 3xFLAG	TGGCGTTTACACTGTTTCGCTGTTCGCAGCTGGAACAGGCTCCATATGAATAT CCTCCTTAG	Este trabajo
sodCI P1 3xFLAG	TGGTGGCGGTGCACGTTTTGCCTGTGGTGTTCATTGAGAAAGACTACAAAG ACCATGACGG	Este trabajo
sodCI P2 3xFLAG	ATGCCCTCCAGTGAGAGGGCTTTTTTATGGGTAAAACGAACATATGAATA TCCTCCTTAG	Este trabajo
srgA P1 F	TTCTGTATATCTGTTATCCATGGAGTGTTCGCGTACGGTGTAGGCTGGAG CTGCTTCG	Este trabajo
srgA P2 Rv	GCGGGAGGATATCTCCGGCCTGTATGGTGCCTTTATCACATATGAATATCC TCCTTA	Este trabajo
DsbC P1 F	CATCCGCGGGCATGAGTGCTGACAGGAAAGGATAGTTTGTGTAGGCTGGA GCTGCTTCG	Este trabajo
DsbC P2 Rv	CTCGCGCCGACGAAGTTGTCTCTGTTGTTTCACGCGTACATATGAATATCC TCCTTA	Este trabajo
scsA P1 F	GATAACTCGCGTTAAACAGTGAGGGCGCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Este trabajo
scsA P2 Rv	GTAATTAACCGTTAGCAATAACCGGTCTGCATATGAATATCCTCCTTA	Este trabajo
scsBCD F	GGTTAATTACTCATTACGGAGAAAAAATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	Este trabajo
scsBCD Rv	CGTTAGCGCCGGGAAACCCCGGCGCATATCATATGAATATCCTCCTTA	Este trabajo
P1 F cueP promcopA	CCAGCATAACTTTGCATTACTTTACCCTGCGTCCCTTTGAGTGTAGGCTGG AGCTGCTTCG	Este trabajo

Continuación Tabla 3.3

P2 Rv cueP promcopA	CGGTTTTATGAAGAGAAAGGGCTGGTGACGCCGCCATTACCATATGAATA TCCTCCTTA	Este trabajo
cuePpromcopA F	GTAATGGCGGCGTCACCAGC	Este trabajo

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; Cuando se indica, se ajustó el pH del LB a 5,5 o 7,0 mediante el agregado de 100 mM MES. 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) y tetracilina (12,5 µg/ml). En los casos donde fuese necesario se agregaron sales de CuSO₄, ZnSO₄ o FeSO₄ en las concentraciones indicadas.

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 °C 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 °C. 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 °C durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas con volúmenes iguales de fenol equilibrado con 100 mM Tris-HCl pH 8,0 y con cloroformo:fenol en proporción 1:1 (V/V), conservando siempre la fase acuosa. Se centrifugó la mezcla a 5000 rpm durante 5 minutos, se recuperó la fase acuosa que contiene al ADN cromosomal y se le agregaron 1/9 partes en volumen de 3 M acetato de amonio y 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó a 10000 rpm durante 20 minutos. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol 80 % (V/V), se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en 300 µl de agua destilada estéril. La concentración de ADN fue determinada midiendo la absorbancia de una alícuota a 260 nm (Abs 260 nm), según la siguiente fórmula:

1 unidad de Abs 260nm = 50 µg de ADN/ml de solución (Sambrook *et al.* 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 *et al.* 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 °C con agitación constante durante toda la noche en 3 ml de medio LB con el agregado del antibiótico adecuado. Se centrifugó el cultivo, y se resuspendió el sedimento celular en 350 µl de solución STET (8 % (p/V) sacarosa, 5 % (p/V) Tritón X-100, 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8,0). Se agregaron 10 µl de una solución de 10 mg/ml lisozima (Sigma) y 1 mg/ml ARNasa A libre de ADNasa (Sigma), 50 mM Tris-HCl pH 8 y 50 % de glicerol. La mezcla se hirvió 1 minuto a 100 °C y luego se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se sometió a extracciones sucesivas con volúmenes iguales de cloroformo y fenol equilibrado con 0,1 M Tris-HCl pH 8, conservándose la fase acuosa. Para precipitar el ADN se agregaron 60 µl de acetato de amonio 3 M y 1 volumen de isopropanol, se incubó durante 30 minutos a -20 °C y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con 500 µl de una solución de 80 % (V/V) etanol. Se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó a temperatura ambiente. Finalmente el precipitado se resuspendió en 30 µl de H₂O destilada estéril. La solución de ADN obtenida se mantuvo a -20 °C hasta su utilización. Alternativamente, para obtener un ADN plasmídico de mejor calidad y con mejores rendimientos, se utilizó un *kit* comercial (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

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 °C durante 3 minutos, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94°C, un anillado entre 50 °C y 60 °C (dependiendo del oligonucleótido utilizado) y una elongación a 72 °C (o 68°C según la polimerasa utilizada). Los tiempos de desnaturalización y anillado fueron de 30 segundos y los de elongación dependieron de la longitud de los productos a amplificar (no más de 1 minuto por cada 1 kpb). Por último se incluyó una etapa de extensión final

a 72 °C durante 10 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. El volumen final fue de 20- 50 µl conteniendo: *buffer* comercial 1X, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato (Invitrogen), 1 µg de ADN molde (cantidad variable), 5 pmoles de oligonucleótido directo o reverso y 2,5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen) o *Pfx* polimerasa (Invitrogen).

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 MgCl₂, 0,25 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato, 5 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos (directo y reverso) y 1 U de *Taq* polimerasa. El programa de amplificación fue similar al descrito en el punto anterior.

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 et al. 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. Construcción de plásmidos reporteros

Para generar los plásmidos pMC1871::*PcueP*-170, pMC1871::*PcueP*-135, pMC1871::*PcueP*-80 y pMC1871::*PcueP*-45 (Tabla 3.2) que contienen las regiones del promotor de *cueP* desde las bases -170, -135, -80 y -45 respectivamente, hasta la base +56 incluyendo los 10 primeros aminoácidos del marco abierto de lectura en fase con el gen que codifica para la enzima β -Galactosidasa carente de su propio codón de inicio de la traducción (codificado en el plásmido), se procedió de la siguiente manera. Brevemente, se realizaron sendas PCRs utilizando los cebadores directos prom *cueP* long, prom *cueP* short, prom *cueP* repeat y prom *cueP* mer y el cebador reverso prom *cueP* Rv; todos conteniendo sitios de reconocimiento para la endonucleasa de restricción XmaI y utilizando ADN genómico como molde. Los productos de estas reacciones

fueron tratados 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 °C 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 °C. El sedimento celular obtenido se lavó dos veces con 500 ml de H₂O destilada estéril fría y una vez con 10 ml de 10 % (V/V) glicerol. Finalmente, se resuspendió en 0,6 ml de 10 % (V/V) glicerol, y se fraccionó en tubos estériles, que se guardaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

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, mezcla de ligación o fragmento de ADN lineal. Se electroporó la mezcla utilizando un electroporador Bio-Rad a un voltaje de 2,5 kV. Luego, se agregó 1 ml de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación constante. Las células fueron concentradas por centrifugación y se sembraron con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB agar suplementado con el antibiótico adecuado para la selección de las bacterias transformantes.

3.6. Manipulación genética

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

En la figura 3.1 se esquematiza el método empleado para la obtención de mutantes polares y no polares en *Salmonella* desarrollado por Datsenko y colaboradores y denominada “mutagenesis en un solo paso” (Datsenko y Wanner 2000). Este método se basa en la recombinación de fragmentos de ADN lineales mediada por el sistema *red* del fago λ , luego de la transformación de las células con ADN lineal. Los fragmentos de ADN lineal se obtuvieron amplificando por PCR un *cassette* de resistencia para un antibiótico, cloranfenicol o kanamicina (Cm^R o Km^R) flanqueado por los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica FLP (denominados FRT).

Los oligonucleótidos utilizados para esta amplificación son diseñados con los extremos 5' homólogos al gen a mutar/delecionar y extremos 3' que hibriden con los sitios FRT de los plásmidos que se utilizan como molde: pKD3 (Cm^R) o pKD4 (Km^R) (Tabla 3.2). Con estos fragmentos se transformaron células electrocompetentes de *Salmonella* 7065/pKD46. El plásmido pKD46 es termosensible y expresa los genes *gam*, *bet* y *exo* del fago λ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa, cuyos productos génicos evitan la degradación del ADN lineal por la nucleasa RecBCD de la bacteria y facilitan la recombinación de éste con el cromosoma (Datsenko y Wanner 2000) (Figura 3.1).

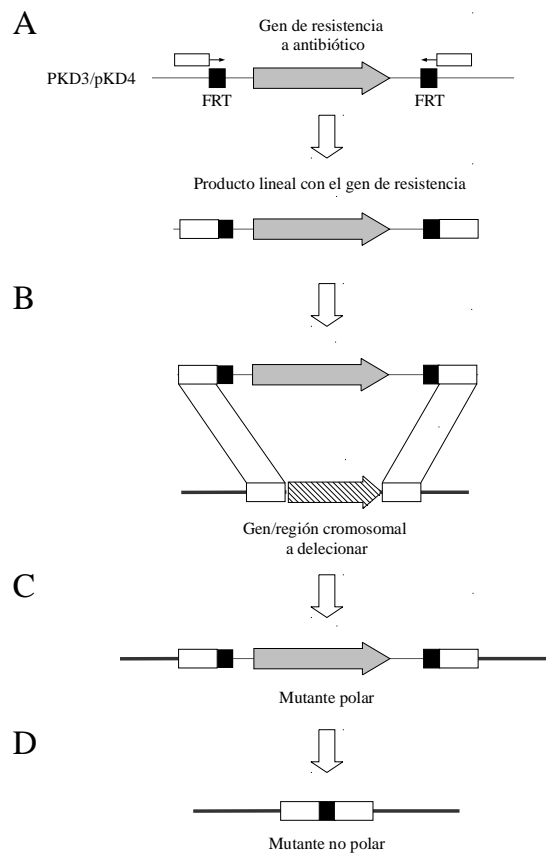


Figura 3.1. Obtención de mutantes polares y no polares en *Salmonella*. El esquema muestra la estrategia descrita por Datsenko y Wanner para la obtención de mutantes cromosomales (Datsenko y Wanner 2000). **A.** Se genera por PCR un fragmento de ADN lineal que contiene el gen de resistencia a Cm o Km (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 deletionar (blanco). **B.** Se transforma la cepa de *Salmonella* que transporta el plásmido pKD46 con el fragmento de ADN lineal obtenido. Estas cepas expresan los genes del sistema de recombinación λ Red presentes en el plásmido pKD46. **C.** Se seleccionan aquellas cepas que han intercambiado el gen a deletionar 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.

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 30°C y con el agregado de 20 mM de arabinosa (concentración final).

La electroporación se realizó con 5 µl del producto de PCR concentrado (20X) y desalado. Previo a la selección, se incubó 4 horas a 37 °C con agitación en LB conteniendo 1 % (p/V) glucosa. Se seleccionaron colonias Cm^R o Km^R a 37 °C y luego se repicaron a 42 °C para evitar la replicación del plásmido (pKD46) que, de esta manera, se pierde. Así se obtuvieron las cepas mutantes conteniendo la delección deseada y una pequeña “cicatriz” de 75 pb que contiene un único sitio FRT (Figura 3.1)

3.6.2. Construcción de fusiones transcripcionales a *lacZY*

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

3.6.3. Construcción de fusiones FLAG

Las fusiones cromosomales a FLAG se realizaron según la técnica descrita por Uzzau y colaboradores (Uzzau *et al.* 2001). Utilizando como molde el plásmido pSUB11, se amplificó la secuencia codificante para el epítipo FLAG seguida del *cassette* de resistencia a Km. De la misma forma como se describió en la sección 3.6.1. los oligonucleótidos poseen una región 5´ compuesta por 40 nucleótidos homólogos al sitio donde se pretende insertar el epítipo y un extremo 3´ adecuado para amplificar desde el plásmido pSUB11. Con el producto de PCR se transformaron células 7065/pKD46. Los oligonucleótidos se diseñaron de tal manera que el epítipo FLAG quede en fase con el marco abierto de lectura a etiquetar, generando una proteína de fusión en el extremo C-terminal.

3.6.4. Mutagénesis sitio dirigida empleando la técnica de “mutagénesis en un solo paso”

La cepa mutante PB10009 *PcueP::lacZ-Cm^R* constitutivo se generó mediante la técnica de “mutagénesis en un solo paso” descrita en la sección 3.6.1. empleando como molde el plásmido pJB20 que contiene el gen que codifica para la β -Galactosidasa seguido por el *cassette* de resistencia a Cm . El ADN lineal se obtuvo mediante una amplificación por PCR utilizando el cebador directo P1 *cueP* constitutivo que contiene la mutación deseada dentro de la región de homología del mismo y el cebador reverso P2 *cueP* constitutivo.

Las mutantes puntuales en torno a la caja -10 del promotor de *cueP* también se realizaron mediante la técnica de “mutagénesis en un solo paso” descrita en la sección 3.6.1. Para obtener las distintas versiones mutantes se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde ADN genómico de la cepa *PcueP::lacZ PcueP::Cm* (PB9833), que contiene insertado el gen de resistencia a Cm corriente arriba del promotor de *cueP*. De esta forma, se obtuvieron los productos de ADN lineales amplificando con el cebador directo P1 sitio *cpxR* que permite la amplificación del *cassette* de resistencia a Cm presente en el cromosoma de la cepa PB9833 y los cebadores reversos *cueP* -10 *cuid-3* y *cueP* -10 *copA-3*. Dichos oligonucleótidos reversos contienen dentro de su región de homología, los cambios puntuales en las bases deseadas para modificar la región -10 del promotor de *cueP* y a su vez el cambio de la citocina en posición +10 por una adenina para generar un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción *HpaI* utilizado para chequear la incorporación de las mutaciones en el cromosoma. Los productos de ADN lineales fueron transformados en la cepa PB8214 *PcueP::lacZ* (curada) para generar la fusión transcripcional que permita la medida de la expresión de los promotores mutantes.

3.6.5. Mutagénesis dirigida empleando la técnica de “SOE PCR”

Para generar la cepa mutante PB9958 *PcueP::lacZ* caja *cpxR*-Cm^R* se obtuvo el ADN lineal mediante la técnica de SOE PCR y se transformó sobre una cepa *PcueP::lacZ* (curada) (PB8214) (Figura 3.2). Brevemente, para las reacciones de PCR I y II utilizadas posteriormente en la SOE PCR se emplearon dos oligonucleótidos “flanqueantes” del fragmento lineal transformante y un par de oligonucleótidos internos “mutadores” complementarios entre sí que son los que contienen las mutaciones que se

desean introducir. La PCRI consiste en amplificar un fragmento con un oligonucleótido mutador y uno de los oligonucleótidos flanqueantes. En este caso se emplearon los oligonucleótidos CpxMut-kpn F (mutador) y P-int-cueP-Rv utilizando ADN genómico silvestre como molde para obtener el fragmento del promotor de *cueP* con bases puntuales mutadas en la caja de reconocimiento para CpxR. La PCR II se llevó a cabo con los oligonucleótidos P2-CpxMut-kpn-Rv (mutador y con una región complementaria al utilizado en la PCRI) y P1 sitio CpxR utilizando como molde el plásmido pKD3. Los productos mutados de estas dos reacciones de PCR fueron purificados y se utilizaron como molde en una reacción de SOE-PCR (PCR III) utilizando los cebadores externos no mutagénicos con el fin de fusionarlos obteniendo el fragmento del promotor de *cueP* con las mutaciones deseadas unido a un *cassette* de resistencia a cloranfenicol (Cm^{R}) que permita la posterior selección de las colonias luego de la transformación lineal. 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.

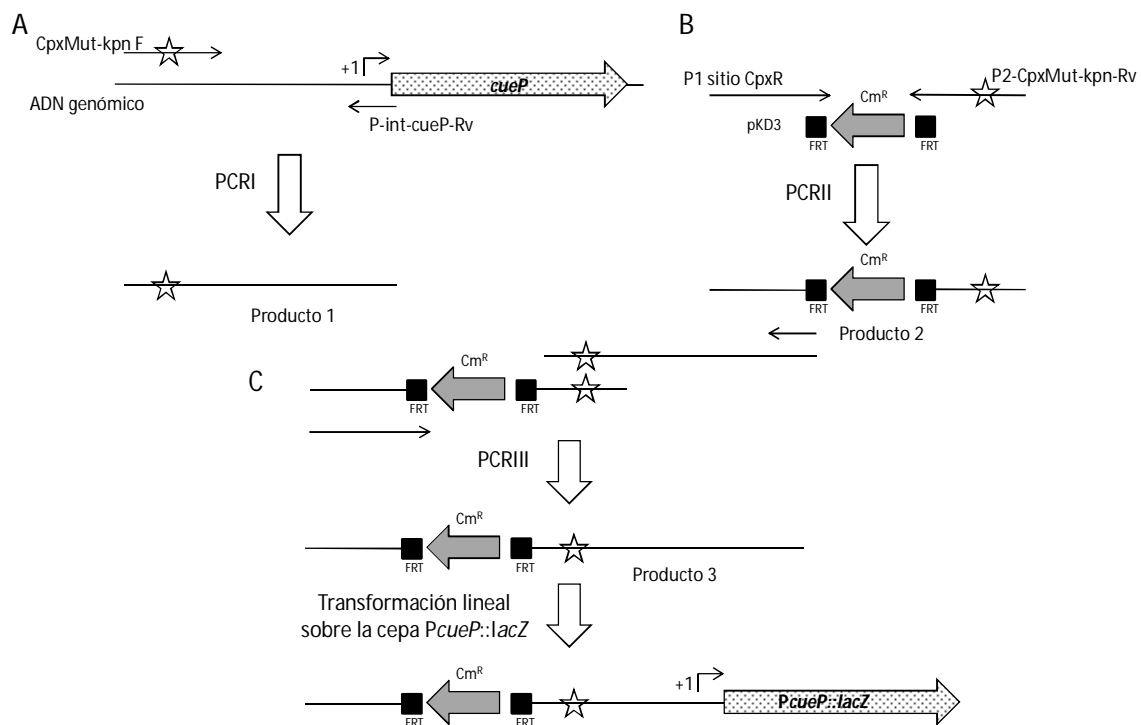


Figura 3.2. Construcción de la cepa *PcueP::lacZ* caja $\text{CpxR-Cm}^{\text{R}}$ mediante SOE PCR seguida de «transformación en un solo paso». En la figura se esquematiza la metodología empleada para generar la cepa donde se cambiaron bases puntuales en el sitio de reconocimiento para CpxR. (A) Se genera el producto de PCR-1 utilizando el oligonucleótido mutagénico CpxMut-Kpn F y su par P-int-cueP-Rv. (B). Se genera el producto de PCR-2 que contiene el cassette de resistencia a cloranfenicol empleando los oligonucleótidos P1 sitio CpxR y P2-CpxMut-Kpn-Rv. (C). Se genera el producto 3 combinando los productos 1 y 2 mediante SOE-PCR. E. El producto 3 es empleado para transformar una mutante *PcueP::lacZ*.

Además, se generó la cepa *PcueP::Cm cueP::lacZ* (PB9833) que fue construida utilizando los cebadores P1 sitio *cpxR* y P2 *cpx wt* insertando el *cassette* de resistencia a Cm por el método de “mutagénesis en un solo paso” descrito en 3.6.1 en el mismo sitio que en la cepa PB9958 para utilizarla como control.

La cepa *PcopAcueP* que posee el gen *cueP* bajo control transcripcional del promotor de *copA* fue generada por la técnica de SOE PCR de manera similar que la cepa *PcueP::lacZ* caja *cpxR*-Cm^R* descrita anteriormente. En la PCR I se amplificó el *cassette* de resistencia a Cm utilizando como molde el plásmido pKD3 y los cebadores P1 F *cueP* prom *copA* y P2 Rv *cueP* prom *copA*. La PCR II se llevó a cabo con los cebadores *cueP* prom *copA* F y *cueP* prom *copA* Rv que empleando ADN genómico como molde, amplifican la secuencia promotora de *copA*. Los cebadores internos poseen regiones complementarias entre sí con lo cual pudieron fusionarse ambos productos en la reacción de PCR III (SOE PCR) empleando como molde los productos de PCR I y II y utilizando los cebadores externos. El producto obtenido fue utilizado para transformación lineal. Como los cebadores externos poseen secuencias de homología con los extremos del promotor de *cueP*, las cepas *Cm^R* fueron transformadas en la región del promotor de *cueP* intercambiando su secuencia por la región promotora de *copA*.

Tabla 3.4. Componentes y programas utilizados para la amplificación 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)	2 µl	8 µl (25 pmol)
Oligonucleótido Rv	2 µl (25 pmol)	2 µl (25 pmol)	8 µl (25 pmol)
<i>Pfx</i> (2,5 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl	2 µl
Molde ADN genómico	1 µl	1 µl	-
H ₂ O csp.	100 µl	100 µl	400 µl
Programa de PCR	PCR I	PCR II	PCR III (SOE-PCR)

1. Desnaturalización	4' a 94°C	4' a 94°C	4' a 94°C
2. Desnaturalización	30'' a 94°C	1' 30'' a 94°C	1' a 94°C
3. Hibridación	30'' a 55°C	2' a 55°C	2' a 55°C
4. Elongación	1' a 68°C	1' a 68°C	2' 30'' a 68°C
5. Repetir pasos 2 a 4	30 veces	30 veces	30 veces
6. Elongación final	5' a 68°C	10' a 68°C	10' a 68°C

3.6.6. Utilización del bacteriófago P22

3.6.6.1. Obtención de lisado en medio semisólido

Las mutantes en los diferentes genes de *Salmonella* descritas durante esta Tesis, así como los plásmidos utilizados durante el transcurso de la misma fueron movilizados mediante transducción generalizada con 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 °C, se agitó vigorosamente y se distribuyó la mezcla sobre placas de Petri con medio de cultivo LB sólido. Las placas fueron incubadas 5-7 horas a 37 °C hasta observar placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro. Para recolectar el lisado se agregó 5 ml de medio LB líquido a cada placa de Petri y, con la ayuda de una espátula de Drigalski, se recogió la mezcla de LB semisólido, bacterias y fagos. A esta mezcla se la trató con 200 µl de cloroformo para completar la lisis celular y se la centrifugó 10 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4 °C hasta el momento de su uso (Bullas & Ryu 1983).

Debido a que la cepa 7065 posee una mutación en el gen *galE* que le impide sintetizar galactosa, su LPS es distinto al de la cepa silvestre y no es reconocido por el bacteriófago P22 (Bullas & 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.

3.6.6.2. 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 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100 g/l de ácido cítrico, 655 g/l de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 175 g/l de $NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$ y 3 ml/l de $CHCl_3$), 0,05 ml de glucosa 20% (p/V) y $5 \cdot 10^7$ ufp/ml de fago P22 HT. Tras una incubación de 16 hs a 30 °C con agitación, se agregaron 200 μ l 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 °C hasta el momento de su uso.

3.6.6.3. Transducción generalizada

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

3.7. Ensayos de actividad β -galactosidasa

Para las medidas de actividad β -galactosidasa de cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales a los genes *lacZ*, se utilizó una modificación del protocolo propuesto por Miller (Miller 1972). Se determinó la densidad celular de los cultivos midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Para el ensayo de actividad se utilizaron 30 μ l del cultivo, los cuales fueron agregados a un tubo de ensayo que contenía 275 μ l de solución reguladora Z (16,1 g/l $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$; 5,5 g/l $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,27 % (V/V) β -mercaptoetanol), 24 μ l de cloroformo y 14 μ l de 0,1 % (p/V) SDS. La mezcla se agitó vigorosamente por 10 segundos. La reacción se

llevó a cabo a 30 °C y se inició por el agregado de 60 µl del reactivo o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml a cada tubo, se mezclaron los reactivos y se dejó a 30°C hasta observar coloración amarilla. La reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de 150 µl de 1 M Na₂CO₃. 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,

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

donde DO₄₀₅¹ y DO₄₀₅² 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 DO₆₀₀ la densidad óptica a 600 nm del cultivo líquido. Para las determinaciones de actividad β-galactosidasa a partir de medio sólido, las células crecidas 16 hs en una placa LB agar que contenía los compuestos a analizar (CuSO₄, IPTG, según se indica en cada experimento) se resuspendieron en LB líquido hasta una DO aproximada de 1,5 unidades y se realizó la determinación enzimática de la misma manera descrita para medio líquido.

3.8. 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 CuSO₄. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 horas en condiciones aeróbicas o alternativamente durante 72 horas en condiciones anaeróbicas. El ambiente anaeróbico fue generado utilizando el sistema Gaspak en jarra con bolsas AnaeroGen de OXOID e indicadores de anaerobiosis de la misma marca para verificar el consumo total de oxígeno generada. Se consideró como CIM a la concentración de metal en la placa de LB agar en la que no se observó crecimiento de colonias.

3.9 Ensayo de competencia en el crecimiento en medio sólido

Para generar el gradiente de concentración de Cu, se utilizó el método de difusión por disco en agar. El mismo consistió en colocar discos de papel de filtro estériles, embebidos con soluciones de CuSO_4 de concentraciones conocidas, sobre placas de LBA. Luego se vertió una mezcla de 2 mL de medio semisólido LB con 200 μL de una mezcla en partes iguales de cultivos saturados (normalizado por la DO_{600}) de la cepa silvestre transformada con el plásmido que expresa GFP (Tabla 3.2) y la cepa mutante *PcopAcueP* transformada con el plásmido que expresa la proteína Cherry (Tabla 3.2) o en forma inversa, la cepa silvestre expresando Cherry y la mutante expresando GFP. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37 °C y luego se observaron en un microscopio de fluorescencia con filtros adecuados para observar la fluorescencia verde emitida por GFP, o la fluorescencia roja emitida por Cherry.

3.10. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron en medio rico LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 (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, CuSO_4 a la concentración final que se indica y metil viológeno a la concentración que se indica. 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 de los oligonucleótidos se llevó a cabo en un volumen de 15 μl , conteniendo solución de fosforilación comercial suplementada con 45 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 $\text{mCi}/\mu\text{mol}$, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, New England Nuclear), 15 pmoles del oligonucleótido, y 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Promega). Se incubó 30 minutos a 37 °C, y luego se detuvo la reacción por inactivación de la enzima, calentando la mezcla a 65 °C durante 10 minutos. Se separaron 3 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 *cueP*.

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 y uno no marcado. A su vez, se realizó la misma reacción de PCR no radiactiva. Este fragmento no radiactivo (de ahora en adelante, sonda fría) fue cuantificado midiendo absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta la relación una absorbancia de 1 a 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 CueR, CpxR y ARN Polimerasa con la región promotora de *cueP* fue analizada mediante la técnica de retardo de la movilidad electroforética de Lane y colaboradores (Lane *et al.* 1992).

El fragmento de ADN correspondiente a la región promotora fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos Prom *cueP* Long y *cueP* prext Rv para amplificar el promotor silvestre de *cueP* (utilizando como molde ADN silvestre) y Prom *cueP* Long y P1 Rv para amplificar el promotor “constitutivo” de *cueP* (utilizando ADN de la cepa *cueP::lacZ-Cm^R* constitutivo-PB10009-). Previamente se fosforiló el extremo 5' de uno de los oligonucleótidos con ³²P por medio de la oligonucleótido quinasa T4 (Invitrogen), como se describe en el punto 3.11.1.

Aproximadamente 6 fmoles (15 ng) de la sonda marcada fueron incubados con diferentes cantidades de CueR, CpxR purificadas y/o ARN Polimerasa (Epicentre), 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 React³ (Invitrogen) 1X, 5 mM DTT, 10 % glicerol, 2,5 µg/ml ADN de espermatozoos de salmón (Sigma), 25 µg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) y 20 mM de acetilfosfato, utilizado para fosforilar al regulador CpxR (durante 60 minutos a 30°C previo al agregado de la sonda). Luego se agregó solución de siembra (0,25 % (p/V) azul de bromofenol, 0,25 % (p/V) xilencianol, 30 % (V/V) glicerol) en una proporción 20:1 V/V de muestra:solución y se sembró en geles no desnaturizantes. Se utilizó un gel en

gradiente de sacarosa entre 3-8% (p/V) de acrilamida:bisacrilamida 29:1. Los geles en gradiente se prepararon utilizando vasos comunicantes en los que se colocaron soluciones al 3% y 8% de acrilamida:bisacrilamida. Para generar el gradiente, la solución de acrilamida al 8% contiene 10% de sacarosa. Para la preparación de los geles y como solución de corrida se utilizó 25 mM Tris-HCl, 190 mM glicina pH 8,3 y 1 mM EDTA.

Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una intensidad de corriente de 10 mA por gel. Los geles fueron secados a 80 °C durante 60 minutos en un desecador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT), 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 ADNasaI o ADN “*footprinting*”

La técnica de ADN “*footprinting*” con ADNasaI está basada en la protección que brindan las proteínas de unión al ADN contra la digestión por la ADNasaI (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 CueR, CpxR y/o ARN Polimerasa según se indique y 6 fmoles de ADN marcado. Luego de 30 minutos de incubación a 37 °C, se adicionaron 60 µl de H₂O destilada, 10 µl de solución 10 X de ADNasa I compuesta por 400 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM MgSO₄ y 10 mM CaCl₂ y 1 U de ADNasa I (RQ1 DNase, Promega), y se incubó a 25°C durante 90 segundos. La reacción se detuvo por el agregado de 90 µl de solución de corte conteniendo 20 mM EDTA pH 8,0 y 200 µl de fenol-cloroformo en una proporción 1:1 en volumen. Se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos, se separó la fase acuosa, y se precipitó con 200 µl de isopropanol y 22 µl de acetato de amonio 3 M. Se incubó a -20 °C durante 16 horas minutos, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos, se lavó con 70 % (V/V) etanol, y se secó a 37 °C. El precipitado se resuspendió en 7 µl de solución de siembra desnaturizante (10 mM NaOH, 95 % formamida, 0,05 % azul de bromofenol y 0,05 % de xilencianol) y se sembró en un gel de secuenciación como se describe en el punto siguiente.

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 °C durante 3 minutos. Se utilizó TBE 1X como solución de electroforesis. La corrida electroforética se llevó a cabo a una potencia constante de 60 vatios durante dos horas. Los geles se secaron a 80 °C 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 CueR y CpxR nativas

3.12.1. Purificación de CueR

La cepa de *E. coli* XL1-blue pCueR (PB4853) fue crecida en LB suplementado con ampicilina, con agitación constante a 37 °C hasta saturación del cultivo. Luego se diluyó 1/50 en 300 ml de medio fresco y se incubó a 30 °C hasta DO_{600} de 0,6, momento en que se adicionó IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Las células se

cosecharon por centrifugación a 5.000 g a 4 °C durante 10 minutos. Luego se resuspendieron en 10 ml de solución de sonicación (50 mM Tris pH 8,0, 2 mM EDTA, y 5 mM DTT), y se sometieron a 3 pulsos de 30 segundos cada uno al 35 % de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600 (Sonics y Materials). El procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 20 minutos a 20.000 g y luego se realizó un corte con sulfato de amonio 45 %, conservando la fracción insoluble que fue colectada por centrifugación a 20.000 rpm durante 30 minutos. Se resuspendió el pellet obtenido en la solución de sonicación y se desaló mediante una columna de Sephadex G50 (HiTrap™ Desalting, Amersham Pharmacia Biotech) empleando para la corrida la misma solución. Posteriormente, se sembró en una columna de heparina (HiTrap™ Heparin HP 5 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de composición: 20 mM Tris-HCl pH 8,0 y 5 mM DTT. La elución se realizó con la misma solución empleada para equilibrar la columna con un gradiente creciente de NaCl (0-1 M). La fracción de interés, colectada entre 0,8-0,85 M NaCl, se sembró en una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300 GL (Amersham Biosciences). La corrida se realizó con una solución compuesta por 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, y 5 mM DTT. En todos los casos las corridas cromatográficas fueron realizadas en el equipo ÄKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech). Las fracciones colectadas de la columna que contenían a CueR se identificaron por análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie.

3.12.2. Purificación de CpxR

Las cepa de *E. coli* M15 pRep4 pQE32::CpxR-6xHis (PB9721) fue crecida en LB suplementado con Amp y Km, con agitación constante a 37 °C hasta saturación del cultivo. Luego se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 300 ml de medio fresco. Se incubó a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6, momento en que se adicionó ITPG hasta una concentración final de 50 μ M. El cultivo se cosechó por centrifugación a 6500 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Luego se resuspendió en 15 ml de solución de sonicación (20 mM Tris pH 7,4; 0,5 M NaCl y 5 mM imidazol), y se sometió a 10 pulsos de sonicación de 10 segundos cada uno al 15 % de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600 (Sonics y Materials). El procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. La suspensión obtenida se centrifugó durante 20 minutos a 20000

rpm. La fracción soluble se sembró en una columna de Ni-NTA (HisTrap™ 5 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de sonicación: 20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 5 mM imidazol. Luego de la unión de la proteína se realizó un lavado de la columna con solución de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 40 mM imidazol). Finalmente, se eluyó la proteína con solución de elución (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,5 M NaCl y 100 mM imidazol). Se seleccionaron las fracciones de interés mediante análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie 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 descritos anteriormente fue determinada midiendo absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro modelo Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech). La fórmula utilizada para el cálculo de la concentración fue la siguiente:

$$\text{Concentración} = \text{Abs}_{280\text{nm}} / \text{paso óptico de la cubeta} \times \text{coeficiente de extinción molar } (\epsilon)$$

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

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

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

3.14. Electroforesis de proteínas

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

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

La detección de la expresión de CueP, CueP3xFLAG, SodCI3xFLAG y SodCII3xFLAG a partir de extractos celulares de *Salmonella* 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 1/500 de anticuerpos policlonales de conejo anti-cueP o con una dilución 1/250 de anticuerpos monoclonales anti-FLAG (Sigma). Una vez finalizada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS. Posteriormente, la membrana se incubó durante una hora con anticuerpo secundario anti-conejo (cuando se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal anti-CueP) o anti-ratón (en el caso de

utilizar como anticuerpo primario el anticuerpo anti-FLAG) conjugada a fosfatasa alcalina, diluido 1/3000 en la misma solución TBS. Para el revelado, se realizó un lavado de 10 minutos con TBS y un lavado con una solución conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl₂. Luego, se colocó la membrana en una solución de la misma composición a la cual se le agregó 0,15 mg/ml BCIP y 0,3 mg/ml NBT disuelto en 70 % N-N-dimetilformamida y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente hasta desarrollo de color.

3.16. Medidas cualitativas de actividad SOD

La actividad de las enzimas superóxido dismutasas se analizaron de forma cualitativa mediante geles nativos de poliacrilamida. Las cepas de *S. Typhimurium* fueron crecidas durante toda la noche a 37 °C con agitación en medio LB ajustado a pH 7,0 o 5,5 y con o sin el agregado de 1 mM de CuSO₄. Los cultivos (de 3 mL) fueron centrifugados a 6.000 rpm durante 4 minutos y las células fueron resuspendidas en 400 µL de buffer de composición 50 mM Tris-HCl pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, ácido ascórbico 1 mM, PMSF 1 mM. Las células fueron sonicadas en hielo y posteriormente se centrifugó a 4°C durante 10 min a 15.000 rpm y se siguió trabajando con el sobrenadante conteniendo las proteínas solubles. Los extractos se mezclaron adecuadamente con buffer de siembra para electroforesis nativa 5X (obtenido al mezclar 1 mL de glicerol saturado en Bromofenolblue con 500 µL de Tris-HCl 1 M pH 6,8 y 500 µL de H₂O). Posteriormente, fueron sembrados en geles nativos de poliacrilamida al 10 % (pre-corridos durante 30 min) normalizando por la cantidad de proteínas presentes en cada muestra. La electroforesis se llevó a cabo en cámara fría (4°C) utilizando como *buffer* de corrida una solución conteniendo Tris 25 mM, Glicina 192 mM y ácido ascórbico 2 mM (agregado instantes antes de la corrida) durante 40 minutos (aproximadamente) a una intensidad de 20 mA. Una vez finalizada la corrida, se realizó un lavado incubando los geles durante 15 min a 4°C con una solución de Tris-HCl 25 mM pH 8,0. Luego se llevó a cabo la incubación con 5 ml de la solución reveladora durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. La solución reveladora fue preparada en el momento y se compone de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (c.s.p. 10 ml), EDTA 10 µM, NBT 180 µM, Riboflavina 120 µM y TEMED (20 µl). Finalmente, se retiró la solución de revelado y los geles se expusieron a la luz de un tubo fluorescente hasta el desarrollo deseado de color. En presencia de la luz se reduce el NBT

favoreciendo la formación de un compuesto púrpura; dicha reacción es inhibida por la actividad SOD con lo cual las bandas de las proteínas Sod quedan incoloras en contraste con el resto del gel teñido. El corte de la reacción de color se produjo en el momento deseado por el agregado de H₂O destilada.

3.17. Herramientas bioinformáticas

Los motivos consenso para los sitios de unión de CpxR, BaeRS, RcsB fueron generados entrenando el programa MEME (Bailey *et al.* 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 genoma de *Salmonella* que comprenden aproximadamente una región de 500 pb corriente arriba del ORF de *cueP* mediante el programa MAST (Bailey y Gribskov 1998).

4. Capítulo I

“El daño generado por Cu en la cepa sensible $\Delta cuiD$ activa al sistema Rcs y CueP alivia el estrés generado en dicha condición”

4.1. En presencia de Cu, la cepa sensible $\Delta cuiD$ presenta un crecimiento de aspecto mucoso

Como se menciona en la Introducción, el periplasma ha sido señalado como un compartimento importante para la homeostasis de Cu, ya que la mayoría de las enzimas que requieren este metal residen en este compartimento o en estructuras membranosas derivadas del mismo. Ejemplos de estas son la citocromo *caa3* oxidasa y plastocianina en cianobacterias, o metanomonoxigenasas en metanótrofos (Hakemian *et al.* 2008; Karlsen *et al.* 2008; Waldron *et al.* 2007)

En *S. Typhimurium* no se observaron diferencias en la sensibilidad a Cu entre una cepa mutante en *cueP* y la cepa silvestre en presencia de oxígeno (Pontel y Soncini 2009). Debido a que *CuiD*, al igual que *CueP*, también se localiza en el periplasma, y que su expresión es inducida por Cu de manera dependiente de *CueR* (Espariz *et al.* 2007; Lim *et al.* 2002), Pontel y Soncini analizaron el rol de *CueP* en la resistencia al metal en la mutante en *cuiD*. En este entorno $\Delta cuiD$, la ausencia de *cueP* produjo una disminución de la CIM para Cu de 1,25 a 1,00 mM CuSO_4 . Esto sugiere que *CueP* participa en la resistencia al metal en aerobiosis, aunque la principal determinante en esta condición es la multicobre oxidasa *CuiD*. En consecuencia, en presencia de *CuiD* la contribución de *CueP* es sólo secundaria. La sobreexpresión de *CueP* produjo un aumento de la resistencia a Cu tanto en una cepa $\Delta cuiD$ como en la mutante doble $\Delta cueP \Delta cuiD$, cuyas CIM para el metal se incrementaron de 1,25 y 1,00 mM respectivamente, a 1,75 mM CuSO_4 en ambos casos. El hecho de que no se logró recuperar los niveles silvestres de resistencia al Cu (con una CIM de 5,5 mM CuSO_4) indica que *CueP* no puede compensar totalmente las funciones de la multicobre oxidasa (Pontel y Soncini 2009).

Como parte de este trabajo de Tesis, se observó que en presencia de concentraciones subletales de Cu, las colonias de la cepa mutante en *cuiD*, muestran una mucosidad incrementada cuando se crecen en placas de LB agar luego de una incubación a 37 °C durante toda la noche. Si bien el fenotipo se detectó originalmente en placas de LB agar al 1,5 %, en placas al 1 % de agar el fenotipo mucoide fue más claro por lo que el resto de los experimentos mostrados en este capítulo fueron realizados en esa condición. Para corroborar que la ausencia de *cuiD* causa la mucosidad observada, se realizaron los ensayos de complementación fenotípico (Figura 4.1). Para esto, se utilizó el plásmido pUH21-2*lacI*^q que posee una copia del gen que

codifica para el represor del operón *lac* (*lacI^q*) y un promotor *lac* corriente arriba del sitio de múltiple clonado (Soncini *et al.* 1995). El marco abierto de lectura de *cuiD* se clonó bajo el control transcripcional del promotor *lac* pudiendo inducir artificialmente su expresión por el agregado de IPTG. Las bacterias transformadas con dicho plásmido no formaron colonias en placas de LB agar al 1 % con el agregado de 0.5 mM IPTG. Atribuimos este fenómeno a un posible efecto tóxico por la sobreexpresión de CuiD. Por esta razón, el análisis se hizo en placas de LB agar al 1 % adicionadas con 0.1 mM IPTG, que no afectó el crecimiento bacteriano. Como se observa en la Figura 4.1, en esta condición, la cepa complementada con CuiD revierte la mucosidad causada por el agregado de Cu en la cepa mutante en *cuiD*.

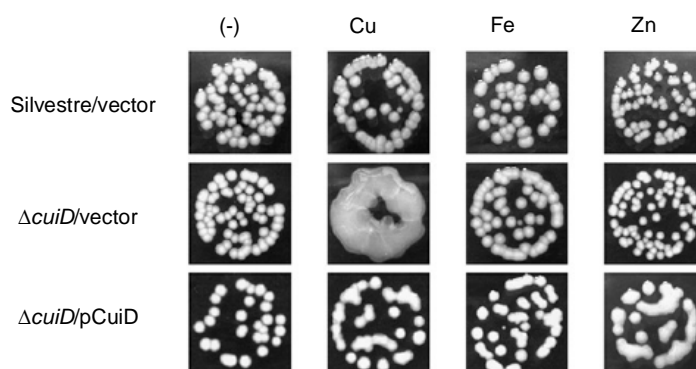


Figura 4.1. El cobre genera un fenotipo mucoso en el crecimiento de la cepa sensible $\Delta cuiD$. Imágenes representativas de colonias de las cepas indicadas crecidas durante toda la noche a 37°C en placas de LB suplementadas con IPTG (0,1 mM) con o sin el agregado de 0,75 mM de $CuSO_4$, 0,75 mM de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ o 0,75 mM de $ZnSO_4$ como se indica.

Por otra parte y como se menciona en la Introducción, el Cu puede generar diferentes tipos de estrés y en presencia de oxígeno puede participar de numerosas reacciones de óxido-reducción (Yoon, Yeom, et al. 2014). A su vez, otros metales como Fe y Zn también son tóxicos y algunos mecanismos de toxicidad entre ellos se superponen (Nies 1999; Nies 2007). El primer interrogante que surge al observar la mucosidad de las colonias de la cepa $\Delta cuiD$ es si es un fenotipo específico de Cu o si es una respuesta pleiotrópica de la célula a un estrés generado por exceso de cualquier metal. Para analizar esto, se creció la mutante $\Delta cuiD$ en presencia de concentraciones subletales de Fe(II) o Zn(II). Considerando la tendencia del Fe(II) a oxidarse a Fe(III) en presencia de oxígeno, se utilizó la sal de Mohr, $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$, para estabilizar el Fe(II) durante el ensayo en las placas de LB agar.

Como se observa en la Figura 4.1, el fenotipo mucoso de la cepa mutante $\Delta cuiD$ se observó sólo por el agregado de Cu(II) y no frente a la adición de Fe o Zn indicando que, el Cu induce específicamente dicho fenotipo en ausencia del mecanismo de respuesta apropiado al metal tóxico (tal como ocurre en la cepa mutante $\Delta cuiD$).

Curiosamente, se observó algo de mucosidad en la cepa que sobreexpresa CuiD cuando fue crecida en placas que contienen Zn(II) y en menor medida en aquellas adicionadas con Fe(II). Este comportamiento no fue observado en la cepa $\Delta cuiD$ con el vector vacío ni en la cepa $\Delta cuiD/pCuiD$ en presencia de Cu(II), sugiriendo que esta alteración podría deberse a un desbalance en la disponibilidad de cobre para metalar CuiD.

4.2. El sistema Rcs es responsable del fenotipo mucoso observado en la mutante $\Delta cuiD$ expuesta al estrés por Cu

Conociendo la especificidad por el metal del fenotipo mucoso, surge el interrogante sobre la causa del mismo y sobre los aspectos regulatorios que lo desencadenan. Un fenotipo similar fue reportado en *E. coli* para la mutante en *cueO*, pero en ausencia de cobre (Tree *et al.* 2007). Los autores atribuyeron el fenotipo de mucosidad a la expresión del Ag43 (adhesina de superficie responsable del fenotipo de autoagregación) y a la expresión del pilus “curli”, sin extenderse en el estudio de la regulación transcripcional de estos factores en la mutante en *cueO*. También se reportó que colonias de cepas mutantes de *E. coli* $\Delta cueO$ o $\Delta cus \Delta cueO$ se tornan mucosas en presencia de Cu (Bagai *et al.* 2007).

Se ha establecido que el sistema regulatorio Rcs participa en el control de genes que codifican para proteínas que participan en la síntesis de factores que componen la superficie celular de *E. coli* (Majdalani y Gottesman, 2005). Un fenotipo mucoide similar al observado en esta Tesis se reportó en bacterias crecidas en condiciones de activación del sistema Rcs (Laubacher y Ades 2008; Majdalani y Gottesman 2005; Majdalani *et al.* 2005). Como se menciona en la Introducción, el sistema de fosfotransferencia Rcs controla varias funciones celulares en bacterias Gram negativas, incluyendo la síntesis de ácido colánico dependiente del operón *cps* (*wca*), motilidad, quimiotaxis y modificaciones en el lipopolisacárido, además de contribuir a la virulencia de *Salmonella* (Delgado *et al.* 2006; García-Calderón *et al.* 2005; Majdalani y Gottesman 2005; Erickson y Detweiler 2006). Este sistema, puede ser activado por

distintos tipos de estrés relacionados con modificaciones en la envoltura, tales como crecimiento en superficies sólidas o en alta osmolaridad; o por el crecimiento en medios ricos en glucosa (Bury-Moné *et al.* 2009; Ferrières y Clarke 2003; Majdalani y Gottesman 2005).

Considerando estos antecedentes, se procedió a investigar si el fenotipo mucoso inducido por Cu en la cepa $\Delta cuiD$ se debe a la síntesis de la cápsula de ácido colánico dependiente de la activación del sistema Rcs. Con el objeto de disecar la respuesta e identificar los componentes regulatorios involucrados en la formación de colonias mucosas en placas de LB agar suplementadas con Cu en la cepa $\Delta cuiD$, se realizaron deleciones individuales en cada uno de los genes que codifican para las proteínas del sistema regulatorio Rcs así como también en *wcaJ*, que pertenece al operón *wca* y codifica para la enzima que cataliza el primer paso en la vía de síntesis del ácido colánico (Majdalani y Gottesman 2005).

En presencia de concentraciones subletales de Cu todas las colonias de las cepas mutantes dobles que además de tener mutado el gen *cuiD* tienen mutado alguno de los genes que codifican para el sistema Rcs; esto es para la quinasa sensora RcsC, para los reguladores de respuesta RcsB y RcsA, para la proteína de membrana externa RcsF o para la quinasa RcsD, no desarrollaron apariencia mucosa (Figura 4.2A), indicando que todos los factores que forman este sistema complejo de transducción de señales están involucrados en la respuesta al estrés generado en presencia de cobre en la mutante $\Delta cuiD$ y son responsables de la generación del fenotipo mucoso.

Usando la fusión transcripcional *wcaJ::MudJ* (*wcaJ::lacZ*) como gen reportero monitoreamos la activación del sistema Rcs y observamos que el Cu(II) promueve la inducción de dicho sistema en la cepa mutante $\Delta cuiD$ (Figura 4.2B). Es importante señalar que la inducción de la expresión del gen reportero para el sistema Rcs sólo se observó cuando se usaron concentraciones de Cu mayores o iguales a 0,5 mM. Esto nos permite concluir que se requiere tanto de la ausencia de la multicobre oxidasa como de la presencia de altas concentraciones de Cu para inducir el sistema Rcs.

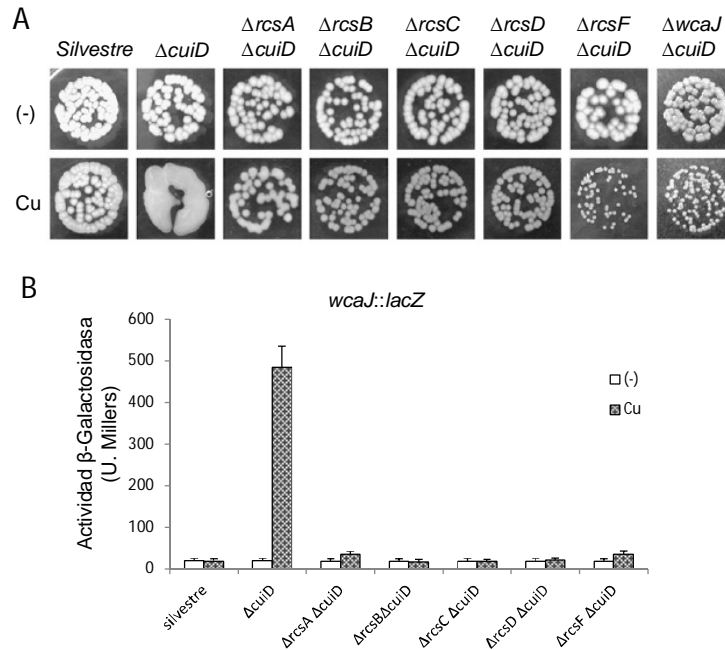


Figura 4.2. El fenotipo mucoso inducido por Cu en la cepa $\Delta cuiD$ está controlado por el sistema Rcs. (A) imágenes representativas de colonias de las cepas mutantes indicadas crecidas durante toda la noche a 37°C en placas de LB con o sin el agregado de $CuSO_4$ (0,75 mM). (B) Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional *wcaJ::lacZ* expresada en las cepas silvestre, $\Delta cuiD$, $\Delta rcsA \Delta cuiD$, $\Delta rcsB \Delta cuiD$, $\Delta rcsC \Delta cuiD$, $\Delta rcsD \Delta cuiD$, o $\Delta rcsF \Delta cuiD$. Las células fueron crecidas en las mismas condiciones que en (A). Los datos corresponden a valores promedio de cuatro experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Interesantemente, la formación de colonias mucosas por el agregado de Cu no se observó en anaerobiosis (Figura 4.3), sugiriendo que no es el metal el responsable directo de la activación del sistema Rcs, sino que el estrés que activa al sistema se genera específicamente por la toxicidad generada por el catión en presencia de oxígeno en la mutante $\Delta cuiD$.

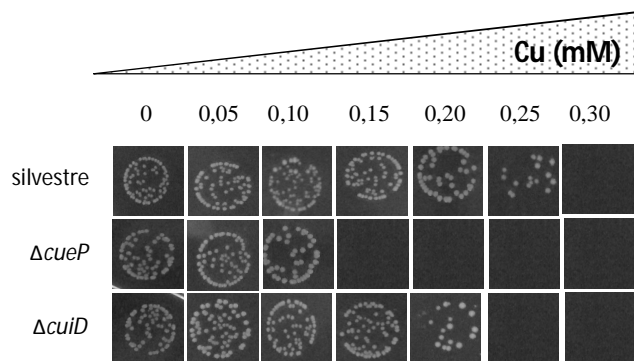


Figura 4.3. En ausencia de oxígeno, el Cu no induce el fenotipo mucoso en la cepa $\Delta cuiD$. Se muestran imágenes representativas de colonias de las cepas silvestre y mutantes $\Delta cueP$ y $\Delta cuiD$. Las células fueron crecidas en placas de LB agar con el agregado de cantidades crecientes de $CuSO_4$ durante 72 horas a 37°C en una jarra de anaerobiosis.

4.3. El sistema Rcs de *Salmonella* confiere resistencia a Cu

Se investigó el rol de cada uno de los componentes del sistema de fosfotransferencia así como también una cepa con una deleción en *wcaJ* incapaz de producir la cápsula de ácido colánico en la resistencia al Cu mediante experimentos de CIM al metal en placas de LB agar. Las colonias de las cepas mutantes $\Delta rcsB$ y $\Delta rcsF$ mostraron alteraciones en el crecimiento respecto a la cepa silvestre a concentraciones altas de Cu(II) (Figura 4.4). Sin embargo, en dichas condiciones no se observó ninguna alteración en el crecimiento de las colonias de la cepa mutante *wcaJ*, indicando que el fenotipo observado en las cepas $\Delta rcsB$ y $\Delta rcsF$ es producto de un efecto pleiotrópico. Esto sugiere que para hacer frente al estrés por Cu pueden estar involucrados otros factores controlados por el sistema Rcs, distintos a la cápsula de ácido colánico.

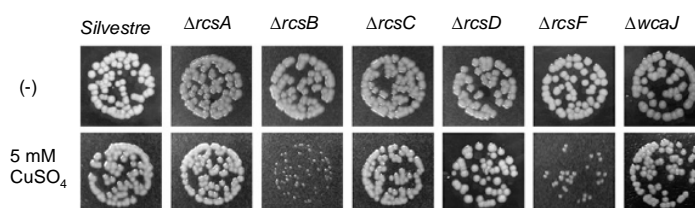


Figura 4.4. El sistema de respuesta a estrés periplasmático Rcs afecta la resistencia al Cu. Imágenes representativas de colonias de las cepas mutantes indicadas crecidas durante toda la noche a 37°C en placas de LB con el agregado de 5 mM CuSO₄.

Para completar el análisis sobre cómo influye el sistema Rcs en la resistencia a

cepa	CIM Cu (mM)
Silvestre (14028)	5,5
$\Delta cuiD$	1,25
$\Delta cuiD \Delta rcsA$	1,25
$\Delta cuiD \Delta rcsB$	1,25
$\Delta cuiD \Delta rcsC$	1,25
$\Delta cuiD \Delta rcsD$	1,25
$\Delta cuiD \Delta rcsF$	1,00
$\Delta cuiD wcaJ::mudJ$	1,00

Tabla 4.1. Participación del sistema Rcs en la resistencia al Cu en *Salmonella*. Valores de CIM determinados en placas de LB conteniendo cantidades crecientes de CuSO₄ en aerobiosis.

$\Delta rcsA$ y $\Delta cuiD \Delta rcsB$, si bien presentaron una CIM similar a la cepa simple mutante $\Delta cuiD$. Estos resultados indican que el sistema Rcs participa de la resistencia a Cu, siendo requerido para hacer frente al estrés generado por concentraciones elevadas del

Cu se llevaron a cabo los mismos ensayos de CIM utilizando como base una cepa mutante $\Delta cuiD$, sensible a Cu. Como puede observarse en la Tabla 4.1, las cepas que además de tener mutado *cuiD* poseen mutaciones en *rcsF* o *wcaJ* muestran un leve pero significativo descenso en la CIM de CuSO₄. Es importante destacar además que se observó una reducción en el tamaño de las colonias en las cepas mutantes $\Delta cuiD$

metal. Es posible que la producción de la cápsula de ácido colánico proteja a las células frente a altas concentraciones de Cu, efecto que se evidencia cuando uno de los mecanismos principales de detoxificación al metal está ausente.

4.4. La sobreexpresión de CueP alivia el estrés generado por Cu en la mutante $\Delta cuiD$

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis se reportó que CueP es la cuproproteína mayoritaria en el periplasma de *Salmonella* (Osman *et al.* 2010). Además, como se menciona al inicio del capítulo, la expresión ectópica de CueP desde un plásmido incrementa la resistencia a Cu en la cepa mutante $\Delta cuiD$. Teniendo en cuenta esto, se analizó el efecto de CueP en la activación del sistema Rcs por Cu así como también su capacidad para restablecer la resistencia al Cu en las cepas que presentaron mayor sensibilidad al metal por tener mutado alguno de los componentes del sistema Rcs.

Como primera medida, se investigó si la sobreexpresión de CueP es capaz de interferir en el estrés que desencadena la activación del sistema Rcs en la cepa sensible al metal $\Delta cuiD$. Para llevar a cabo dicho objetivo, se plantearon dos estrategias que consisten tanto en la observación fenotípica de la formación de la cápsula de ácido colánico como en la medición de la expresión transcripcional de *wcaJ*. Observamos que la sobreexpresión de CueP en la mutante $\Delta cuiD$ restablece el fenotipo silvestre, o sea, la desaparición del aspecto mucoso de las colonias en presencia de concentraciones subletales de Cu (Figura 4.5A).

A su vez, la sobreexpresión de CueP redujo a niveles basales la transcripción de *wcaJ* (Figura 4.5B). Estos resultados indican que la sobreexpresión de CueP alivia el estrés periplasmático causado por Cu, responsable de la activación del sistema Rcs en la cepa sensible $\Delta cuiD$. Cabe destacar, que si bien CueP no es capaz de restablecer completamente la resistencia silvestre a Cu de la cepa $\Delta cuiD$, impide la activación del sistema Rcs y por ende suprime la síntesis de ácido colánico. Esto sugiere que en la cepa $\Delta cuiD$, CueP está disminuyendo el estrés generado por Cu, probablemente bajando la concentración libre de Cu en el periplasma e impidiendo así la activación del sistema Rcs.

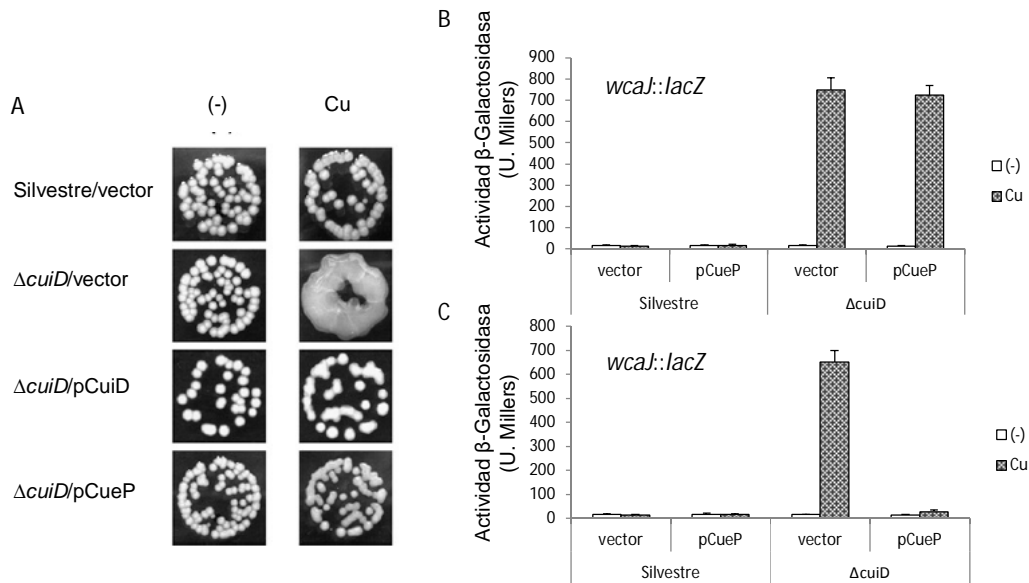


Figura 4.5. CueP revierte la activación del sistema Rcs inducida por Cu. (A) Imágenes representativas de colonias de las cepas indicadas crecidas durante toda la noche a 37°C en placas de LB suplementadas con IPTG (0,5 mM) con o sin el agregado de 0,75 mM de CuSO₄ (B,C) Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional *wcaJ::lacZ* expresada en las cepas silvestre, y mutante $\Delta cuiD$ transformadas con el plásmido pUHE-21-2*lacI*^q (vector) o pCueP. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en placas de LB con o sin el agregado de 0,75 mM CuSO₄ y con (C) o sin (B) el agregado de 0,5 mM IPTG. Los datos corresponden a valores promedio de cuatro experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Luego se llevaron a cabo medidas de CIM para el metal en las cepas mutantes

cepa	CIM Cu (mM)	
	vector	pCueP
Silvestre (14028)	5,5	No determinada
$\Delta cuiD$	1,25	1,75
$\Delta cuiD \Delta rcsA$	1,25	1,75
$\Delta cuiD \Delta rcsB$	1,25	1,75
$\Delta cuiD \Delta rcsC$	1,25	1,75
$\Delta cuiD \Delta rcsD$	1,25	1,75
$\Delta cuiD \Delta rcsF$	1,00	1,75

Tabla 4.2. Participación de CueP en la tolerancia al Cu en cepas sensibles mutantes en el sistema Rcs de *Salmonella*. Valores de CIM determinados en placas de LB conteniendo cantidades crecientes de CuSO₄ en presencia de oxígeno. Como vector de expresión se utilizó el plásmido pUH21-2*lacI*^q y la inducción de CueP se produjo por el agregado de IPTG a 0,2 mM de concentración final.

dobles en *cuiD* y en cada uno de los genes que codifican para los componentes del sistema de fosfotransferencia y sobreexpresando CueP (Tabla 4.2). Este último contrarrestó parcialmente el fenotipo de sensibilidad al metal de las cepas mutantes *cuiD* independientemente de la presencia de cada uno de los componentes del sistema Rcs, alcanzándose en todos los casos el mismo valor de CIM. La sobreexpresión de CueP restauró

además el fenotipo de mayor sensibilidad al Cu provocado por la mutación en *rcsF*.

Teniendo en cuenta estos resultados se propone que *Salmonella* puede inducir la síntesis de exopolisacáridos a través del sistema de fosfotransferencia Rcs como una

respuesta defensiva frente a la toxicidad por Cu(II) en situaciones donde las proteínas periplasmáticas CuiD y CueP no son funcionales. La activación del sistema Rcs dependiente de Cu podría tener implicancias fisiológicas afectando la virulencia bacteriana.

4.5. La función protectora de CueP no está vinculada a la reparación de los puentes disulfuros incorrectos en el periplasma

Como se menciona en la Introducción, en *E. coli* se observó que el Cu fomenta la formación de puentes disulfuro inespecíficos en proteínas periplásmicas (Hiniker *et al.* 2005). Esto provoca un estrés que puede evidenciarse por una mayor sensibilidad al metal en cepas mutantes en genes que codifican para tiorredoxinas y para las disulfuro oxidoreductasas tales como DsbC y DsbD (Hiniker *et al.* 2005). Esto se debe, a que las tiorredoxinas ceden electrones a DsbD manteniéndola en su forma reducida y activa, la cual es capaz de ceder sus electrones a diferentes proteínas periplásmicas, incluyendo a DsbC. DsbC reducida puede rearrreglar los puentes disulfuros incorrectos reparando así los daños producidos por el Cu (Hiniker *et al.* 2005). Cabe destacar, que este efecto fue observado en aerobiosis y sólo para Cu y no para otros metales ensayados tales como Ag(I), Mn(II), Fe(III), Zn(II), Ni(II) y Co(II) (Hiniker *et al.* 2005).

El estado de los enlaces disulfuro ha sido reportado como modulador del sistema de fosfotransferencia Rcs, promoviendo la expresión del operón *wca* responsable de la síntesis de la cápsula (Lin *et al.* 2009). En *Salmonella*, se observó que las dobles mutantes *dsbA srgA*, *dsbA dsbL* o *dsbB dsbI* presentan un fenotipo mucoide, con lo cual la expresión de los genes *wca* puede utilizarse para monitorear el estado de los enlaces disulfuro en el periplasma (Lin *et al.* 2009).

CueP presenta 3 cisteínas conservadas en las posiciones 96, 104 y 172. Se reportó que si bien CueP no posee un dominio funcionalmente caracterizado, sí presenta residuos de cisteínas conservadas cercanas en el espacio capaces de formar puentes disulfuros (Yoon *et al.* 2013). El agregado de CuCl₂ es capaz de inducir la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 96 y 104 (vinculado a la detoxificación directa por reducción del catión a Cu elemental) mientras que sin el agregado del metal se detectó la formación de un puente disulfuro entre los residuos 96 y 172 (Yoon, Yeom, *et al.* 2014). Además, se reportó que la disulfuro isomerasa DsbC es capaz de reducir la forma oxidada de CueP actuando sobre los residuos de cisteína 104 y 172

completando el ciclo y dejándola disponible para una nueva reacción (Yoon, Kima, *et al.* 2014). La protección de CueP frente al exceso de Cu podría deberse a la detoxificación del metal por unión o expulsión del mismo, o bien a un mecanismo indirecto de reparación del daño causado por el exceso del catión.

Según un análisis llevado a cabo previamente (L. B. Pontel, Tesis Doctoral), aplicando el algoritmo PSI-BLAST para la búsqueda de proteínas con homología a CueP, se encontró como proteína de función conocida, a la proteína DSBA oxidoreductasa de *Oceanospirillum* sp. MED92 (ZP_01166375.1) (30 % de identidad con CueP desde el aminoácido 30 al 134) (Figura 4.6). DSBA (nótese el uso de mayúsculas) es una familia (Pfam PF01323) que contiene un plegamiento del tipo tiorredoxina (PF00085) y que se encuentra dentro del clan de familias del tipo tiorredoxinas (CL0172) (Kadokura *et al.* 2003).

Identidad = 24/80 (30%), Positivos = 39/80 (48%), Espacios en blanco = 5/80 (6%)

CueP	60	DKFYLSFAPYEWRTHPCFNHSLSGCQGEKMPNKPFTV-KVTDSKGAIVVQ---KEMQSYRN	115
		D ++ S +P+ + H F Q E+ KPF + +V + GAV ++ K Q+YR	
DSBA	6	DYYFTSLSPFTYLGHTRFLELAKQAQAEISYKPFIIISQVVFANSGAVALKDRPKPRQAYRL	65
CueP	116	GFIGVW-LPRNMEGTLEVS Y	134
		+ W RN+ TL +Y	
DSBA	66	VELERWGRKRNLEPLTLHPAY	85

Figura 4.6. PSI-BLAST de CueP sin su péptido señal. La proteína sin los primeros 21 aminoácidos fue analizada contra la base de datos no redundantes del NCBI utilizando un valor E de 100 y el algoritmo PSI-BLAST. El alineado corresponde a una de las primeras proteínas de función conocida para la región comprendida desde las posiciones 60 a 134 de CueP, lo que corresponde con la región central de la proteína.

Las tiorredoxinas son pequeñas proteínas que participan en reacciones de óxido-reducción mediante la oxidación reversible de un puente disulfuro activo (Nakamura 2005). En este contexto, se indagó si el rol fisiológico de CueP está relacionado con la reparación de puentes disulfuro incorrectos provocados por la presencia de Cu.

Se construyeron mutantes en distintas disulfuro isomerasas presentes en *Salmonella*. Teniendo en cuenta reportes anteriores (Lin *et al.* 2009), se contemplaron además de a los genes caracterizados *dsbA*, *dsbC* y *srgA*, a los genes *scs*, que al igual que CueP, son genes específicos de *Salmonella*, con lo cual, se puede especular con la posibilidad de que CueP sea capaz de reparar el daño sufrido específicamente en estas mutantes (Gupta *et al.* 1997; Miki *et al.* 2004). Estos genes presentan homología a tiorredoxinas y proteínas de intercambio de tiol-disulfuro y restablecieron la resistencia al Cu en una cepa de *E. coli* mutante en *cutF* sensible al metal (Gupta *et al.* 1997; Gupta *et al.* 1995). Se construyeron las mutantes de los genes *dsbA*, *dsbC*, *srgA*, *scsA* y del

operón *scsBCD* y las mutantes dobles *dsbA dsbC*, *dsbA srgA*, *dsbA scsA* y *dsbA scsBCD*. Se eligió *dsbA* por codificar el principal responsable de la formación de puentes disulfuro generales, y debido a que su mutación provoca un fenotipo pleiotrópico que incluye la activación del sistema Rcs (Lin *et al.* 2009). Se llevaron a cabo ensayos de medida de actividad β -galactosidasa con la fusión reportera *wcaJ::lacZ* utilizando cultivos en medio LB líquido estáticos y a 37°C en presencia del agente reductor DTT, reproduciendo las condiciones ya descritas para activar al sistema Rcs (Lin *et al.* 2009). Como se observa en la Figura 4.7, el estrés generado se evidencia en la cepa doble mutante $\Delta dsbA \Delta srgA$ y sólo en presencia de DTT.

Inicialmente, se especuló con que el Cu contribuiría a la generación del daño en el periplasma induciendo al sistema Rcs; sin embargo, su presencia produjo un marcado descenso en la activación de dicho sistema respecto a la misma condición sin el agregado del metal. Una posible explicación es que el Cu(II) esté reaccionando como un

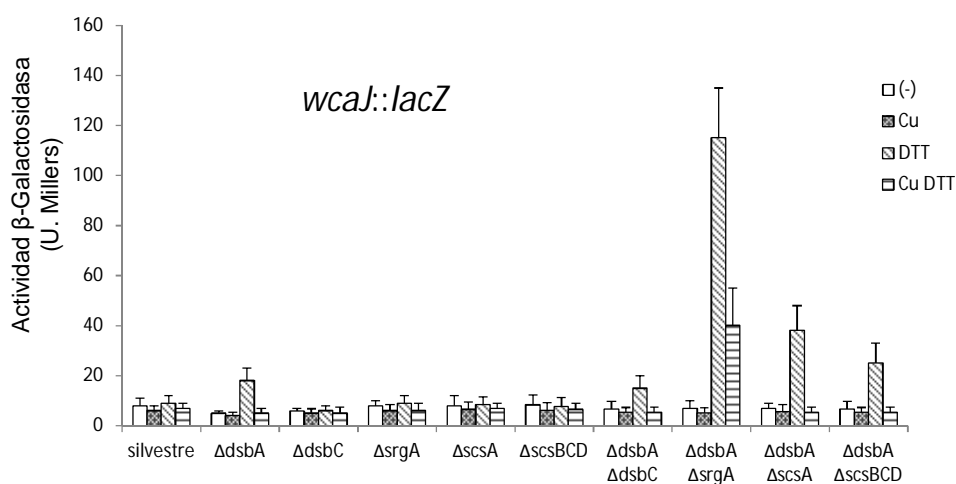


Figura 4.7. Mutantes en disulfuro oxido reductas activan el sistema Rcs. Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional *wcaJ::lacZ* expresada en las cepas silvestre, $\Delta dsbA$, $\Delta dsbC$, $\Delta srgA$, $\Delta scsA$, $\Delta scsBCD$, $\Delta dsbA \Delta dsbC$, $\Delta dsbA \Delta srgA$, $\Delta dsbA \Delta scsA$, $\Delta dsbA \Delta scsBCD$. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB líquido sin agitación con o sin el agregado de 1 mM CuSO_4 y con o sin el agregado de 1 mM DTT. Los datos corresponden a valores promedio de cuatro experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

par redox con el DTT, reduciéndose a Cu(I) y neutralizando así el efecto del DTT en la inducción del sistema Rcs. Es por esto, que para evaluar el efecto del Cu sin interferencias, debieron encontrarse condiciones alternativas de activación del sistema Rcs que no requieran de la presencia de DTT.

Se observó que al crecer las mismas cepas mutantes en medio sólido (placas de LB), no se requiere del agregado de DTT para generar el estrés que activa al sistema

Rcs. Nuevamente, se detectó la mayor inducción en la cepa doble mutante $\Delta dsbA \Delta srgA$ con lo cual se siguió trabajando sólo con esta cepa. El agregado de Cu nuevamente anuló la activación del sistema Rcs en estas condiciones, lo que nos lleva a especular con que el Cu puede estar induciendo sistemas que de alguna forma alivien el estrés o bien estaría actuando en forma directa catalizando la formación de puentes disulfuro que en un entorno silvestre se llevarían a cabo por DsbA. Un efecto similar fue encontrado en una cepa mutante *dsbA* de *E. coli*. Se observó que dicha mutación impide formar el único puente disulfuro presente en la proteína del motor flagelar FlgI requerido para el plegamiento de la misma, comprometiendo severamente su motilidad y el agregado de Cu en dicha cepa es capaz de catalizar la formación del puente disulfuro en FlgI, restaurando la motilidad (Hiniker *et al.* 2005).

Finalmente, para evaluar si CueP es capaz de intervenir en la homeostasis de puentes disulfuro en el periplasma de *Salmonella*, se analizó si se producen cambios en los niveles de estrés al variar los niveles de CueP en el periplasma, sobreexpresándola desde un plásmido inducible. Como se observa en la Figura 4.8, la sobreexpresión de CueP produce una disminución en la expresión de *wcaJ* aunque no es significativa como para atribuirle un rol en la formación o reparación de puentes disulfuros incorrectos.

Una explicación alternativa de los resultados mostrados previamente es que CueP interactúe con alguno de los componentes del sistema Rcs, inactivándolo. En consecuencia, la sobreexpresión de CueP modularía a Rcs en cualquier condición de activación, no sólo en la respuesta a cobre. En este contexto, el hecho de no observarse un descenso en los niveles transcripcionales del reportero del sistema Rcs *wcaJ::lacZ* ante un estrés generado por la alteración en la formación de los puentes disulfuros correctos en las proteínas periplásmicas independientemente de la presencia de Cu, sugiere que la sobreexpresión de CueP no imposibilita la transducción de la señal por parte del sistema Rcs. Alternativamente, la inactivación del sistema Rcs dependería de la forma unida a Cu de CueP y no de la forma no metalada. En conjunto, estos resultados sugieren que el estrés periplásmico generado por Cu capaz de activar al sistema Rcs puede ser aliviado por la sobreexpresión de CueP pero dicho alivio no está vinculado a la reparación de puentes disulfuro incorrectos en las proteínas.

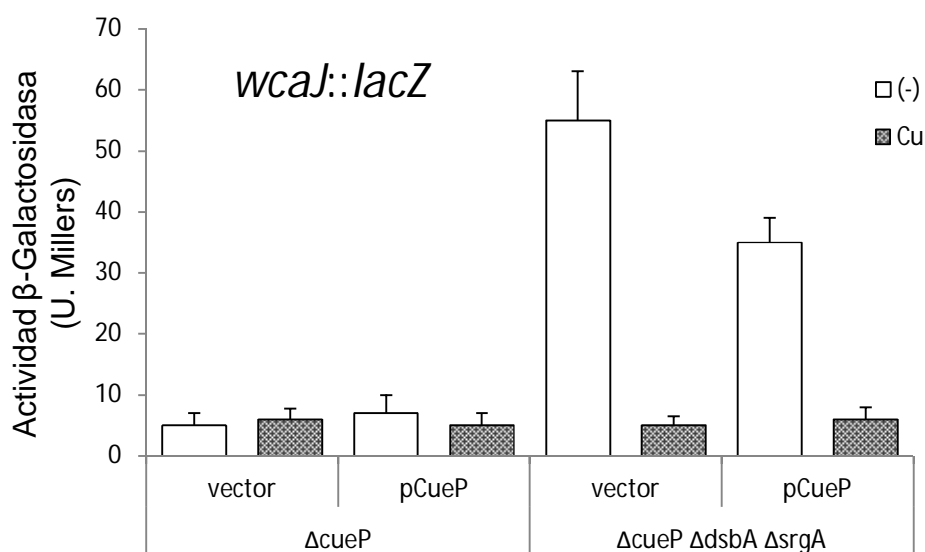


Figura 4.8. CueP no revierte significativamente la activación del sistema Rcs inducida por estrés en el estado de los puentes disulfuro periplasmáticos. Medidas de actividad β-Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional *wcaJ::lacZ* expresada en las cepas $\Delta cueP$ y $\Delta cueP \Delta dsbA \Delta srgA$, transformadas con el plásmido pUH21-2*lacI*^q (vector) o pCueP. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en placas de LB con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄ y la inducción de CueP se produjo por el agregado de IPTG a 0,5 mM de concentración final. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

4.6. Conclusiones Capítulo I

En este capítulo se evaluó la relación del sistema de respuesta a estrés periplásmico Rcs con el estrés por Cu, analizando la participación de CueP en la reparación del daño ocasionado por el metal.

- Determinamos que el crecimiento en presencia de concentraciones subletales de Cu provoca la formación de colonias de aspecto mucoso en la cepa sensible al metal $\Delta cuiD$ y que este fenotipo depende de la activación del sistema Rcs que promueve la síntesis de la cápsula de ácido colánico en dicha condición.
- Utilizando mutantes en los componentes del sistema Rcs demostramos que dicho sistema confiere resistencia a Cu independientemente de la cápsula, aunque en ciertas condiciones, como por ejemplo la ausencia de CuiD, el ácido colánico protege a las células del estrés por Cu.
- La sobreexpresión de CueP alivió el estrés por Cu generado en la cepa

cuiD, y previno la activación del sistema Rcs.

- El mecanismo por el cual CueP alivia el estrés periplasmático no está vinculado a la reparación de puentes disulfuros incorrectos ya que su sobreexpresión no fue capaz de disminuir este tipo de estrés en la cepa mutante $\Delta dsbA \Delta srgA$.

5. Capítulo II

“Aspectos mecanísticos y fisiológicos de la regulación de la expresión de *cueP*”

5.1. *cueP* forma parte del regulón Cpx

5.1.1. La expresión transcripcional de *cueP* está regulada diferencialmente dentro del regulón Cue

Utilizando fusiones reporteras de cada uno de los miembros del regulón Cue de *Salmonella*, se observó que en medio mínimo SM9 el agregado de Cu induce la transcripción de *copA* y *cuiD* pero no la de *cueP* (L. B. Pontel, Tesis Doctoral). La fuente de carbono utilizada en estas condiciones es glucosa, que luego de ser metabolizada por la bacteria, reduce el pH del medio de cultivo (Samelis *et al.* 2003). Debido a que la mayoría de los estudios previamente mostrados se realizaron en LB, se analizó el efecto del agregado de 0,2 % glucosa a este medio. Sorprendentemente, no se observó activación de *cueP* por Cu en esta condición, y lo mismo sucede cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono (L. B. Pontel, Tesis Doctoral).

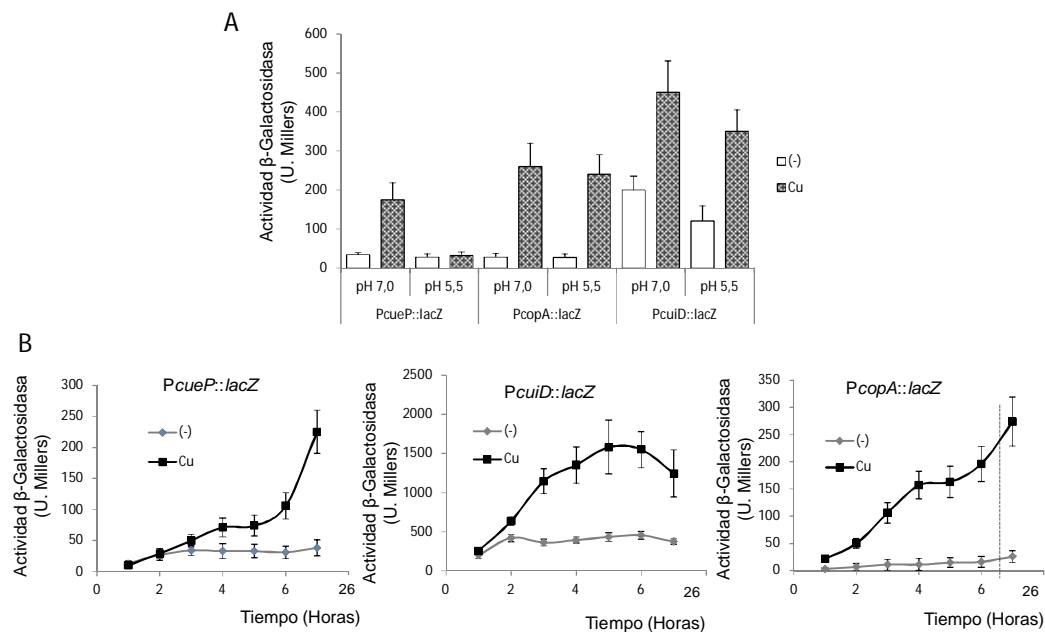


Figura 5.1. Expresión diferencial del promotor de *cueP* dentro del regulón Cue. (A,B) Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de las fusiones transcripcionales *PcueP::lacZ*, *PcopA::lacZ* y *PcuiD::lacZ*, expresadas en un entorno silvestre. En (A) se muestra la expresión de las fusiones en células crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO_4 . En (B) se muestra el perfil de expresión a lo largo de una curva de crecimiento. Alícuotas de células crecidas durante toda la noche en medio LB fueron diluidas en el mismo medio fresco con o sin el agregado de 1 mM CuSO_4 e incubadas con agitación a 37°C. En los tiempos indicados, se tomaron alícuotas del cultivo para determinar DO_{600} y actividad β -Galactosidasa. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En todos estos casos se detectó acidificación del medio de cultivo, y por lo tanto se planteó la posibilidad de que la acidificación del medio inhiba la activación por cobre de *cueP*. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la expresión de *cueP* en LB tamponado a pH 5,5 o pH 7,0 y con el agregado de 1 mM CuSO₄ como señal inductora. Como se observa en la Figura 5.1A, a diferencia de los otros componentes del regulón Cue, la expresión de *cueP* no se induce por Cu a pH ácido.

Se analizó el perfil de activación por Cu en función del tiempo de los componentes del regulón Cue (Figura 5.1B). Nuevamente, se observó un comportamiento diferencial en la activación de *cueP* con un retraso temporal relativo en la inducción de su transcripción por el metal respecto a los otros componentes del regulón. Este comportamiento se asemeja a la expresión del locus *cus* de *E. coli* (Thieme *et al.* 2008) sumando una semejanza más al paralelismo en cuanto a la resistencia a Cu de CueP con el sistema Cus presente en el resto de las enterobacterias.

5.1.2 La región comprendida entre las bases -45 y -80 en el promotor de *cueP* es responsable de la regulación transcripcional diferencial

Para profundizar en el análisis de la regulación transcripcional de *cueP* por pH indagamos acerca de elementos en su promotor responsables de este efecto. Se llevó a cabo una disección de la región promotora de *cueP*, clonando fragmentos de diferentes tamaños de dicha secuencia corriente arriba del gen que codifica para la enzima β -galactosidasa (*lacZ*) en el vector pMC1871 (Pharmacia, Inc.). En la Figura 5.2A, se observan las distintas construcciones y las respectivas medidas de actividad β -galactosidasa.

Observamos regulación transcripcional por pH en las construcciones pMC::*PcueP*-170, pMC::*PcueP*-135 y pMC::*PcueP*-80 mientras que con la construcción pMC::*PcueP*-45 este efecto se pierde (Figura 5.2B) sugiriendo que en la región comprendida entre los sitios -45 y -80 respecto al sitio de inicio de su transcripción existen elementos capaces de afectar su expresión en función de la acidez del medio. A dicha región se la denominó “caja de respuesta ácida”.

Para analizar la importancia de esta región en la transcripción de *cueP* en condiciones fisiológicas, eliminamos la región comprendida entre las bases -80 y -45 de este promotor en el cromosoma de *Salmonella* (nucleótidos en posición 3850410 y

3850445). Con esta modificación comparamos la transcripción basal y la inducción mediada por Cu entre esta mutante y la cepa silvestre. En la Figura 5.2C se observa que en la mutante la delección suprime el efecto diferencial del pH sobre la expresión de *cueP* reportándose niveles transcripcionales basales en todos los casos ensayados. Estos resultados sugieren que existen elementos clave para permitir la inducción de *cueP* y que tales elementos se encuentran entre las bases -45 y -80 de su promotor (corriente arriba del sitio de reconocimiento para CueR).

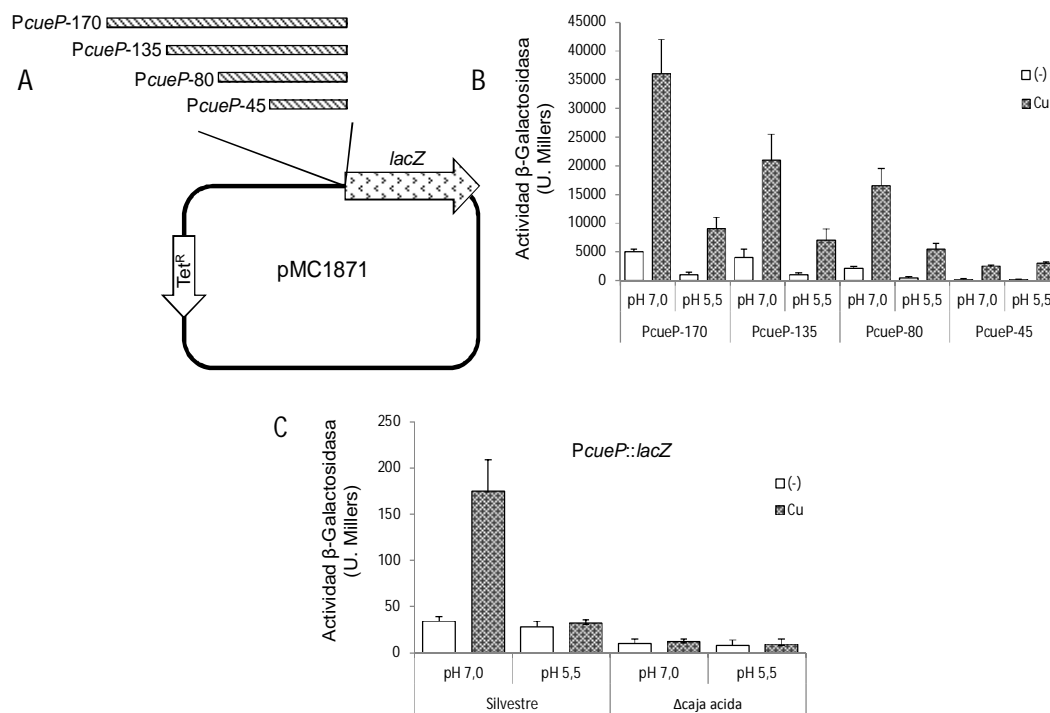


Figura 5.2. La región comprendida entre las bases -45 y -80 posee un elemento clave en la regulación de la transcripción diferencial de *cueP*. (A) Esquema de la disección del promotor de *cueP* en sendas fusiones transcripcionales reporteras utilizando el plásmido pMC1871. (B) Medidas de actividad β-Galactosidasa (Unidades Millers) de las fusiones transcripcionales mostradas en (A) expresadas en un entorno silvestre. (C) Medidas de actividad β-Galactosidasa (Unidades Millers) de las fusión reportera cromosomal *PcueP::lacZ* expresada tanto en un entorno silvestre como en una cepa donde se delecionó la región comprendida entre las bases -45 y -80 en el promotor de *cueP* (Δcaja ácida). Tanto en (B) como en (C) las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Teniendo en cuenta que CueP es una proteína de respuesta a estrés por Cu presente en el periplasma, y debido a que *Salmonella* carece de un sensor periplasmático específico para Cu, se realizó una búsqueda informática para detectar posibles blancos de regulación de sistemas de respuesta a estrés periplasmático como BaeR, RcsB, y CpxR, para los que se conocen las secuencias operadoras (Hobman *et*

al. 2007). Generamos matrices de probabilidad dependiente de la posición para la secuencia consenso de unión de cada uno de estos reguladores usando MEME (Bailey *et al.* 2006). Estas matrices describen la probabilidad de que ocurra una base dada en una determinada posición, generando además un consenso. Con cada matriz generada, analizamos mediante MAST (Bailey y Gribskov 1998) una región del genoma de *Salmonella* de 500 pb que incluye la región promotora de *cueP*. Este programa busca la ocurrencia de la matriz de probabilidad proveniente de MEME en una determinada secuencia. Detectamos un sitio putativo para la unión de CpxR corriente arriba del sitio de unión a CueR y dentro de la “región de respuesta a ácido” delimitada anteriormente. Dicho sitio se ajusta al consenso con un *p-value* de $7,23 \cdot 10^{-5}$ (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)). En *E. coli*, la secuencia consenso para el sitio de reconocimiento de CpxR es GTAAA(N₄₋₈)GTAAA (Yamamoto y Ishihama 2006), siendo la caja putativa hallada entre las bases -64 y -50 del promotor de *cueP* GTAAA(N₅)GCAAA. Interesantemente, se reportó la activación por Cu del sistema CpxR/CpxA en *E. coli* aunque su rol en la homeostasis metálica aún se desconoce (Yamamoto y Ishihama 2005; Kershaw *et al.* 2005).

CpxR/CpxA es un sistema de dos componentes que responde a diversas situaciones de estrés periplasmático (Pogliano *et al.* 1997; Vogt y Raivio 2012; Yamamoto y Ishihama 2006). Por lo tanto, tal como se describió en el capítulo I con el sistema Rcs, podemos relacionar el estrés por Cu con otro sistema de respuesta a estrés en dicho compartimento. Como se menciona en la Introducción, dicho sistema está compuesto por una proteína sensora de membrana interna CpxA, que activa por fosforilación al regulador respuesta citoplasmático CpxR. Este último controla la transcripción de ciertos genes como *degP*, *ppiA*, *ppiB*, *dsbA*, *cpxP*, y del propio *cpxRA* que contribuyen a aliviar desórdenes en la homeostasis de la envoltura bacteriana (Raivio 2014; Pogliano *et al.* 1997; Danese y Silhavy 1997). Dichos desórdenes se relacionan con la presencia de proteínas mal plegadas y/o alteraciones en los lípidos de la membrana interna (Danese y Silhavy 1997). Entre las principales señales de activación de este sistema se distinguen la sobreexpresión de la proteína periplasmática NlpE, la adhesión a superficies (Otto y Silhavy 2002) y el pH alcalino (DiGiuseppe y Silhavy 2003). Esto último sustenta la posibilidad que la expresión

transcripcional de *cueP* afectada por pH se deba a la acción del regulador transcripcional CpxR que actúe como un modulador positivo en dicho proceso.

5.1.3. CpxR y CueR co-regulan la expresión de *cueP*

5.1.3.1. CpxR regula la expresión de *cueP*

Para analizar si CpxR controla la transcripción de *cueP* se construyó una cepa mutante en *cpxR* y se analizó su rol en la activación transcripcional de *cueP*. Como se muestra en la Figura 5.3A, no se observó inducción transcripcional del promotor de *cueP* en presencia de Cu en la mutante $\Delta cpxR$ a pH 7,0, indicando que CpxR controla de manera positiva esta inducción. La complementación, llevada a cabo expresando CpxR desde el plásmido inducible por IPTG, pCpxR, restituyó los valores silvestres de expresión transcripcional (Figura 5.3A), corroborando que CpxR activa la transcripción de *cueP* en presencia de Cu. Utilizando fusiones reporteras en *cuiD* y *copA* verificamos que la transcripción de dichos genes no está regulada por CpxR con lo cual se concluye que dentro del regulón Cue, sólo *cueP* está regulado por CpxR.

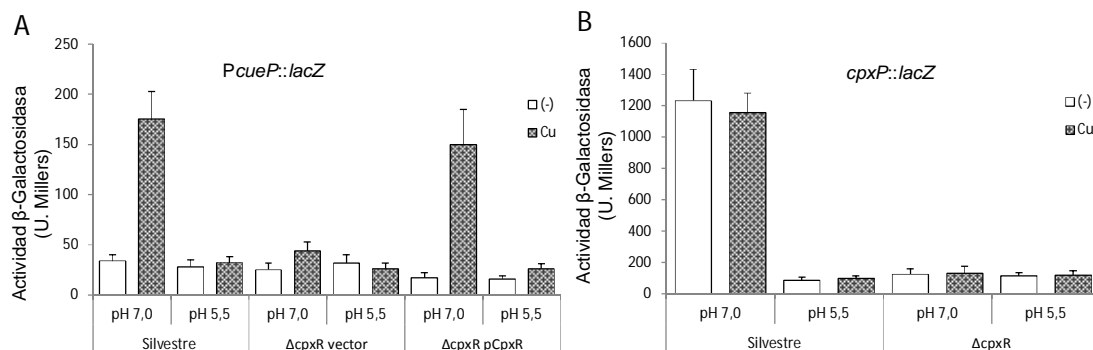


Figura 5.3. La expresión transcripcional inducida por Cu de *cueP* depende de CpxR. (A,B) Medidas de actividad β-Galactosidasa (Unidades Millers) de las fusiones transcripcionales reporteras *PcueP::lacZ* (A) y *cpxP::lacZ* (B) expresada tanto en un entorno silvestre como en la cepa mutante $\Delta cpxR$ transformada con el plásmido pUHE21-2*lacI*^H (vector) o pCpxR. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Como control experimental en el estudio de actividad transcripcional de los genes pertenecientes al regulón Cpx se utilizó la cepa reportera *cpxP::lacZ* (Vogt & Raivio 2012). Como se observa en la Figura 5.3B, ambas cepas reporteras *PcueP::lacZ* y *cpxP::lacZ* exhiben el mismo comportamiento en cuanto a la regulación por CpxR, observándose la inducción de la transcripción solamente en

presencia del regulador y cuando los cultivos se crecen a pH 7,0. De esta forma, se concluye que *cueP* forma parte del regulón Cpx.

Posteriormente se analizó el efecto individual de cada regulador sobre la transcripción y la inducción mediada por Cu de *cueP* (Figura 5.4). Se determinó que la acción de ambos reguladores en simultáneo es necesaria para activar la transcripción de *cueP*. CueR induce la expresión en presencia de Cu y CpxR hace lo propio cuando el sistema CpxR/CpxA se activa a pH 7,0.

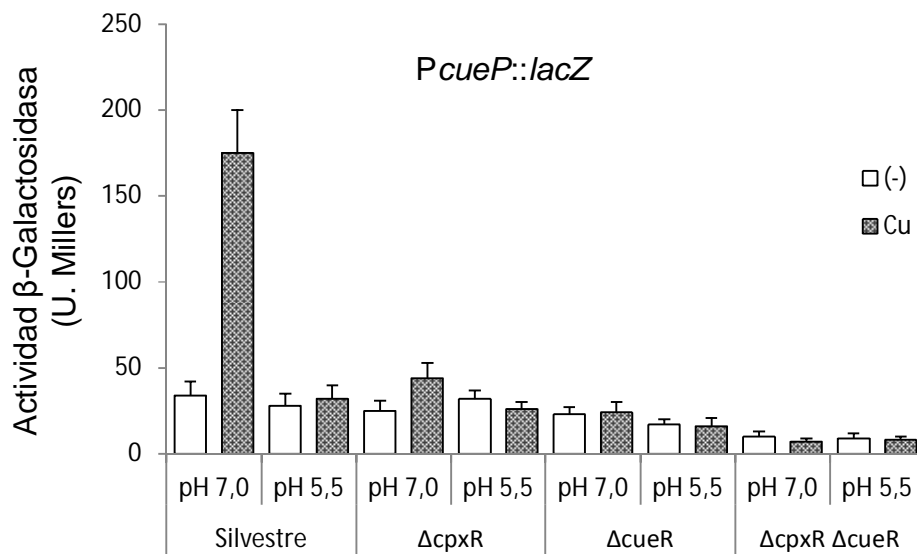


Figura 5.4. Tanto CueR como CpxR son necesarios para la expresión de *cueP*. Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional reportera *cueP::lacZ* expresada tanto en un entorno silvestre como en las cepas mutantes $\Delta cpxR$, $\Delta cueR$ y $\Delta cpxR \Delta cueR$. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM $CuSO_4$. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Cabe destacar, que en estudios transcripcionales previos usando microarreglos se observó inducción por Cu del regulón Cpx de *E. coli* y se confirmó por cuantificación del ARN mensajero mediante la técnica de “PCR en tiempo real” (Yamamoto y Ishihama 2005). En las medidas de actividad transcripcional de la cepa $P_{cueP}::lacZ$, y utilizando como control al reportero $cpxP::lacZ$, no observamos inducción por Cu dependiente de CpxR en las condiciones ensayadas (Figura 5.3). Posiblemente, cuando se crecen las células a pH 7,0, la activación de CpxR/CpxA provocada por el pH del medio “enmascara” a aquella generada por Cu (probablemente de menor magnitud). Sin embargo, sí se observó inducción de la transcripción de $cpxP::lacZ$ por Cu a pH 7,0 en cultivos crecidos hasta fase

exponencial (no mostrado), similar a lo reportado para *E. coli* (Yamamoto y Ishihama 2005).

5.1.3.2. Tanto CpxR como CpxA son necesarios para activar la transcripción de *cueP* de la forma clásica

Se determinó que CpxA es requerido para la activación de *cueP*, ya que la activación transcripcional del promotor de *cueP* sólo ocurre en el entorno silvestre (Figura 5.5), y la complementación con el plásmido pCpxR sólo restituye los valores de transcripción observados en el entorno silvestre en la cepa $\Delta cpxR$, y no en la cepa doble mutante $\Delta cpxRA$. Estos resultados indican que tanto CpxA como CpxR son necesarios para el monitoreo y la transducción de la señal respectivamente para activar la transcripción del promotor de *cueP*.

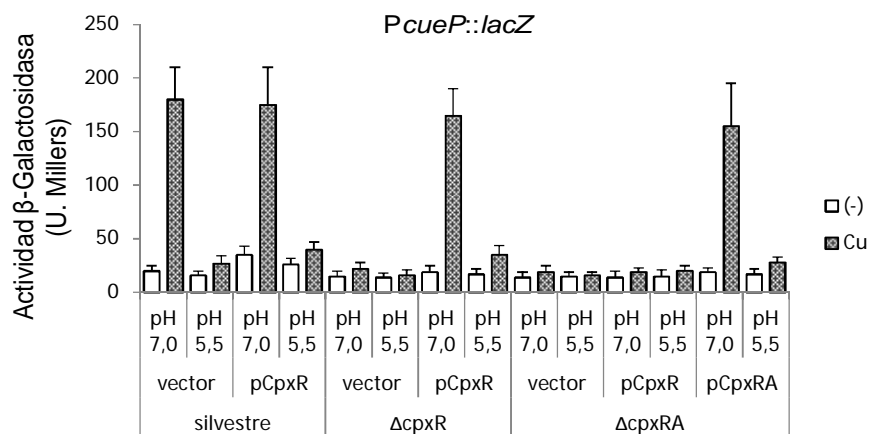


Figura 5.5. La expresión transcripcional de *cueP* inducida por Cu depende de la activación clásica del sistema CpxR/CpxA. Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional reportera *PcueP::lacZ* expresada tanto en un entorno silvestre como en la cepas mutantes $\Delta cpxR$ y $\Delta cpxRA$ transformadas con el plásmido pUHE-21-2 (vector), pCpxR o pCpxRA según se indique. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO_4 . Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

5.1.3.3. CpxR regula la expresión de *cueP* actuando en forma directa sobre su promotor

Se tuvieron en cuenta dos alternativas para analizar si CpxR ejerce una acción directa sobre el promotor de *cueP*. Se construyó una cepa mutante cromosomal mediante la técnica de “SOE PCR” seguida del método de “mutagénesis en un solo paso”, en la cual se modificaron bases dentro del sitio consenso para el reconocimiento de CpxR. Nuevamente se trabajó con la cepa reportera cromosomal

PcueP::lacZ y se midió actividad β -galactosidasa para determinar si la transcripción de *cueP* depende del sitio putativo de unión a CpxR.

En la Figura 5.6 se observan las bases modificadas en el sitio regulatorio así como también las correspondientes medidas de actividad β -galactosidasa que muestran un descenso en la actividad transcripcional en la cepa mutante. La construcción de esta cepa mutante implicó insertar un *cassette* de resistencia a Cm en la posición -80 del promotor de *cueP*. La inserción de este *cassette* frente al promotor silvestre de *cueP* no afectó su regulación ni por CpxR ni por CueR (Figura 5.6C).

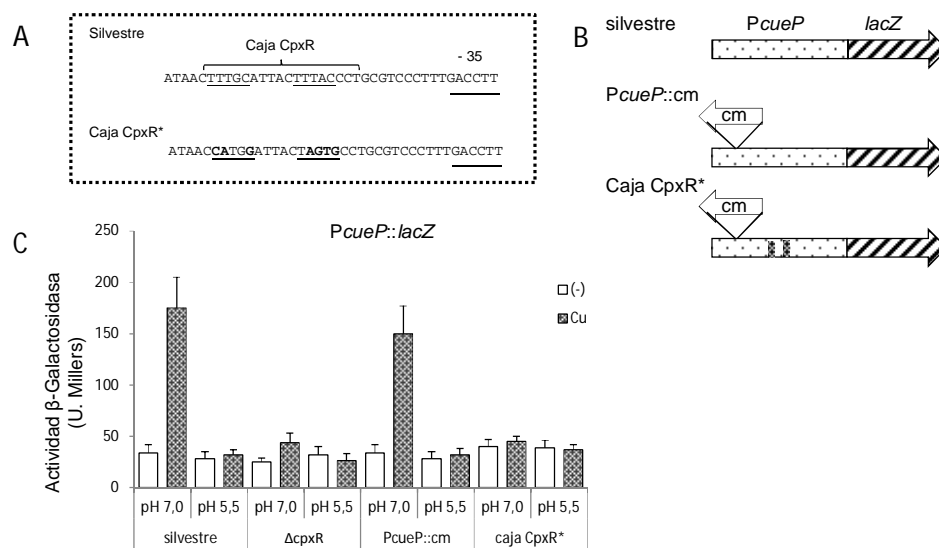


Figura 5.6. CpxR regula de forma directa la expresión de *cueP*. (A) Secuencia de ADN de la región promotora de *cueP* silvestre y mutante donde se cambiaron bases puntuales del sitio de reconocimiento para CpxR (caja CpxR*). Con líneas sólidas se indica la caja -35 y los dos hemisítios de la caja CpxR, en negrita se indican las bases cambiadas. (B) Esquema de las mutaciones en el promotor de las fusiones reporteras *PcueP::lacZ* utilizadas para mutar la caja CpxR en el promotor de *cueP*. (C) Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional reportera *PcueP::lacZ* expresada tanto en un entorno silvestre como en la cepa mutante Δ cpxR, además se muestran las medidas llevadas a cabo con las mutantes en el promotor de *cueP*, *PcueP::cm* y caja CpxR* mostradas en (B). Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Por otro lado se llevaron a cabo ensayos de retardo en la movilidad electroforética y de protección a la ADNasaI para caracterizar la interacción de ambos reguladores, CueR y CpxR, sobre el promotor de *cueP*. En la Figura 5.7 se observa un ensayo de protección a la ADNasaI utilizando tanto la hebra codificante como la hebra no codificante. Se determinó que tanto CueR como CpxR interaccionan con regiones específicas del promotor de *cueP*, independientemente de la presencia o

ausencia del otro. Además, se determinaron las bases del promotor de *cueP* protegidas por estos reguladores frente a la digestión por la ADNasaI.

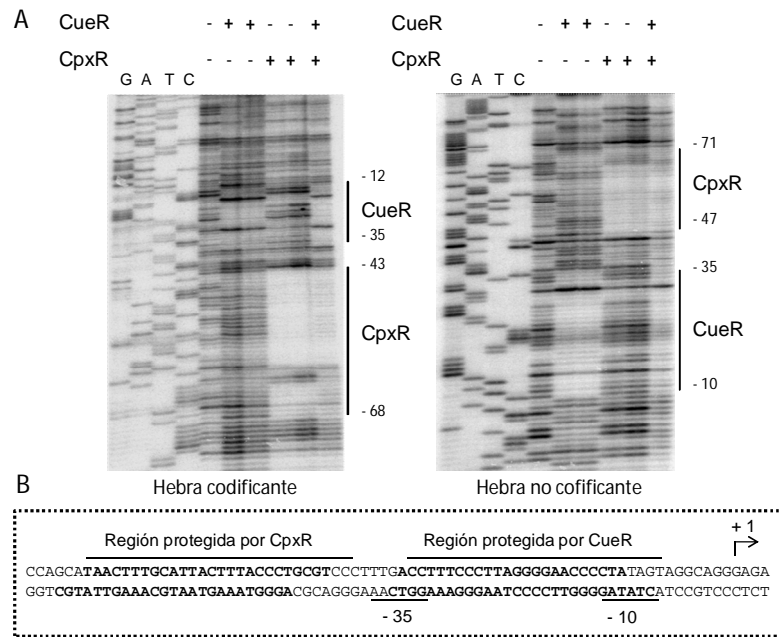


Figura 5.7. Mapeo de los sitios de unión de CueR y CpxR mediante análisis de ensayos de protección a la ADNasaI con la región promotora de *cueP*. (A) Ensayo de protección a la ADNasaI sobre la región promotora de *cueP* llevado a cabo marcando tanto la hebra codificante como la hebra no codificante. Los fragmentos de ADN fueron incubados con CueR purificada a las concentraciones finales de 5 y 10 μ M o con CpxR purificada y preincubada con acetil fosfato a las concentraciones finales de 5 y 10 μ M. Las líneas sólidas indican las regiones protegidas por CueR o CpxR indicándose además las bases correspondientes a los extremos de las regiones de protección generada por cada regulador (B) Secuencias de ADN de la región promotora de *cueP*. Las líneas por encima de la secuencia indican las regiones protegidas por la ADNasaI y en cada hebra la secuencia protegida se muestra en negrita.

Con el fin de corroborar que ambos reguladores son necesarios para el reclutamiento de la ARNP para la posterior formación del complejo abierto e inicio de la transcripción llevamos a cabo ensayos de protección de la ADNasaI, incluyendo tanto a los reguladores CueR y CpxR como a la ARNP.

Como se observa en la Figura 5.8, se ve protección debido a la unión de la ARNP en la correspondiente región promotora de *cueP* solamente cuando tanto CueR como CpxR, están interaccionando con la sonda. La protección generada por la unión de la ARNP se encuentra corriente abajo del sitio de unión de CueR e involucra al sitio de inicio de la transcripción reportado previamente (Pontel & Soncini 2009). En los promotores *mer*, en ausencia del regulador de tipo MerR unido a su inductor, la ARNP solo puede acceder a la caja -35 e incluso en presencia de apo-MerR, la ARNP se une en un sitio adyacente al regulador (corriente arriba) sin acceder a la caja -10 formando un complejo cerrado; la unión del inductor a MerR induce cambios en la

conformación del ADN que permiten la unión efectiva de la ARNP con las cajas -10 y -35 para formar el complejo abierto (Outten *et al.* 1999). En los promotores σ^{70} , la transcripción comienza al formarse una “burbuja” que en principio involucra a aproximadamente unos 14 pb rodeando al sitio de inicio de la transcripción dentro del centro catalítico del complejo abierto (Robb *et al.* 2013). De estos ensayos se concluye que tanto CueR como CpxR son necesarios para el reclutamiento de la ARNP y la formación del complejo abierto en el promotor de *cueP*.

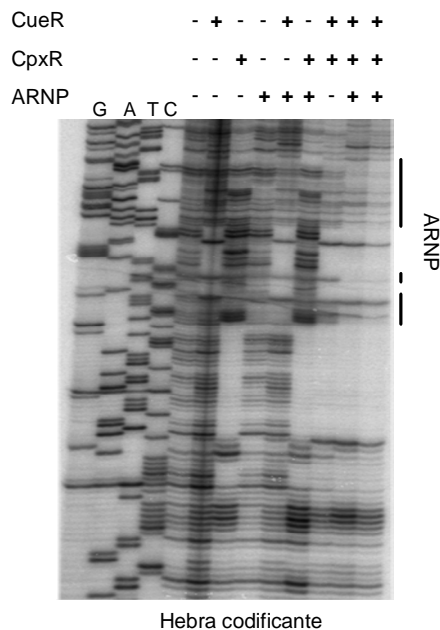


Figura 5.8. CpxR y CueR son necesarios para reclutar la ARNP en el promotor de *cueP* Ensayo de protección a la ADNasaI sobre la región promotora de *cueP* llevado a cabo marcando la hebra codificante. Los fragmentos de ADN fueron incubados con 10 μ M de CueR purificada, 10 μ M de CpxR purificada y preincubada con acetil fosfato, y con 0,05 μ M de ARNP (epicentro), según se indica. Las líneas sólidas indican las regiones protegidas por la ARNP detectadas solo con la adición simultánea de las tres proteínas. Además se indica el sitio de inicio de la transcripción (+1).

5.1.3.4. CpxR es esencial para el reclutamiento de la ARN Polimerasa sobre el promotor de *cueP*

Para evaluar el rol mecanístico tanto de CueR, como de CpxR en el proceso de formación del complejo abierto y posterior inicio de la transcripción, se analizó la activación transcripcional de *cueP* en una cepa mutante con una fusión reportera *lacZ* corriente abajo del promotor de *cueP* “independiente de CueR”. Generamos este promotor de *cueP* “independiente de CueR” delecionando dos bases en la región comprendida entre las cajas -35 y -10, de manera que estas dos cajas están separadas por 17 pb, espaciamiento óptimo para la transcripción. En la Figura 5.9 se observa que CueR no es requerida para la inducción de la transcripción en esta condición; sin embargo, el promotor todavía depende de la activación de CpxR. La falta de diferencias en cuanto a la inducción en un entorno silvestre y mutante en *cueR* en este

promotor “independiente de CueR” indica que dicho regulador no es esencial para el reclutamiento de la ARNP y el consiguiente inicio de la transcripción.

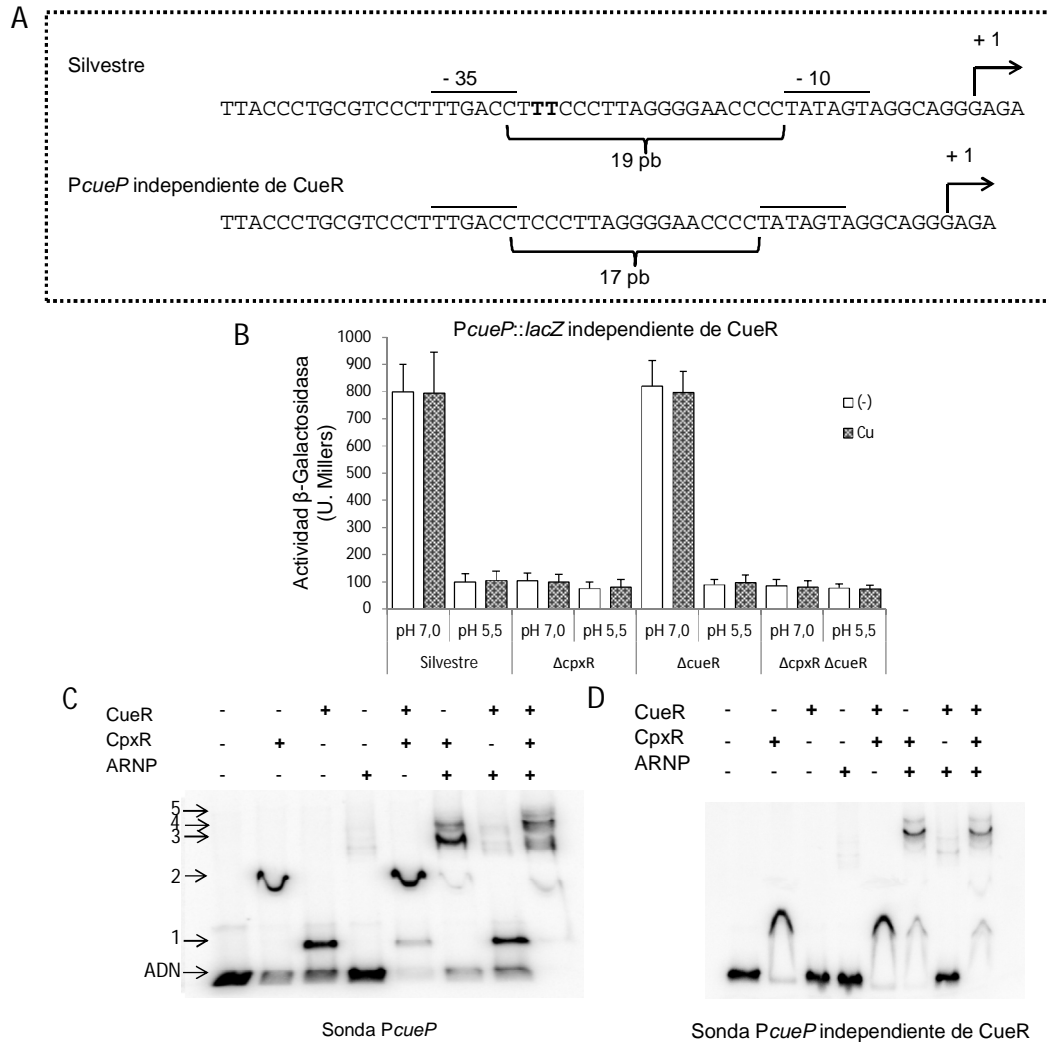


Figura 5.9. CueR facilita la orientación espacial de los elementos del promotor de *cueP* para favorecer una interacción productiva con la ARN Polimerasa (A) Secuencia de ADN de la región promotora de *cueP* silvestre e “independiente de CueR”. Las dos bases deletadas dentro del espaciamento entre los elementos -10 y -35 están marcadas en negrita. Se indican las cajas -10 y -35 (con líneas sólidas) y el sitio de inicio de la transcripción (+1 y flecha). **(B)** Medidas de actividad β-Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional reportera *PcueP::lacZ* bajo el promotor “independiente de CueR” expresada tanto en un entorno silvestre como en las cepas mutantes *ΔcpxR*, *ΔcueR* y *ΔcpxR ΔcueR*. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **(C,D)** Analisis de retardo de la movilidad electroforética llevado a cabo utilizando 6 fmol del fragmento amplificado por PCR de la región promotora de *cueP* silvestre (C) e «independiente de CueR» (D) marcado en el extremo 3' con ³²P con el agregado de 0,5 μM de CueR purificada, 0,5 μM de CpxR purificada y preincubada con acetil fosfato, y con 0,05 μM de ARNP (epicentro), según se indica. ADN indica el fragmento de PCR sin retardo, 1 y 2 son los fragmentos retardados por CueR y CpxR, respectivamente, de 3 a 5 se indican los super-retardos observados por la presencia de CpxR y la ARNP, o CpxR, CueR y la ARNP.

Si bien en ensayos *in vitro* se había determinado que la unión de cada uno de los reguladores era independiente de la presencia o ausencia del otro, con este experimento queda evidenciado *in vivo* que CpxR es capaz de unirse al promotor de *cueP* “independiente de CueR” y regular su expresión reclutando a la ARNP independientemente de la presencia de CueR.

Se llevaron a cabo experimentos *in vitro* de retardo de la movilidad electroforética utilizando tanto una sonda conteniendo la región promotora silvestre como una sonda del promotor “independiente de CueR”. Como se observa en la Figura 5.9C, se evidencia un retardo en la migración de la sonda silvestre cuando se incubaba tanto con CueR como con CpxR (bandas marcadas como 1 y 2). La interacción de la ARNP con el promotor de *cueP* produjo el retraso de una pequeña proporción de la sonda (abarcando la zona entre los puntos 3 y 5) indicando el requerimiento de factores adicionales que incrementen su afinidad por dicho promotor. La presencia de CpxR aumenta considerablemente el retardo causado por la interacción de la ARNP (especialmente en las posiciones 3 y 4), pero no ocurre lo mismo cuando se incubaba la sonda con la ARNP y CueR. Finalmente, el agregado simultáneo de los tres factores incrementa la intensidad de la banda 4 y genera una banda adicional, denominada 5 siendo evidente además la desaparición de la sonda libre de interacción. Cuando se utiliza la sonda “independiente de CueR” (Figura 5.9D) no se observa interacción con CueR y es suficiente la presencia de CpxR para promover la interacción total de la ARNP con dicha sonda, lo que sugiere que CpxR es requerido para el reclutamiento de la ARNP, mientras que CueR no interviene en dicho proceso.

Estos resultados nos llevan a postular el modelo que se presenta en la Figura 5.10. CueR interacciona con la región promotora de *cueP* para acomodar las cajas -10 y -35 en su conformación adecuada para ser reconocidas por la ARNP sin participar en el reclutamiento de la misma, mientras que CpxR puede interaccionar con el promotor de *cueP* independientemente de la presencia de CueR, y su presencia es relevante para el reclutamiento de la ARNP. Esta co-regulación de *cueP* por CueR y CpxR garantiza su expresión bajo condiciones de estrés por Cu que produzca un estrés periplasmático, situación fisiológicamente análoga a lo que ocurre en la mayoría de las enterobacterias donde el principal sistema de respuesta a Cu en

anaerobiosis (Cus) detecta una señal periplasmática de estrés por el exceso de Cu en anaerobiosis.

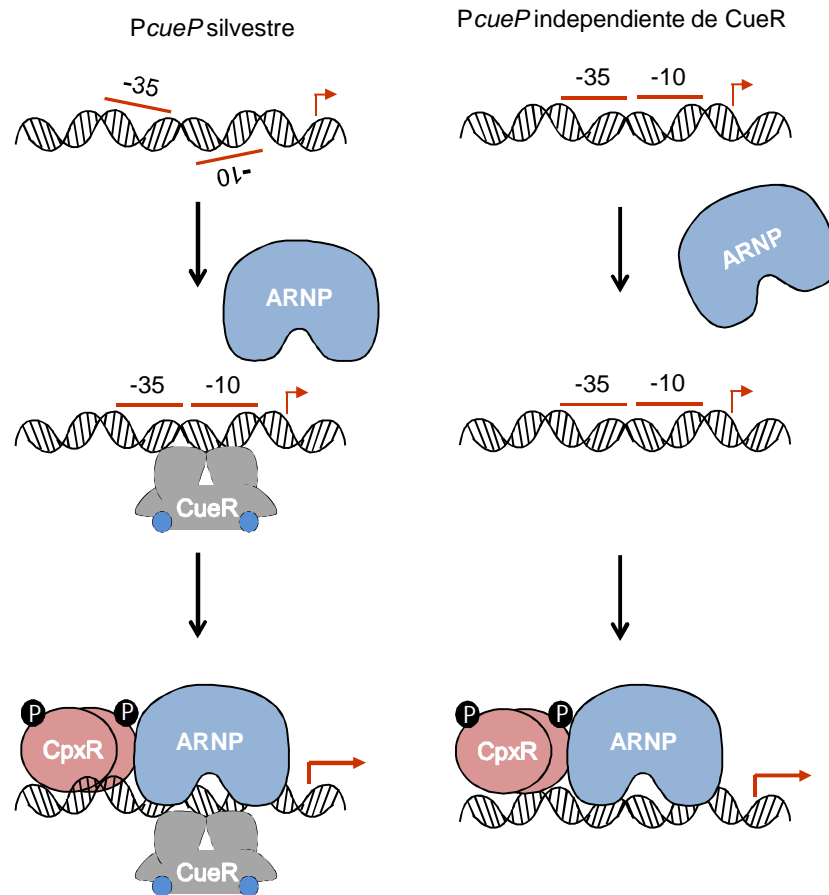


Figura 5.10. La expresión de *cueP* requiere de la activación simultánea de CpxR y CueR. Modelo propuesto para el control dual de CpxR y CueR sobre el promotor de *cueP*. La activación de la vía de señalización Cpx causada por un estrés de la envoltura más que que por Cu, reclutará a la ARNP en la región promotora de *cueP*. Sin embargo, no se iniciará la transcripción debido a la conformación espacial desfavorable de las cajas -10 y -35. Además, la sola activación de CueR por presencia de Cu en el citoplasma, reorienta las cajas -10 y -35 pero la transcripción no se iniciará debido a que la ARNP no reconocerá al promotor. Solo la activación simultánea de CpxR y CueR inducirá la transcripción de *cueP*.

5.1.3.5. Análisis del promotor de *cueP* en relación con la regulación por CpxR

Teniendo en cuenta que CpxR es un factor crucial para el reclutamiento de la ARNP y posterior formación del complejo abierto, se propuso indagar sobre las causas que determinan que el promotor de *cueP* requiera de un factor extra para iniciar el proceso de transcripción.

Para desarrollar este análisis, se hará una breve introducción sobre la estructura de las secuencias promotoras. Los promotores bacterianos contienen al

menos tres secuencias de reconocimiento para la ARNP: los elementos -10, -35 (cajas -10 y -35) y el elemento UP (del inglés *upstream*). Las cajas -10 y -35 son reconocidas por la subunidad σ de la ARNP; y el elemento UP, localizado corriente arriba de la caja -35 es reconocido por la subunidad α de la ARNP (Ross *et al.* 1993). El elemento UP mejor caracterizado es el del promotor *rmB* P1, en el cual los determinantes de la secuencia están ubicados entre las posiciones -40 y -60 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Las interacciones entre la subunidad α y el elemento UP facilitan la unión inicial de la ARNP y los subsecuentes pasos del inicio de la transcripción (Strainic *et al.* 1998). La secuencia consenso de los elementos UP consiste casi exclusivamente de residuos de A y T (Estrem *et al.* 1998). Los elementos UP han sido identificados corriente arriba de muchos promotores bacterianos y de fagos y pueden funcionar con ARNP que contengan diferentes factores σ . El dominio carboxi-terminal α CTD es el responsable de la interacción con el elemento UP y con un gran número de activadores transcripcionales. Los residuos del α CTD cruciales en la interacción con el ADN son prácticamente invariantes en bacterias y por lo tanto las secuencias de ADN reconocidas por α CTD también están altamente conservadas (Estrem *et al.* 1999).

El inicio de la transcripción de la mayoría de los genes en *E. coli* está conducido por la ARNP que contiene la subunidad σ^{70} (Mitchell *et al.* 2003). Los elementos cruciales en las secuencias de los promotores para la ARNP- σ^{70} son la caja -35 que posee la secuencia consenso TTGACA y la caja -10 que posee la secuencia TATAAT. Además, como se expuso anteriormente, el espaciamiento entre ambos elementos es importante para el funcionamiento del promotor, siendo óptima una separación de 17 pb (deHasey y Helmann 1995). Es probable que la fuerza de los promotores sea una función de estos tres elementos del promotor, teniendo los promotores muy fuertes elementos UP, -35 y -10 cercanos al consenso y en el caso de los promotores débiles, uno, dos o los tres elementos pueden alejarse de la secuencia ideal (Busby y Ebright 1994).

Los promotores dependientes de σ^{70} en *E. coli* también contienen un elemento menos conservado, el elemento “-10 extendido” (caja -10 extendida), originalmente identificado en *Bacillus subtilis*, que al igual que en otras bacterias Gram-positivas está más conservado que en *E. coli* (McCracken y Timms 1999). La caja -10 extendida, se encuentra una base corriente arriba del hexámero correspondiente a la caja -10 con el principal determinante 5'-TG-3' ubicado en la posición -15/-14

respecto al sitio de inicio de la transcripción. Se estima que aproximadamente el 20% de los promotores de *E. coli* poseen una caja -10 extendida (Burr *et al.* 2000). En un estudio llevado a cabo con 554 promotores de *E. coli*, los promotores que poseen la caja -10 extendida tienden a presentar menos coincidencias con las secuencias consenso del hexámero -35 y contienen menor cantidad de residuos T en la región espaciadora y se pudo determinar que el motivo 5'-TG-3' corriente arriba de la caja -10 contribuye a la actividad transcripcional de estos promotores (Mitchell *et al.* 2003). La importancia de dicho motivo en los distintos promotores depende en la secuencia de los otros elementos (Voskuil *et al.* 1995).

Analizando las secuencias nucleotídicas de los promotores del regulón Cue, se puede observar que los tres comparten de manera idéntica la secuencia para la caja -35, luego poseen las diadas de reconocimiento para CueR con ciertas diferencias y se observan marcadas diferencias en torno a la caja -10 siendo más similares las secuencias entre *cuiD* y *copA* respecto a la correspondiente en *cueP* (Pontel y Soncini 2009). Si bien, los promotores de *cuiD* y *copA* no poseen una caja -10 extendida perfecta conservan un residuo T en la posición -15 mientras que el promotor de *cueP* no posee ninguna semejanza con esta secuencia consenso. De todas formas, se debe tener en cuenta que puede ser una región importante para la actividad transcripcional de los promotores en relación con el reclutamiento y actividad de la ARNP. Asimismo, no se encontraron semejanzas entre los tres miembros del regulón corriente arriba de la caja -35 que indiquen la presencia de elementos UP.

Con el propósito de indagar si las diferencias en la caja -10 y su entorno (incluyendo el motivo -10 extendido) son responsables de disminuir la eficiencia del reclutamiento y actividad de la ARNP en el promotor de *cueP*, se modificaron las bases diferenciales en esta región reemplazándolas por las presentes en *copA* o en *cuiD*.

Como se observa en la Figura 5.11, los promotores mutantes *PcueP-10copA* y *PcueP-10cuiD* mostraron mayor activación transcripcional por Cu a pH 7,0 que el promotor *PcueP* silvestre. Sin embargo, ambos promotores mutantes mantuvieron la dependencia de CpxR. El promotor *PcueP-10copA* mostró mayor dependencia mientras que se observó inducción del promotor *PcueP-10cuiD* aún en ausencia de CpxR. En conjunto, estos resultados indican que si bien la secuencia en torno a la caja -10 en el promotor de *cueP* no es decisiva a la hora de generar un “promotor débil”

que requiera en compensación la presencia de CpxR, podría formar parte de una sumatoria de factores que afecten en la misma dirección.

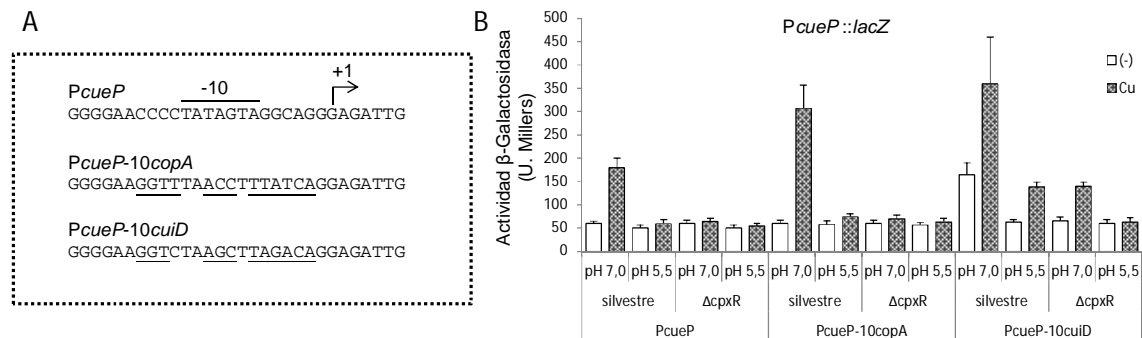


Figura 5.11. La dependencia de CpxR en la transcripción de *cueP* no está relacionada con diferencias en la caja -10 y su entorno dentro del regulón Cue. (A) Secuencia de ADN de un fragmento de la región promotora de *cueP* (*PcueP*) y de dicha región donde se cambiaron bases puntuales en torno a la caja -10 por aquellas presentes en el promotor de *copA* (*PcueP-10copA*) y de *cuiD* (*PcueP-10cuiD*). Con una línea sólida por encima de la secuencia se indica la caja -10 y con líneas sólidas por debajo de las secuencias se indican las bases cambiadas en cada una de las mutantes. También se indica el sitio de inicio de la transcripción (+1 y flecha). (B) Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión transcripcional reportera *PcueP::lacZ* expresada tanto en un entorno silvestre como en la cepa mutante Δ *cpxR* y utilizando las variantes mutantes del promotor de *cueP* mostradas en (A) según se indique. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO_4 . Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

5.1.3.6. La regulación por CpxR determina los niveles proteicos de CueP

Se evaluó si los niveles de CueP se corresponden con esta regulación observada a nivel transcripcional. Dicha determinación, además sienta las bases para el estudio de las implicancias fisiológicas de la regulación descrita. En este sentido, se realizaron estudios de detección de proteínas en las diferentes condiciones de cultivo (Pontel y Soncini 2009).

Se realizaron ensayos de inmunodetección utilizando extractos proteicos de una cepa mutante etiquetada con el epítipo 3xFLAG en el extremo C-terminal de CueP (*cueP::3xFLAG*) en las distintas condiciones de inducción y en los entornos mutantes Δ *cpxR*, Δ *cueR* y Δ *cpxR\Delta**cueR*.

En la Figura 5.12 se observa que los niveles de la proteína de fusión se corresponden con los del transcripto de *cueP*, manteniéndose el perfil regulatorio descrito. Además, esta regulación se mantiene en ausencia de oxígeno.

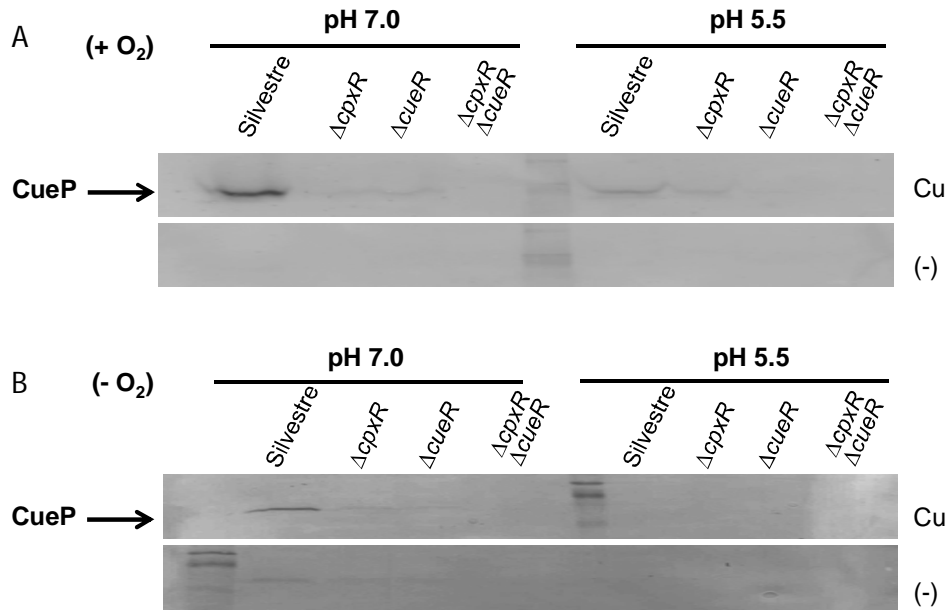


Figura 5.13. La expresión de la proteína CueP inducida por Cu depende de CpxR. (A,B) Análisis de la expresión de la proteína de fusión CueP-3xFLAG utilizando anticuerpos anti FLAG. Se sembraron 20 μ g de extractos proteicos totales crudos de las cepas silvestre, Δ cpxR, Δ cueR y Δ cpxR Δ cueR. Las células fueron crecidas a 37°C en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5. En (A) los cultivos se crecieron con agitación durante toda la noche con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄. En (B) las células crecieron en cultivos estáticos en una jarra de anaerobiosis durante 72 hs con o sin el agregado de 10 μ M Cu.

5.2. Estudio de la implicancia fisiológica de la regulación de *cueP* por CpxR

5.2.1. Rol fisiológico de la regulación de *cueP* por CpxR en la resistencia al Cu

Como se menciona a lo largo de este trabajo, *cueP* forma parte del regulón Cue y le brinda a *Salmonella* resistencia al Cu (Pontel y Soncini 2009). Por ende CueR promueve su transcripción en presencia del ion metálico. El otro modulador, CpxR, el regulador respuesta perteneciente al sistema de dos componentes CpxR/CpxA, es uno de los principales sistemas de respuesta a estrés periplasmático en enterobacterias (Pogliano *et al.* 1997; Price y Raivio 2009; Raivio 2014). Como CueR detecta la presencia de Cu en el citoplasma y CueP es una proteína que ejerce su función en el periplasma es probable que la integración de ambas señales garantice el suministro de CueP al periplasma sólo en presencia del estrés por el metal en dicho compartimento.

Alternativamente, CueP puede ser o tóxico o bien incapaz de llevar a cabo su función en condiciones en las que el sistema CpxR/CpxA no está activo. Para

discernir entre estas posibilidades y esclarecer el rol fisiológico de la regulación transcripcional de *cueP* por parte de CpxR se evaluó el crecimiento bacteriano en diferentes condiciones de cultivo y variando además, la regulación transcripcional de *cueP*, desde su expresión fisiológica natural hasta una expresión artificial que en ciertas condiciones es contraria a la que presenta la cepa silvestre

5.2.1.1. CueP confiere resistencia a Cu en anaerobiosis aún en condiciones fisiológicas que no promueven su activación

Como se menciona en la Introducción, el fenotipo en la resistencia al Cu por parte de CueP se observa principalmente en ausencia de oxígeno. Se evaluó la resistencia al Cu en anaerobiosis desregulando la expresión de CueP mediante su sobreexpresión desde un plásmido inducible en condiciones en las cuales fisiológicamente CpxR no activa su transcripción.

Como se observa en la Figura 5.14, la sobreexpresión de CueP aún en condiciones donde no se expresaría debido a su regulación por CpxR (en este caso el experimento se llevó a cabo tanto a pH 7,0 como a pH 5,5) aumenta la resistencia al Cu en anaerobiosis. De esta forma se descarta un efecto tóxico de CueP en ciertas condiciones de “no activación”.

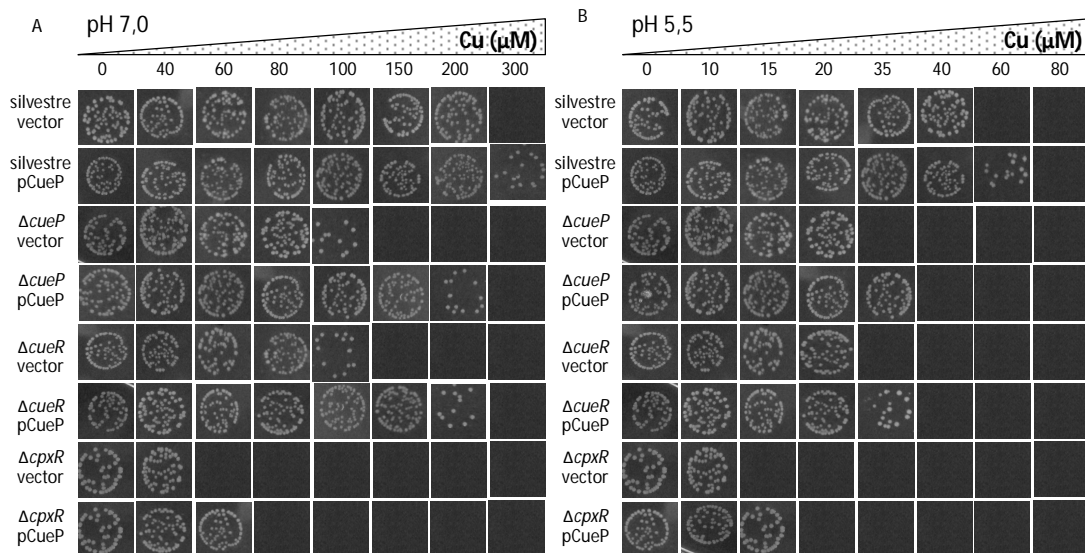


Figura 5.14. La desregulación de la expresión de *cueP* no afecta la resistencia al Cu en anaerobiosis. (A,B) Determinación de la CIM de Cu en anaerobiosis. Se muestran imágenes representativas de colonias de las cepas: silvestre y mutantes $\Delta cueP$, $\Delta cueR$ y $\Delta cpxR$ transformadas con el plásmido pUHE21-2*lacI*^q (vector) o pCueP según se indique. Las células fueron crecidas en placas de LB agar 100 mM MES ajustado a pH 7,0 (A) o pH 5,5 (B) con el agregado de cantidades crecientes de $CuSO_4$ y 0,1 mM IPTG durante 72 horas a 37°C en una jarra de anaerobiosis.

Es evidente que aún en exceso, CueP sigue otorgándole a *Salmonella* un efecto protector frente al Cu en condiciones anaeróbicas aunque no se puede descartar que en este caso exista un mecanismo diferente (o adicional) al presente en condiciones de expresión fisiológicas, teniendo en cuenta que CueP es una proteína de unión a Cu y que su sobreexpresión puede “titular” al metal.

5.2.1.2. CueP confiere resistencia a Cu en aerobiosis aún en condiciones fisiológicas que no promueven su activación

Como alternativa al ensayo anterior, realizamos curvas de crecimiento en medio líquido LB con el agregado de concentraciones crecientes de Cu tanto en condiciones de activación del sistema CpxR/CpxA (pH7,0) como de “no activación” (pH5,5). Se evaluó el crecimiento de una cepa silvestre respecto al de una cepa mutante en la cual se reemplazó el promotor nativo de *cueP* por el de *copA* (*PcopAcueP*). De esta forma la expresión de *cueP* depende de CueR pero no de CpxR. Esta estrategia toma ventaja respecto a la que se llevó a cabo sobreexpresando CueP desde el plásmido ya que los niveles de expresión de CueP desde el promotor de *copA* se aproximan a los niveles silvestres, disminuyendo la posibilidad de que ocurran efectos secundarios debido a su sobreexpresión.

Para corroborar el funcionamiento adecuado de esta construcción se llevaron a cabo ensayos de *western blot* utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-CueP y acorde a lo observado en los niveles de transcripción para la fusión reportera *PcopA::lacZ*, se observó inducción de la síntesis de CueP dependiente de Cu (y mayor a la observada desde el promotor de *cueP* silvestre) pero independiente del pH del medio de cultivo (Figura 5.15)

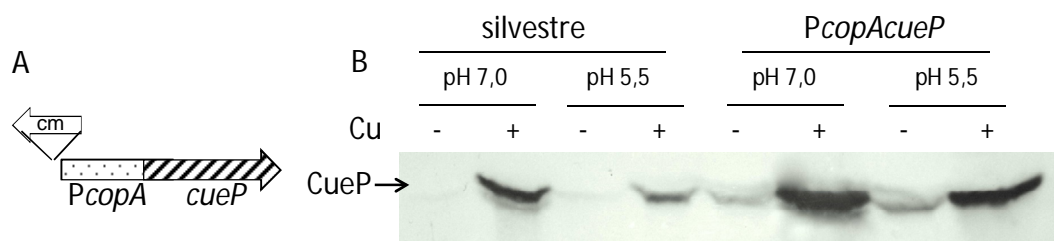


Figura 5.15. Expresión de la proteína CueP controlada por el promotor de *copA* (*PcopA*). (A) Esquema de la construcción en la cual se cambió el promotor silvestre de *cueP* por el de *copA* en el cromosoma (B) Análisis de la expresión de CueP por Western blot utilizando anticuerpos policlonales anti-CueP. Se sembraron 20 µg de extractos proteicos totales crudos de las cepas silvestre y mutante *PcopAcueP*. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄ según se indica.

La regulación de la transcripción de *cueP* por parte de CpxR conlleva no sólo a que la expresión de CueP esté muy reducida a pHs ácidos (Figura 5.3), sino también a que se observe inducción de su expresión por el metal a partir de la fase exponencial tardía de la curva de crecimiento. Reportes recientes indican que CueP es una chaperona capaz de auxiliar en la incorporación (metalado) de Cu a la superóxido dismutasa SodCII, siendo particularmente importante a bajas concentraciones de Cu (Osman *et al.* 2013). A partir de lo expuesto, resulta importante analizar las diferencias entre las curvas de crecimiento de la cepa silvestre y la mutante *PcopAcueP* teniendo en cuenta diferentes aspectos. Por un lado, se debe evaluar el crecimiento a distintas concentraciones de Cu ya que quizá diferencias en los niveles de CueP puedan generar desbalances en el metalado de diversos componentes periplasmáticos. Y por otra parte, también hay que tener en cuenta que en fase de crecimiento exponencial la expresión de CueP se ve naturalmente disminuida.

Evaluando este tipo de experimentos, y teniendo en cuenta los aspectos mencionados anteriormente, no se observaron diferencias significativas en las curvas de crecimiento con concentraciones crecientes de Cu entre la cepa silvestre y la mutante *PcopAcueP* (Figura 5.16).

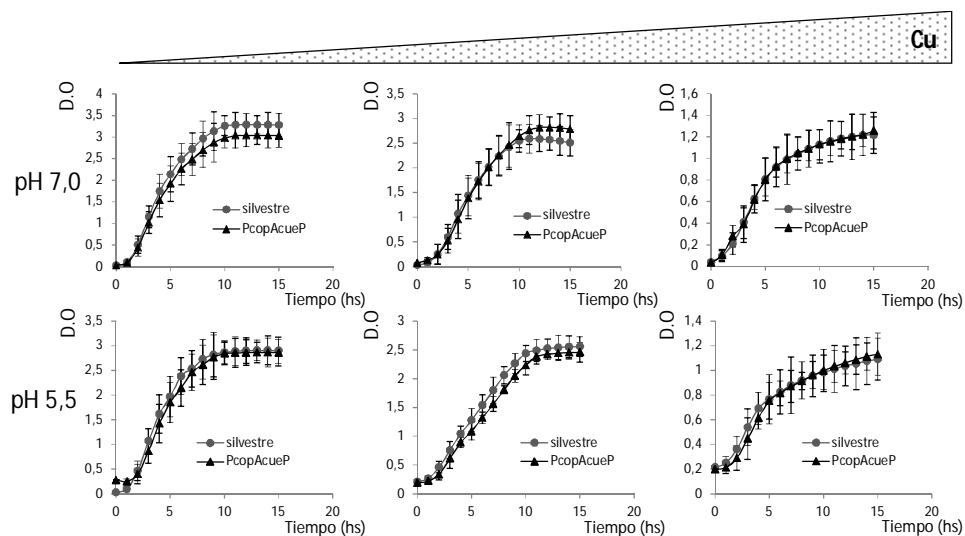


Figura 5.16. La desregulación de la expresión de *cueP* respecto a CpxR no afecta la resistencia al Cu en aerobiosis. Curvas de crecimiento donde se determina la DO_{600} de los cultivos a los tiempos indicados tanto para la cepa silvestre como para una cepa mutante que expresa *cueP* bajo el promotor de *copA* (*PcopAcueP*). Los cultivos fueron crecidos en medio rico LB 100 mM MES ajustado a pH 7.0 o 5.5 sin o con el agregado de concentraciones crecientes de $CuSO_4$. Se muestran curvas representativas en las que las células crecieron en el medio indicado sin el agregado adicional de $CuSO_4$, y con el agregado de concentraciones moderadas y altas (subletales) de $CuSO_4$, en orden de aparición (de izquierda a derecha). Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Se realizaron curvas de crecimiento en las mismas condiciones que las descritas anteriormente pero utilizando la cepa mutante sensible a Cu $\Delta cuiD \Delta copA \Delta golTSB$ (denominada *mut* en el resto de esta sección). El sistema Gol fue caracterizado en el laboratorio como un sistema que se induce y otorga resistencia a oro (Checa *et al.* 2007; Pontel *et al.* 2007), pero en ausencia del regulón Cue, el sistema Gol adquiere relevancia en la resistencia al Cu (Espariz *et al.* 2007).

Como se observa en la Figura 5.17, no se obtuvieron diferencias notables en las curvas de crecimiento entre la cepa *mut* y la cepa *mut PcopAcueP* en la mayoría de las condiciones. Por el contrario, en algunos casos se observó que la desregulación de *cueP* expresada desde el promotor de *copA* incrementó la resistencia a altas concentraciones del metal de esta cepa de *Salmonella*. Esta resistencia aumentada puede deberse a que el promotor de *copA* es “más fuerte” que el nativo, garantizando una expresión mayor y más temprana. Por otra parte, y como era de esperar según lo reportado (Pontel y Soncini 2009), se observó una disminución en la resistencia al Cu en la cepa *mut $\Delta cueP$* .

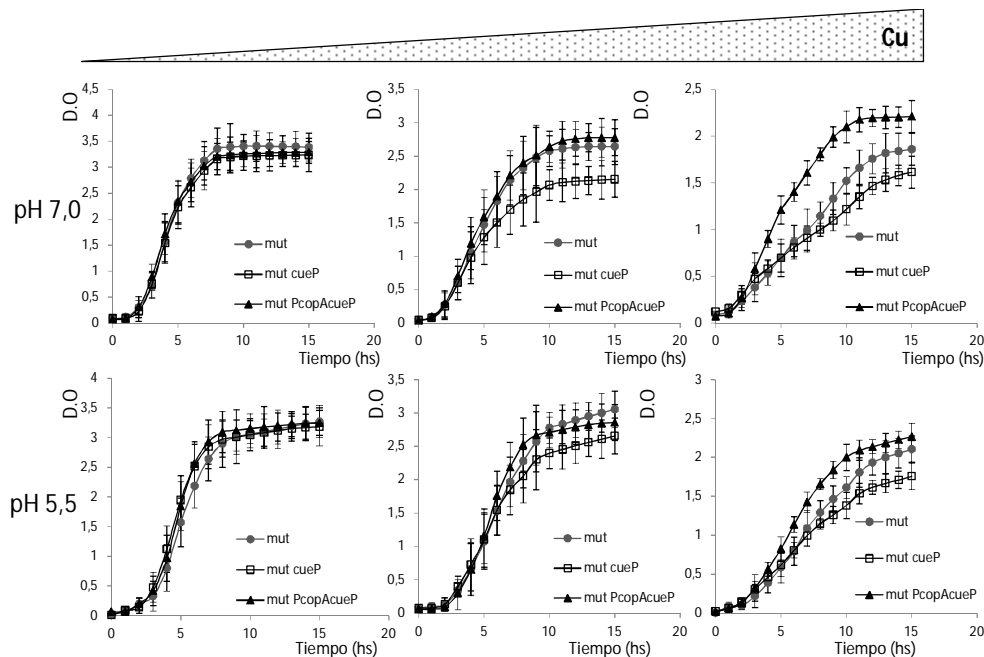


Figura 5.17. La desregulación de la expresión de *cueP* respecto a CpxR no afecta la resistencia al Cu en aerobiosis. Curvas de crecimiento hechas en las mismas condiciones que en la Figura 5.15. En este caso, se utilizó como fondo genético la cepa mutante sensible al Cu $\Delta cuiD \Delta golTSB \Delta copA$ (*mut*) así como las cepas con mutaciones adicionales *mut $\Delta cueP$* y *mut PcopAcueP*. Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Se llevaron a cabo ensayos de competencia entre la cepa silvestre y mutante *PcopAcueP* creciendo una mezcla de cultivos de ambas cepas sobre una placa de medio LB semisólido en presencia de un gradiente de Cu generado por la introducción de un disco de papel embebido en una solución de alta concentración del metal. Para diferenciar el crecimiento de cada cepa, las mismas fueron transformadas con plásmidos que expresan constitutivamente o bien la proteína verde fluorescente (pGFP) (Fedrigo *et al.* 2011) o la proteína Cherry (pCherry) (Materiales y Métodos sección 3.1), y se analizó el crecimiento por microscopía de fluorescencia. En la Figura 5.18, se observa el *merge* para este tipo de imágenes en las inmediaciones de la zona donde la toxicidad por Cu impide el crecimiento bacteriano, es decir a concentraciones subletales del metal. Nuevamente no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento entre la cepa silvestre y la cepa mutante *PcopAcueP*.

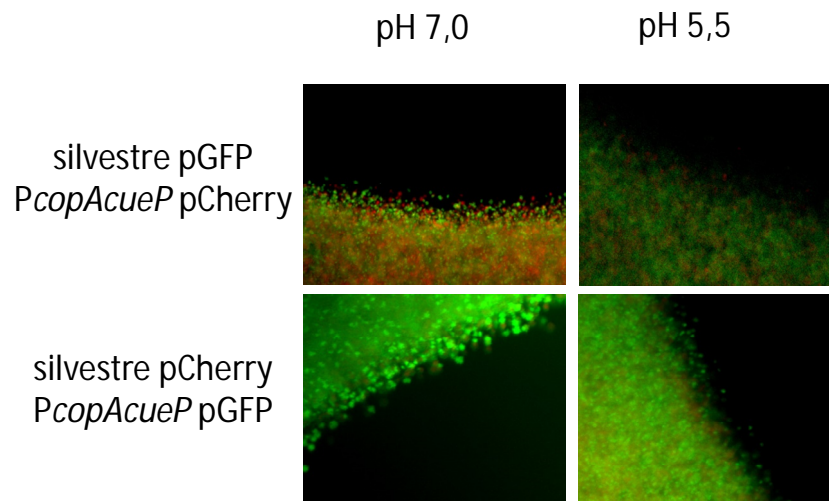


Figura 5.18. La desregulación de la expresión de *cueP* respecto a *CpxR* no afecta la resistencia al Cu en aerobiosis. Ensayo de competencia en el crecimiento en medio sólido frente a un gradiente de concentración de Cu. Se utilizó el método de difusión por disco en agar mediante el cual se colocan discos de papel de filtro embebidos en CuSO_4 , sobre placas de LBA. Luego se vertió una mezcla en partes iguales de cultivos saturados (normalizado por la DO_{600}) de la cepa silvestre transformada con el plásmido que expresa GFP y la cepa mutante *PcopAcueP* transformada con el plásmido que expresa la proteína Cherry o en forma inversa, la cepa silvestre expresando Cherry y la mutante expresando GFP. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C y luego se observaron en un microscopio de fluorescencia con filtros adecuados para observar la fluorescencia verde emitida por GFP, o la fluorescencia roja emitida por Cherry.

Se evaluó además si la sobreexpresión de CueP es capaz de aliviar el estrés generado por Cu que activa al sistema Rcs en la cepa mutante ΔcuiD , también es capaz de hacerlo en condiciones donde su expresión se encuentra naturalmente disminuida. Nuevamente, se observó efecto protector de CueP en un estrés generado

por Cu en placas de LB agar ajustadas a pH 5,5, condiciones fisiológicas de menor expresión (no mostrado).

En conjunto, todas estas aproximaciones experimentales sugieren que la regulación de la expresión de *cueP* por CpxR no afecta la respuesta de *Salmonella* al estrés generado *in vitro* por Cu, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Paradójicamente, la sensibilidad de *Salmonella* al Cu es mayor a medida que el medio de crecimiento se acidifica (Figura 5.14), ya sea por biodisponibilidad del metal o por cuestiones fisiológicas de la bacteria.

Teniendo en cuenta que *Salmonella* es esencialmente un patógeno y que el locus en estudio es específico de este género, y que además se vinculó a la ausencia de CueP con una disminución en la replicación de *Salmonella* dentro de macrófagos (Yoon, Yeom, *et al.* 2014) es probable que la regulación de *cueP* por CpxR sea necesaria para controlar de manera fina la expresión de CueP en el periplasma cuando las bacterias se enfrentan al estrés por Cu dentro de los fagosomas de macrófagos u otros tipos celulares del hospedador. En este sentido cabe destacar que el sistema Cpx estaría involucrado en la virulencia de *Salmonella* (Humphreys *et al.* 2004) que a lo largo del curso de la infección se encuentra con diferentes señales que afectan la activación del sistema como la variación de pH dentro de los compartimentos endocíticos, entre otros (Steele-Mortimer 2008; Martin-Orozco *et al.* 2006), y que se ha vinculado al Cu como un elemento tóxico empleado por los macrófagos para atenuar el crecimiento de *Salmonella* (Osman *et al.* 2010). Además, durante el curso de una infección las bacterias deben enfrentarse a situaciones muy específicas ya que conjuntamente están expuestas a otros tipos de estrés como por ejemplo la presencia de EROS (Slauch 2011; Sly *et al.* 2002). Probablemente la regulación diferencial de *cueP* dentro del regulón sea necesaria para hacer frente al estrés por Cu en condiciones donde el suministro de CueP en el periplasma además de brindar resistencia al metal puede estar vinculado a otro tipo de estrés, como por ejemplo al estrés oxidativo, participando en el metalado de SodCII (Osman *et al.* 2013). Es posible que niveles de expresión incorrectos generen un desbalance en el estado metálico de ciertos componentes del periplasma importantes para la sobrevivencia de *Salmonella* durante el proceso infeccioso.

5.2.2. Rol fisiológico de la regulación de *cueP* por CpxR en la respuesta al estrés oxidativo

5.2.2.1. La regulación de *cueP* por CpxR no se correlaciona con la expresión de las Sods

CueP actúa como una chaperona para metalar a la enzima superóxido dismutasa SodCII (Osman *et al.* 2013). *Salmonella* posee cuatro superóxido dismutasas caracterizadas, una que une Fe (Farr y Kogoma 1991), otra que une Mn (Tsolis *et al.* 1995), ambas citoplasmáticas, y otras dos Cu-Zn superóxido dismutasas periplasmáticas, SodCI y SodCII (Golubeva y Slauch 2006; Ammendola *et al.* 2008). Según lo reportado, CueP le suministra Cu a SodCII y este aporte es imprescindible para la actividad de dicha enzima a concentraciones bajas del catión (Osman *et al.* 2013). Indagamos cómo afecta CueP esta actividad enzimática evaluando si la regulación de *cueP* por CpxR interviene en estos procesos. Si bien SodCI no fue vinculada con CueP, teniendo en cuenta que también es periplasmática y que une Cu, fue incluida en el análisis.

En primer lugar, se evaluó si *sodCa* y *sodCb*, que codifican para SodCI y SodCII están reguladas por CpxR de forma de garantizar la co-expresión con su chaperón. Se construyeron cepas mutantes que expresan cada una de estas enzimas fusionadas al epítipo 3xFLAG en su extremo C-terminal y se evaluó su expresión tanto en un entorno silvestre como en la mutante $\Delta cpxR$ y en condiciones que afectan la expresión de CueP. Como se observa en la Figura 5.19, la ausencia de CpxR no afectó los niveles proteicos de las Sods. Por el contrario, se observó un perfil de activación de SodCI opuesto al de CueP e independiente de CpxR respecto al pH del

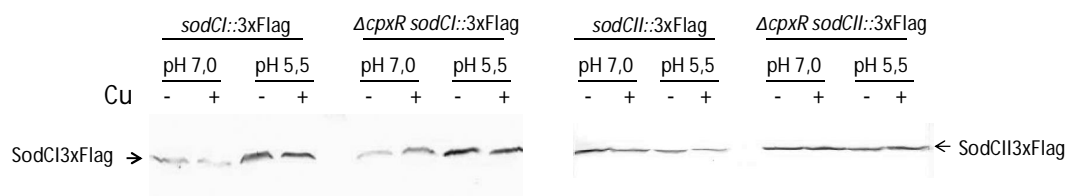


Figura 5.19. CpxR no regula la expresión de las Cu-Zn Superóxido Dismutasas periplasmáticas SodCI y SodCII. Análisis de la expresión de las proteínas de fusión SodCI-3xFLAG y SodCII-3xFLAG por *Western blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-FLAG. Se sembraron 20 μ g de extractos proteicos totales crudos de las cepas silvestre y mutante $\Delta cpxR$. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO_4 .

medio. Esta regulación depende de PhoP/PhoQ, otro sistema de dos componentes que se activa a pHs ácidos (Golubeva y Slauch 2006; Bearson *et al.* 1998).

Teniendo en cuenta que SodCI tiene mayor afinidad por el Cu que SodCII (Ammendola *et al.* 2008) y que no necesitaría de un chaperón para adquirir dicho ión, podría especularse con que la expresión de CueP debe restringirse a aquellas condiciones donde sea necesaria la actividad de SodCII por sobre la de SodCI, especulando además con que la presencia de CueP podría captar el Cu libre disponible en el periplasma comprometiendo la actividad de SodCI.

Se ha reportado que la expresión de SodCII depende del factor σ de la fase estacionaria RpoS (Golubeva y Slauch 2006). Estudios de expresión transcripcional mostraron que *cueP* también depende de la presencia de RpoS para su máxima expresión ya que en una cepa $\Delta rpoS$ la actividad de la fusión *PcueP::lacZ* en cultivos en fase estacionaria baja a aproximadamente la mitad del máximo obtenido en un entorno silvestre (no mostrado). Este efecto podría deberse a la vinculación observada entre la activación de CpxR y RpoS. Se ha reportado que CacA es responsable de la activación transcripcional de *cpxP* dependiente de CpxR en *Salmonella* mostrando una reducción del 30% de la misma en una cepa mutante $\Delta cacA$, y a su vez, la expresión de *cacA* está regulada transcripcionalmente de manera positiva por RpoS (Kato *et al.* 2012).

5.2.2.2. La regulación de *cueP* por CpxR no se correlaciona con la actividad de las Sods

Para analizar si CpxR afecta la expresión de genes que influyen la actividad de las Sods llevamos a cabo ensayos cualitativos de actividad SOD mediante geles nativos de poliacrilamida. Sin embargo no observamos diferencias significativas en los perfiles de actividad SOD entre una cepa silvestre y una mutante $\Delta cpxR$ (Figura 5.20.).

Por otro lado, se observó una disminución en la actividad correspondiente a la proteína o complejo proteico de menor movilidad electroforética cuando se sobreexpresó CueP en medios con bajo contenido de Cu (Figura 5.20). Esto sugiere que CueP está captando el Cu libre del periplasma e impidiendo el desarrollo de la actividad SOD. Analizamos si la banda cuya actividad disminuye corresponde a SodCI. Sin embargo no observamos desaparición de la banda mencionada en una mutante $\Delta sodCI$ indicando que no se trata de dicha enzima.

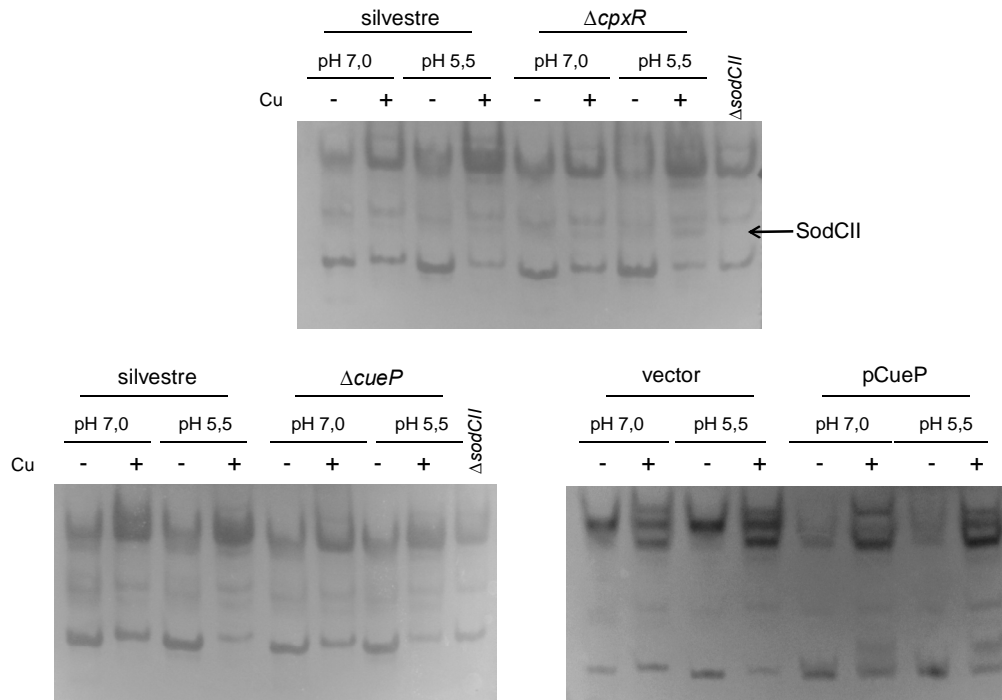


Figura 5.20. CpxR no intervendría en la actividad de las Sods. Medidas cualitativas de actividad SOD en gels nativos de poliacrilamida para extractos proteicos de la cepa silvestre, como de las cepas mutantes $\Delta cpxR$, $\Delta cueP$, y la cepa silvestre sobre-expresando la proteína CueP desde el plásmido inducible pCueP. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄. La sobre-expresión de la proteína CueP se produjo por el agregado de IPTG a una concentración final de 0,5 mM.

5.3. Nuevos elementos estructurales y regulatorios del locus *cueP*

5.3.1 Nuevos componentes en el locus *cueP*

En nuestro grupo de trabajo se hicieron ensayos de transcriptómica mediante “*Tiling arrays*” y se detectó que el transcripto de *cueP*, se extiende unas 200 pb más allá de la finalización de su marco abierto de lectura (Pontel *et al.* 2014). Dicha observación fue corroborada por ensayos de *RNAseq* que registró el transcriptoma de *Salmonella* en diferentes condiciones de crecimiento (Kroger *et al.* 2012). Por análisis *in silico* y como se observa en la Figura 5.21A, se identificó un pequeño marco abierto de lectura (ORF) de 102 pb.

Con el fin de corroborar si este ORF se está sintetizando, el gen *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa carente de su propio codón de inicio de la traducción (ATG) fue fusionado corriente abajo y en fase con los primeros cinco aminoácidos de este marco putativo.

Como se observa en la Figura 5.21D, la proteína de fusión se expresa en las mismas condiciones en las que se expresa CueP. Estos resultados sugieren la existencia de este marco de lectura al que denominamos *cueQ* y que codifica para un polipéptido de 3,5 KDa cotranscrito con *cueP*.

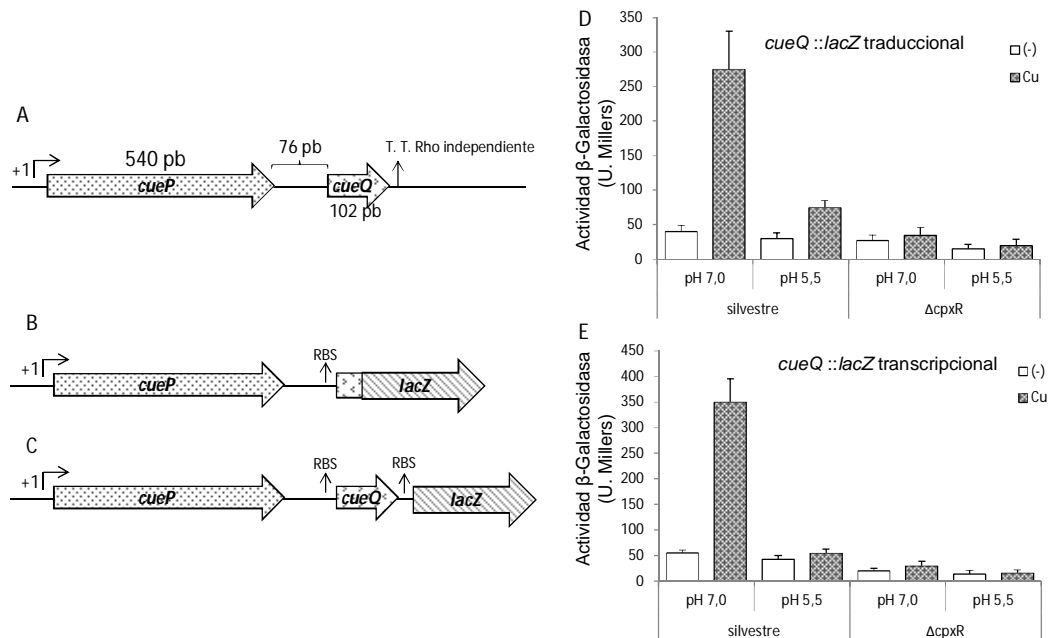


Figura 5.21. Nuevos componentes en el locus *cueP* (A) esquema del operón *cuePQ*. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (+1 y flecha), los tamaños (en pares de bases) de los marcos abiertos de lectura (ORF) de *cueP* y *cueQ* así como de la región intergénica y el terminador transcripcional *Rho* independientes determinado *in silico*. (B,C) esquema de las fusiones traduccional (B) y transcripcional (C) *cueQ::lacZ*. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (+1 y flecha) y los sitios de unión al ribosoma (RBS). (D,E) Medidas de actividad β-Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión reportera traduccional (D) y transcripcional (E) *cueQ::lacZ* expresadas tanto en un entorno silvestre como en la cepa mutante $\Delta cpxR$. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO_4 . Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Utilizando el algoritmo PSI-BLAST se enfrentó el ORF de *cueQ* tanto en su secuencia nucleotídica (Blastn) como aminoacídica (Blastp) contra la base de datos no redundantes del NCBI y no se encontraron coincidencias significativas más allá del género *Salmonella*. Por otra parte, se construyó una cepa mutante $\Delta cueQ$ y se clonó *cueQ* en el plásmido de expresión inducible por IPTG pUHE21-2*lacI*^q (Soncini *et al.* 1995). Se llevaron a cabo ensayos de resistencia al Cu, donde se evidencia el fenotipo de la ausencia de CueP. Tanto la ausencia como la sobreexpresión de CueQ no produjeron cambios en la resistencia al Cu (no mostrado), sugiriendo que *cueQ* no participa en la homeostasis de dicho metal. Por otra parte, si bien este ORF fue etiquetado con el epítipo 3xFLAG en el extremo C-terminal, no se pudo detectar la

proteína de fusión por *Western blot* y no se pudo determinar su localización subcelular.

En este contexto, si bien no se hicieron otro tipo de ensayos para explorar la función de CueQ, una posibilidad interesante sería indagar si participa de alguna forma en el metalado de las Sods ya sea en el aporte de Cu o de Zn, evaluando además si por sí misma es capaz de unir alguno de los metales.

5.3.2. El sRNA STnc780 se extiende dentro del operon *cuePQ*

Recientemente con el advenimiento de las técnicas de secuenciación masiva de ARNs se identificó un ARN regulatorio pequeño (sRNA), denominado STnc780 (Sittka *et al.* 2009; Kroger *et al.* 2012), que agrega una complejidad aún mayor a este locus específico de *Salmonella*. Si bien se requerirá de trabajos posteriores para caracterizar y discernir el rol fisiológico de cada uno de estos elementos, iniciamos el análisis del rol de STnc780 sobre la expresión del operón *cuePQ*.

Se ha establecido que muchos transcritos de ARN cumplen un rol regulador. En bacterias, un gran número de estos ARNs regulatorios existen como transcritos cortos (50-300 pb) que actúan independientemente en la expresión de los genes blanco (Breaker 2011). Estos ARNs son conocidos como ARNs pequeños o sRNAs (del inglés small RNAs) y se los puede clasificar en dos grandes grupos, aquellos que regulan a transcritos codificados en lugares distantes en el genoma, llamados *trans* sRNAs, y aquellos que están codificados en la hebra opuesta a su gen blanco, denominados *cis* sRNA (Prévost *et al.* 2011).

Los *trans* sRNAs o sRNAs codificados en *trans*, han sido los más estudiados y se caracterizan por regular los ARNm mediante interacciones que involucran un apareamiento corto e imperfecto, identificándose diferentes mecanismos. Muchos de estos sRNAs direccionan el apareamiento de bases en zonas cercanas o que incluyen al sitio de unión al ribosoma (RBS) de sus transcritos blanco bloqueando de esta forma la traducción (And y Storz 2009). Otros miembros de la familia, producen su apareamiento en locaciones más distantes y actúan ya sea interfiriendo con el RBS mediante otros mecanismos indirectos, incrementando la unión del ribosoma al prevenir la formación de estructuras secundarias inhibitorias, o disminuyendo o aumentando la estabilidad del ARNm (Gottesman y Storz). Los cambios en la estabilidad del ARNm generados por el apareamiento de bases con el sRNA

inicialmente fueron atribuidos a la incorporación del ribosoma al ARNm. Sin embargo, los sRNAs modulan los niveles de ARNm más rápidamente que lo que podría ser explicado a partir de una unión alterada al ribosoma y estudios recientes muestran que los sRNAs regulan de forma directa la estabilidad de los transcritos mediante las ARNasas, ARNasa E o ARNasa III, aún en ciertos sRNAs que afectan la traducción (Caron *et al.* 2010).

En bacterias Gram negativas, la proteína de unión al ARN Hfq es usualmente requerida para la función y/o estabilidad de esta familia de sRNAs (Aiba 2007). Los sRNAs asociados a Hfq comúnmente utilizan el mecanismo anti sentido para regular ya sea positiva o negativamente la expresión de los ARNm codificados en *trans*; la función de Hfq es ayudar a la formación del apareamiento ARN-ARN entre el regulador y el transcripto blanco, que típicamente es débil e imperfecto (Valentin-Hansen *et al.* 2004). Aunque comúnmente los sRNAs dependientes de Hfq modulan el inicio de la traducción por interferir con la unión del ribosoma, también se han observado alteraciones en los niveles del ARNm (Aiba 2007). Investigaciones en varios modelos bacterianos predicen un rol central para Hfq y sus sRNAs asociados en la fisiología bacteriana y la virulencia (Guisbert *et al.* 2007; Ding *et al.* 2004). Los fenotipos de mutantes en Hfq han sido intensamente estudiados en *Salmonella* y se calcula que Hfq controla alrededor de la mitad de todos los genes de *Salmonella* lo cual se condice con la función global predicha para esta proteína en la regulación post-transcripcional (Papenfort *et al.* 2009).

Experimentos *in vitro* sugieren que Hfq generalmente se une a regiones de simple hebra ricas en residuos de A/U frecuentemente ubicadas adyacentes a una estructura de tallo burbuja (Sauer y Weichenrieder 2011). Sin embargo, las predicciones de los sitios de unión no son fiables, dado la débil conservación y la presencia de múltiples sitios ricos en A/U. Además, existen evidencias que indican que la cola de poli-U en el extremo 3' del sRNA también puede ser reconocida por Hfq posiblemente sirviendo como el sitio de “carga” (Otaka *et al.* 2011). Los sitios de unión a Hfq en el ARNm están aún menos caracterizados y se han descrito muy pocos con una relevancia fisiológica probada (Hopkins *et al.* 2011).

Por su parte, se encuentran cada vez más miembros de la otra gran familia de sRNA codificados en la hebra opuesta de una secuencia codificante establecida (Georg y Hess 2011). También denotados como ARNs pequeños antisentido (asRNAs), se encontró que pueden impactar tanto en la traducción como en la

estabilidad del ARNm totalmente complementario. Sin embargo, para algunos asRNAs, la regulación queda confinada al acto de la transcripción del asRNA que al ocurrir en la dirección opuesta condiciona estéricamente la propia transcripción del ARNm, más que a alguna función por parte del asRNA resultante (Georg y Hess 2011).

Por último, otro grupo prominente de sRNAs regulatorios actúan modificando la actividad proteica uniéndose específicamente a proteínas en lugar de aparearse con ARNs (Babitzke y Romeo 2007).

El progreso en la identificación y caracterización de sRNAs bacterianos ha dejado en claro que los ARNs regulatorios son ubicuos, usualmente bien conservados, e incluso pueden exceder a los reguladores proteicos en número y diversidad (Storz *et al.* 2011). En este sentido, en los últimos años se ha dedicado mucho esfuerzo en la identificación de sRNA de diferentes especies mediante la técnica de secuenciación masiva. En este contexto, para identificar los sRNAs de *Salmonella Typhimurium* asociados a la proteína chaperona Hfq se llevó a cabo una co-inmunoprecipitación de los ARNs con la proteínas Hfq etiquetadas con un epítipo seguido de “*deep sequencing*” (Sittka *et al.* 2009).

De esta forma se identificaron nuevos sRNAs de *Salmonella* asociados a Hfq, uno de ellos es el STnc780. Dicho sRNA está codificado en la hebra complementaria a *cuePQ*.

Posteriormente se construyó un mapa robusto del transcriptoma de *Salmonella Typhimurium* (Kroger *et al.* 2012). En este trabajo se determinaron además los sitios de inicio de la transcripción de cada transcripto mediante el uso de una exonucleasa terminal que degrada los extremos 5' de ARN que no posean el trifosfato característico del extremo 5' iniciador de la transcripción (Mitschke *et al.* 2011), que permite analizar con mayor detalle los programas regulatorios del organismo (Kroger *et al.* 2012). De esta forma, se encontraron 60 nuevos sRNAs regulatorios, elevando a 140 el número de sRNAs identificados en *S. Typhimurium* y se determinó que el 13% del total de los sitios de inicio de la transcripción identificados corresponden a transcriptos anti sentido. En este caso el sRNA STnc780 fue identificado con su correspondiente sitio de inicio de la transcripción que da cuenta de un sRNA de 315 pb.

Si bien reportar y evaluar los datos de las secuenciaciones masivas es de gran utilidad, el verdadero desafío supone la validación de los transcriptos identificados y

la determinación de sus funciones. Típicamente el experimento de *Northern blot* se utiliza como estándar para validar los candidatos de sRNA identificados, ya que además de validar la expresión, provee información sobre el tamaño y potencial procesamiento. Además, la identificación del extremo 5' de los RNAs en la secuenciación masiva suele ser efectiva pero la identificación de los extremos 3' puede ser menos confiable (Storz *et al.* 2011).

En el caso de los asRNAs, la percepción general es que, debido a la complementariedad perfecta entre el sRNA y su ARNm blanco, su función regulatoria no debería depender de Hfq (Ross *et al.* 2013). Sin embargo, estudios recientes en *E. coli* muestran que esta percepción no es cierta en todos los casos. Como ejemplo, Tn10/IS10 codifica un asRNA de 69 pb (RNA-OUT) que regula la expresión de la transposasa por apareamiento con el ARNm de dicha enzima (ARN-IN). Este apareamiento, regula negativamente la traducción mediante el secuestro de la región 5' de inicio de la traducción limitando la expresión de la transposasa (Ross *et al.* 2013) y se ha demostrado que la frecuencia de transposición de Tn10/IS10 está muy incrementada en un entorno mutante *hfq* y que dicho efecto es mucho menos marcado en un sistema con niveles reducidos del asRNA RNA-OUT, sugiriendo que Hfq funciona, en parte, a través de esta regulación antisentido (Ross *et al.* 2013). La expresión de la transposasa desde una fusión traduccional también se incrementó en un entorno *hfq* consistente con un rol para Hfq en esta regulación post-transcripcional. Además, estudios *in vitro* demostraron que Hfq se une tanto al asRNA como al ARNm e incrementa la proporción en la cual estas moléculas se aparean. Estos resultados, son consistentes con que Hfq juega un rol importante en la regulación traduccional mediada por el asRNA.

Nos propusimos analizar el rol del sRNA STnc780 en la regulación de la expresión post-transcripcional del operón *cuePQ*. Cabe destacar que la secuencia del sRNA no posee similitudes con secuencias nucleotídicas de ningún otro género a excepción de *Klebsiella Pneumoniae* donde una parte de la región central del sRNA de 133 pb posee un apareamiento del 88% de identidad con una secuencia intergénica no caracterizada. Con lo cual tanto *cueQ* como el STnc780 serían exclusivos del género *Salmonella*.

Para comenzar con estos estudios, por un lado se delecionó el sRNA en el cromosoma de *Salmonella* y por otro lado se sobreexpresó dicho transcripto para evaluar la modificación en la síntesis de los componentes del operón. Para el caso de

CueP, los niveles proteicos pueden medirse fácilmente mediante *Western blot* ya que se dispone de anticuerpos policlonales anti-CueP. En el caso de CueQ hay que tener en cuenta que no se pudo detectar la proteína por *Western blot* y solo se pudo evidenciar la traducción por medio de la fusión al gen *lacZ*. Además, como se muestra en la Figura 5.22A, hay que tener en cuenta que el sRNA se superpone con el ORF de *cueQ* pero no con el de *cueP* con lo cual una delección del mismo también afecta indefectiblemente la integridad de *cueQ*.

5.3.3. El sRNA STnc780 afecta la traducción de *cueQ*

Se clonó una versión corta de STnc780 reportada previamente (Sittka *et al.* 2009), y que podría tratarse de la versión procesada asociada a Hfq (80 pb) de este sRNA, en el plásmido pUH-21-*lacI^q* y se evaluó su efecto en la traducción de la fusión reportera traduccional *cueQ::lacZ*. Como se muestra en la Figura 5.22B, se realizaron las medidas de actividad β -galactosidasa creciendo los cultivos tanto en condiciones de activación a pH 7,0 y con el agregado de Cu, como de no activación, esto es a pH 5,5 y sin agregado de Cu. Se observó que la sobreexpresión del sRNA produce una marcada disminución en la expresión de la fusión traduccional siempre que se encuentre presente la proteína chaperona de sRNAs Hfq.

Para indagar sobre el posible mecanismo de acción de esta regulación post-transcripcional, se llevaron a cabo medidas de actividad β -galactosidasa en las mismas condiciones que anteriormente pero en este caso se utilizó una fusión reportera transcripcional *cueQ::lacZ*. En este caso el gen *lacZ* se insertó al final de *cueQ* sobre su región 3'UTR y el mismo posee su propio sitio de unión al ribosoma (RBS) y codón iniciador de la traducción (ATG); razón por la cual, de existir un mecanismo regulatorio específico entre el sRNA y la región que comprende al RBS de *cueQ* que intervenga en el ensamblaje adecuado del ribosoma sobre el transcripto, la expresión de la proteína del gen *lacZ* y por consiguiente las actividades β -galactosidasa de esta fusión transcripcional no deberían verse afectadas. En el caso en el que el mecanismo por el cual actúa el sRNA con el ARNm involucra una desestabilización del transcripto, guiando a las ARNasas para la degradación del mismo, las medidas de actividad β -galactosidasa deberían afectarse de igual forma que la fusión traduccional.

Como se observa en la Figura 5.22C, no se observan cambios considerables en la expresión de la fusión reportera transcripcional cuando se sobreexpresa el sRNA o

cuando se muta la proteína chaperona Hfq, lo que sugiere que el mecanismo por el cual el sRNA interviene en la traducción de *cueQ* involucra alteraciones en la unión del ribosoma al RBS correspondiente.

El hecho de no observarse cambios en la fusión reportera transcripcional, también indica que los cambios observados en los niveles de expresión de la fusión traduccional no se deben a posibles efectos secundarios por los cuales la sobreexpresión del sRNA pueda alterar la transcripción desde el promotor de *cuePQ*.

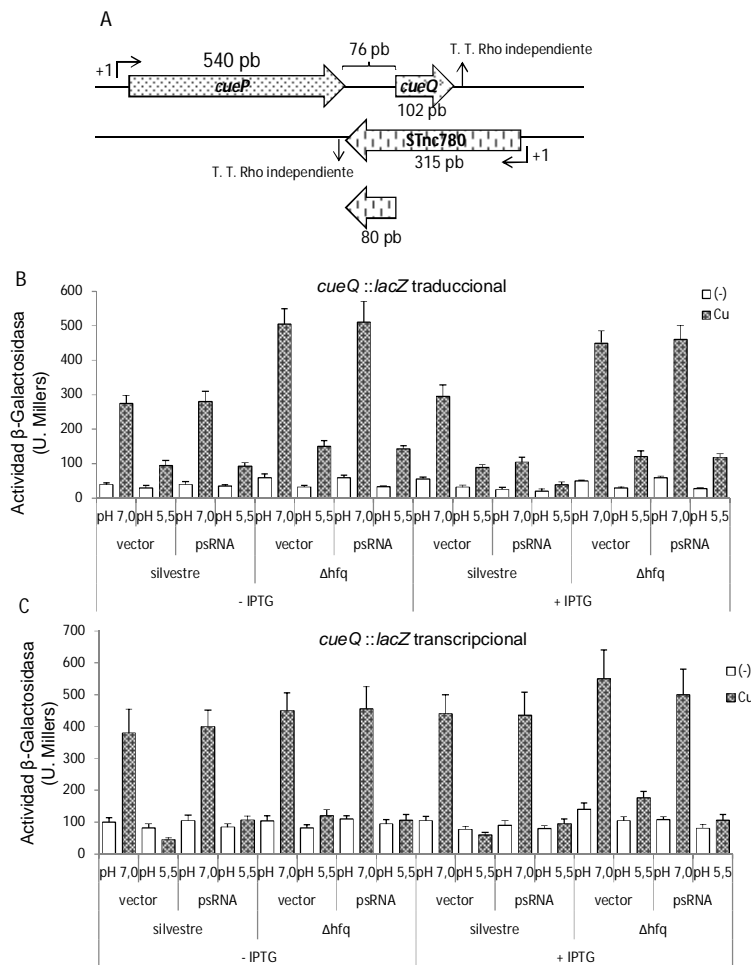


Figura 5.22. La sobreexpresión del sRNA STnc780 afecta post-transcripcionalmente los niveles de expresión de *CueQ*. (A) Esquema del operón *cuePQ* y del sRNA STnc780 codificado en la hebra opuesta. Se indican los sitios de inicio de la transcripción (+1 y flecha) y los tamaños (en pares de bases) de los marcos abiertos de lectura (ORF) de *cueP* y *cueQ* así como de la región intergénica y del sRNA STnc780 reportado con diferentes tamaños (ver detalle en el texto). Además se indican los terminadores transcripcionales *Rho* independientes determinados *in silico*. (B,C) Medidas de actividad β -Galactosidasa (Unidades Millers) de la fusión reportera traduccional (B) y transcripcional (C) *cueQ::lacZ* esquematizadas en la Figura 5.21, expresadas tanto en un entorno silvestre como en la cepa mutante Δhfq transformadas tanto con el plásmido pUHE21-2*lacI*^r (vector), como con dicho plásmido conteniendo la secuencia del sRNA STnc780 (psRNA) según se indique. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM CuSO₄ y en presencia y ausencia de IPTG (0,5 mM). Los datos corresponden a valores promedio de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

5.3.4. La expresión de cueP no está afectada por el sRNA STnc780

Por último, evaluamos si los niveles de CueP se encuentran alterados ante la sobreexpresión del sRNA regulatorio así como también en la cepa deficiente en Hfq. En este caso, dado que la estrategia experimental lo permite, también se trabajó con una cepa mutante para el sRNA ($\Delta sRNA$). Como puede observarse en la Figura 5.23, no se registraron diferencias en las distintas condiciones ensayadas. Además, también se clonó y sobreexpresó de igual forma la versión larga del sRNA obteniéndose los mismos resultados que los presentados en la Figura 5.23 (no mostrado).

Por lo expuesto, se concluye que el ARN regulatorio STnc780 en conjunto con la proteína chaperona Hfq modulan post-transcripcionalmente y de forma negativa la expresión de CueQ sin alterar los niveles de CueP. En concordancia con esta regulación, tanto la delección del sRNA como su sobreexpresión no mostraron fenotipo en la resistencia al Cu (no mostrado).

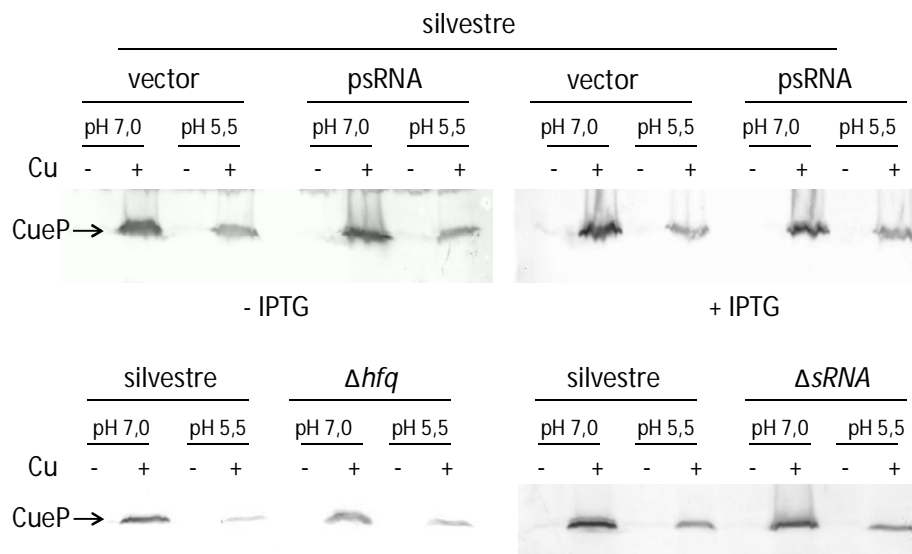


Figura 5.23. La expresión de la proteína CueP no está afectada por el sRNA STnc780. Análisis de la expresión de CueP por *Western blot* utilizando anticuerpos policlonales anti-CueP. Se sembraron 20 μ g de extractos proteicos totales crudos de las cepas: silvestre y mutantes Δhfq y $\Delta sRNA$ transformadas tanto con el plásmido pUHE-21-2 (vector), como con dicho plásmido conteniendo la secuencia del sRNA STnc780 (psRNA) según se indique. Las células fueron crecidas a 37°C durante toda la noche en medio LB MES 100 mM ajustado a pH 7,0 o 5,5 con o sin el agregado de 1 mM $CuSO_4$ y en presencia y ausencia de IPTG (0,5 mM) según se indica.

En vías de caracterizar esta regulación post-transcripcional se construyó una cepa reportera $STnc780::lacZ$ con el fin de identificar señales que varíen su activación. Sin embargo, sólo se estableció que en las condiciones ensayadas ni el estrés oxidativo por metil viológeno o por H_2O_2 , ni el pH del medio, ni la presencia de metales como el Cu, Zn y Fe modifican su transcripción.

Estudios *in silico* utilizando el algoritmo de “Copra RNA” (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/CopraRNA/Input.jsp>) que calcula la estructura secundaria del sRNA en base a parámetros termodinámicos y busca en el genoma de *Salmonella* transcriptos putativos con los cuales el sRNA en cuestión podría interactuar, no arrojaron candidatos de interés teniendo en cuenta los parámetros energéticos o los roles fisiológicos asignados.

Hasta el comienzo de esta Tesis, CueP había sido caracterizada sólo como una proteína responsable de la resistencia al Cu (Pontel y Soncini 2009; Osman *et al.* 2010), motivo por el cual se explicaba convincentemente su regulación por CueR en presencia del metal. Actualmente, los resultados de este trabajo sumado a los nuevos roles atribuidos por otros grupos (Yoon, Kima, *et al.* 2014; Osman *et al.* 2013), presentan un escenario en el cual CueP forma parte del operón *cuePQ*, sujeto a una co-regulación por parte de CueR y CpxR, estando también afectado por una regulación post-transcripcional que restringe específicamente la traducción de *cueQ* sin modificar la de *cueP*. Esta complejidad regulatoria que involucra distintas señales más allá del Cu sugiere que este locus específico de *Salmonella* estaría implicado en roles adicionales, o bien en brindar resistencia al Cu en ambientes complejos como por ejemplo aquellos con los que *Salmonella* coexiste durante el curso de la infección, requiriendo del ajuste fino en la expresión de los componentes para garantizar una respuesta adecuada al estrés específico (Slauch 2011; Martin-Orozco *et al.* 2006; Steele-Mortimer 2008). En este contexto, se ha reportado una cepa mutante de *Salmonella*, MS1314, aislada en una mutagénesis al azar por inserción de Tn10 que fue caracterizada como sensible a macrófagos (Fields *et al.* 1986). Dicha inserción se encuentra dentro de la región de *cueQ* afectando además al sRNA STnc780 (Figura 5.22A), involucrando al locus en la virulencia de este patógeno.

5.4. Conclusiones Capítulo II

En este capítulo se analizó la regulación transcripcional de *cueP*, se demostró que el sistema de respuesta a estrés periplasmático CpxR/CpxA controla la expresión de dicho gen y se analizaron las consecuencias fisiológicas de esta regulación. Además se identificaron nuevos elementos en el locus *cueP* y se inició la caracterización de los mismos.

- Mediante un análisis bioinformático identificamos un sitio putativo para la unión de CpxR en el promotor de *cueP*. CpxR es el regulador de respuesta del sistema de dos componentes CpxR/CpxA, involucrado en el mantenimiento de la homeostasis general de la envoltura. Por medio del uso de mutantes y fusiones reporteras determinamos que CpxR regula la transcripción de *cueP* y que dicha regulación se ve reflejada en los niveles proteicos tanto en presencia como en ausencia de oxígeno.
- Por ensayos *in vivo* e *in vitro* demostramos que tanto CpxR como CueR son requeridos simultáneamente para activar la transcripción de *cueP* interaccionando con su promotor en forma directa e independiente entre sí.
- Demostramos que en el proceso de transcripción de *cueP* CpxR es esencial para el reclutamiento de la ARNP mientras que CueR participa generando cambios conformacionales en el ADN para acomodar de forma adecuada las cajas -10 y -35 generando así un substrato óptimo para la ARNP.
- No observamos implicancias de la regulación de *cueP* por CpxR en la resistencia al Cu y análisis preliminares sugieren que tampoco afectaría su desempeño frente al estrés oxidativo.
- Identificamos un marco de lectura denominado *cueQ* corriente abajo de *cueP* que forma parte de la misma unidad transcripcional. En la hebra complementaria se expresa en *cis* el sRNA STnc780. Este sRNA inhibió la traducción de *cueQ* pero no afectó los niveles proteicos de CueP. En los análisis realizados, no detectamos roles fisiológicos para estos nuevos elementos.

6. Conclusiones Generales

En este trabajo de Tesis se avanzó en la caracterización de la regulación de la expresión de *cueP* y su rol en la homeostasis de Cu, relacionándolo con nuevos sistemas de respuesta a estrés general de la envoltura.

Determinamos que concentraciones subletales de cobre inducen la activación del sistema Rcs en una cepa mutante para el gen que codifica para la multicobre oxidasa CuiD en medio sólido, provocando un fenotipo mucoso en las colonias debido a la inducción transcripcional de los genes *cps* que participan en la síntesis de la cápsula de ácido colánico. Demostramos que la sobreexpresión de CueP alivia el estrés producido por el Cu, previniendo la activación del sistema Rcs en esta condición. Mutantes en el sistema Rcs o en los genes *cps* mostraron mayor sensibilidad al metal, sugiriendo un rol a dicho sistema en la protección frente al estrés por Cu. Por lo tanto, se demostró/detectó un vínculo entre el estrés por Cu y la proteína CueP con el sistema de respuesta general a estrés periplasmático Rcs.

Reportes anteriores indican la asociación entre la activación del sistema Rcs y un desbalance en la formación de grupos tioles periplasmáticos. Dicho desbalance puede ser provocado por iones Cu, permitiéndonos plantear la hipótesis que CueP responda frente al daño causado por dicho metal mediante mecanismos de reparación de puentes disulfuros incorrectos. Sin embargo, evaluando la activación del sistema Rcs, no se pudo corroborar dicho vínculo ya que la sobreexpresión de CueP no disminuyó el estrés relacionado a la presencia de puentes disulfuros incorrectos en el periplasma generado en la mutante $\Delta dsbA \Delta srgA$.

Por otra parte, observamos que *cueP* exhibe una expresión diferencial dentro del regulón Cue, evidenciada por la ausencia de inducción transcripcional por Cu en cultivos a pH ácido y un retraso temporal relativo en la inducción de la expresión por el metal a pH neutro a alcalinos. Se detectó una región en el promotor de *cueP* responsable de este fenotipo. Mediante estudios bioinformáticos identificamos un sitio probable de unión para CpxR, regulador de respuesta del sistema de dos componentes CpxR/CpxA, incluido dentro de región responsable del fenotipo de regulación diferencial. Verificamos la regulación efectiva mediante el uso de mutantes y reporteros transcripcionales demostrando que la expresión diferencial de *cueP* depende de CpxR/CpxA. Observamos que los niveles proteicos de CueP se corresponden con los

niveles transcripcionales, manteniendo el mismo perfil de expresión tanto en presencia como ausencia de oxígeno donde su función en la resistencia al Cu es crucial para la supervivencia de *Salmonella*, relacionando nuevamente a CueP y la homeostasis de Cu con otro de los sistemas de respuesta general a estrés periplasmático.

Verificamos *in vivo* e *in vitro* que CpxR regula la expresión de *cueP* de forma directa, interaccionando con un sitio único de unión en su región promotora que coincide con la secuencia consenso predicha. Dicho sitio se localiza corriente arriba del sitio de unión de CueR y ambos reguladores pueden interaccionar con el promotor de *cueP* independientemente de la presencia del otro para activar la transcripción.

Demostramos por estudios *in vivo* e *in vitro* que tanto CueR como CpxR son requeridos simultáneamente para la formación del complejo abierto y el inicio de la transcripción. CpxR es esencial para el reclutamiento de la ARNP mientras que CueR participa en la modulación conformacional del ADN para convertir al promotor de *cueP* en un sustrato óptimo para la unión de la ARNP acomodando las cajas -10 y -35 en la orientación adecuada. Esta co-regulación de *cueP* por CueR y CpxR garantiza su expresión bajo condiciones de estrés por Cu que produzca alteraciones en el periplasma. Esta situación es fisiológicamente análoga a lo que ocurre en la mayoría de las enterobacterias, en las que la proteína sensora CusS detecta el exceso de Cu en el periplasma, y activa al regulador de respuesta CusR, para la inducción de la transcripción del sistema Cus, responsable de la homeostasis de Cu en periplásmico.

Si bien determinamos que CpxR es requerido para el reclutamiento de la ARNP, no pudimos establecer las causas moleculares de este requerimiento. Si bien observamos una menor conservación en torno a la caja -10 (y -10 extendida) del promotor de *cueP* con respecto a los otros genes controlados por CueR, determinamos que la secuencia en torno a esta caja presente en este promotor no es determinante en el requerimiento del regulador de respuesta a estrés periplásmico para la inducción de la expresión de *cueP*.

Evaluamos el rol de la regulación de *cueP* por parte de CpxR en la homeostasis de Cu. Ensayos *in vitro* de resistencia al Cu independizando la expresión de CueP por parte de CpxR indican que la función de CueP frente a dicho estrés no se ve afectada por las condiciones de activación/represión del sistema CpxR/CpxA. Esto es independiente del estadio de crecimiento, de la concentración del metal, o de la presencia o ausencia de oxígeno.

Teniendo en cuenta que CueP participa en el metalado de SodCII, evaluamos si la regulación de *cueP* por CpxR tiene implicancias fisiológicas en la actividad SOD y la defensa al estrés oxidativo. Las expresiones de ambas superóxidos dismutasas periplásmicas, SodCI y SodCII, no se vieron moduladas por CpxR. Observamos además que la expresión de CueP de manera independiente de CpxR no afecta la defensa frente al estrés oxidativo en las condiciones ensayadas, mientras que su sobreexpresión generó una mayor sensibilidad a este estrés y una disminución en la actividad SOD a bajas concentraciones de Cu. Estos resultados dejan abierta la posibilidad que la concentración de CueP en el periplasma pueda afectar el metalado de componentes que intervienen en la detoxificación de las especies reactivas del oxígeno.

Analizando la presencia de nuevos elementos estructurales y regulatorios en el locus *cueP*, identificamos un ORF que codifica para un péptido de 3,5 kDa al que denominamos CueQ. Determinamos que *cueQ* está codificado en el mismo transcripto que *cueP* formando parte del mismo operón y bajo control del mismo promotor. Además, establecimos que el sRNA STnC780 codificado en *cis* la hebra opuesta al locus *cueP* mantiene invariables los niveles proteicos de CueP pero afecta negativamente la traducción de *cueQ*. Dicho efecto regulatorio requiere de Hfq siendo uno de los pocos casos en los que un sRNA codificado en *cis* lleva a cabo su función en conjunto con la proteína chaperona de sRNAs. No se encontraron fenotipos relacionados a la homeostasis de Cu ni a la defensa frente al estrés oxidativo en ninguno de estos nuevos elementos caracterizados en el locus *cueP*.

Estos resultados aportan un avance en el conocimiento del locus *cueP*, tanto a nivel estructural como regulatorio. Planteamos así que el ajuste fino temporal y espacial de la expresión de los componentes del locus responda a condiciones de estrés específicas no dilucidadas en este trabajo.

7. Referencias Bibliográficas

- Abriata, L., Pontel, L. B., Vila, A. J., Dal Peraro, M., y Soncini, F. C. (2014). A dimerization interface mediated by functionally critical residues creates interfacial disulfide bonds and copper sites in CueP. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 140, 199–201.
- Achard, M. E. S., Tree, J. J., Holden, J., Simpfendorfer, K. R., Wijburg, O. L. C., Strugnell, R., McEwan, A. G. (2010). The multi-copper-ion oxidase CueO of *Salmonella enterica* serovar typhimurium is required for systemic virulence. *Infection and Immunity*, 78(5), 2312–2319.
- Aiba, H. (2007). Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Current Opinion in Microbiology*, 10(2), 134–139.
- Ammendola, S., Ajello, M., Pasquali, P., Kroll, J., Langford, P., Rotilio, G., Battistoni, A. (2005). Differential contribution of sodC1 and sodC2 to intracellular survival and pathogenicity of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Microbes Infect.*, 7(4), 698–707.
- Ammendola, S., Pasquali, P., Pacello, F., Rotilio, G., Castor, M., Libby, S. J., Battistoni, A. (2008). Regulatory and Structural Differences in the Cu,Zn-Superoxide Dismutases of *Salmonella enterica* and their Significance for Virulence. *J Biol Chem*, 283(20), 13688–13699.
- Appia-Ayme, C., Patrick, E., Sullivan, M. J., Alston, M. J., Field, S. J., AbuOun, M., Rowley, G. (2011). Novel inducers of the envelope stress response BaeSR in *Salmonella* Typhimurium: BaeR is critically required for tungstate waste disposal. *PLoS ONE*, 6(8), 1-12.
- Arricau, N., Hermant, D., Waxin, H., Ecobichon, C., Duffey, P. S., y Popoff, M. Y. (1998). The RcsB-RcsC regulatory system of *Salmonella typhi* differentially modulates the expression of invasion proteins, flagellin and Vi antigen in response to osmolarity. *Molecular Microbiology*, 29(3), 835–850.
- Babitzke, P., y Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current Opinion in Microbiology*, 10(2), 156–163.
- Bagai, I., Liu, W., Rensing, C., Blackburn, N. J., & McEvoy, M. M. (2007). Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35695–35702.
- Bailey, T., y Gribskov, M. (1998). Methods and statistics for combining motif match scores. *J Comput Biol*, 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 Research*, 34(Web Server), 369–373.

- Bannister, J., Bannister, W., & Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem.*, 22(2), 111–80.
- Barman, M., Unold, D., Shifley, K., Amir, E., Hung, K., Bos, N., & Salzman, N. (2008). Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 76(3), 907–915.
- Batchelor, E., Walthers, D., Kenney, L. J., & Goulian, M. (2005). The Escherichia coli CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC. *Journal of Bacteriology*, 187(16), 5723–5731.
- Battistoni, A., Folcarelli, S., Cervoni, L., Polizio, F., Desideri, A., Giartosio, A., y Rotilio, G. (1998). Role of the Dimeric Structure in Cu²⁺, Zn²⁺ Superoxide Dismutase, 273(10), 5655–5661.
- Beaber, J. W., Hochhut, B., y Waldor, M. K. (2002). Genomic and Functional Analyses of SXT⁺, an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 184(15), 4259–4269.
- Bearson, B. L., Wilson, L., & Foster, J. W. (1998). A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *Journal of Bacteriology*, 180(9), 2409–2417.
- Becker, K. W., & Skaar, E. P. (2015). Metal limitation and toxicity at the interface between host and pathogen, 38(6), 1235–1249.
- Bolana, N., Kunhikrishnanc, A., Thangarajana, R., Kumpiened, J., Parke, J., Makinof, T., Scheckelh, K. (2014). Remediation of heavy metal(loid)s contaminated soils – To mobilize or to immobilize? *Journal of Hazardous Materials*, 266, 141–166.
- Bondarczuk, K., y Piotrowska-Seget, Z. (2013). Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biology and Toxicology*, 29(6), 397–405.
- Boulanger, A., Francez-Charlot, A., Conter, A., Castanié-Cornet, M.-P., Cam, K., y Gutierrez, C. (2005). Multistress regulation in *Escherichia coli*: expression of *osmB* involves two independent promoters responding either to σ^S or to the RcsCDB His-Asp phosphorelay. *Journal of Bacteriology*, 187(9), 3282–6.
- Bouwman, C. W., Kohli, M., Killoran, A., Touchie, G., Kadner, R. J., y Martin, N. L. (2003). Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence Plasmid-Encoded Parologue of the Disulfide Oxidoreductase DsbA, Essential for Biogenesis of Plasmid-Encoded Fimbriae. *Microbiology*, 185(3), 991–1000.
- Braymera, J. J., y Giedroc, D. P. (2014). Recent Developments in Copper and Zinc Homeostasis in Bacterial Pathogens. *Curr Opin Chem Biol.*, 0, 59–66.

- Breaker, R. R. (2011). Prospects for riboswitch discovery and analysis. *Molecular Cell*, 43(6), 867–79.
- Brill, J., Quinlan-Walshe, C., y Gottesman, S. (1988). Fine-structure mapping and identification of two regulators of capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2599–2611.
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., y Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 145–163.
- Broz, P., Ohlson, M. B., y Monack, D. M. (2012). Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes*, 3(2), 62–70.
- Buelow, D. R., & Raivio, T. L. (2010). Three (and more) component regulatory systems - Auxiliary regulators of bacterial histidine kinases. *Molecular Microbiology*, 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.
- Burr, T., Mitchell, J., Kolb, a, Minchin, S., & Busby, S. (2000). DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Research*, 28(9), 1864–1870.
- Bury-Moné, S., Nomane, Y., Reymond, N., Barbet, R., Jacquet, E., Imbeaud, S., Bouloc, P. (2009). Global analysis of extracytoplasmic stress signaling in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 5(9).
- Busby, S., y Ebright, R. H. (1994). Promoter Structure, Promoter Recognition, and Transcription Activation in Prokaryotes. *Cell*, 79, 743–746.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., y Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3(1), 3–8.
- Cao, J., Woodhall, M. R., Alvarez, J., Cartron, M. L., & 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.
- Carballès, F., Bertrand, C., Bouché, J.-P., & Cam, K. (1999). Regulation of *Escherichia coli* cell division genes *ftsA* and *ftsZ* by the two-component system *rcsC*–*rcsB*. *Molecular Microbiology*, 34(3), 442–450.
- Caron, M., Lafontaine, D., & Massé, E. (2010). Small RNA-mediated regulation at the level of transcript stability. *RNA Biol.*, 7(2), 140–144.
- Cashin, P., Goldsack, L., Hall, D., y O’Toole, R. (2006). Contrasting signal transduction mechanisms in bacterial and eukaryotic gene transcription. *FEMS Microbiology Letters*, 261(2), 155–164.

- Castanié-Cornet, M. P., Cam, K., Bastiat, B., Cros, A., Bordes, P., y Gutierrez, C. (2010). Acid stress response in *Escherichia coli*: Mechanism of regulation of *gadA* transcription by RcsB and GadE. *Nucleic Acids Research*, *38*(11), 3546–3554.
- 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 (New York, N.Y.)*, *301*(5638), 1383–1387.
- Chaturvedi, K. S., & Henderson, J. P. (2014). Pathogenic adaptations to host-derived antibacterial copper. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *4*(February), 1–12.
- Chaudhuri, R. R., Morgan, E., Peters, S. E., Pleasance, S. J., Hudson, D. L., Davies, H. M., Stevens, M. P. (2013). Comprehensive assignment of roles for *Salmonella typhimurium* genes in intestinal colonization of food-producing animals. *PLoS Genetics*, *9*(4), 1-11.
- 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. *Molecular Microbiology*, *63*(5), 1307–1318.
- Chen, M. H., Takeda, S., Yamada, H., Ishii, Y., Yamashino, T., & Mizuno, T. (2001). Characterization of the RcsC -> YojN -> RcsB Phosphorelay Signaling Pathway Involved in Capsular Synthesis in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *65*(10) 2364-2367.
- 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.
- Clarke, D. J. (2010). The Rcs phosphorelay: more than just a two-component pathway. *Future Microbiology*, *5*(8), 1173–84.
- Clarke, D. J., Joyce, S., Toutain, C. M., Jacq, A., y Holland, I. B. (2002). Genetic analysis of the RcsC sensor kinase from *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, *184*(4), 1204–1208.
- Coburn, B., Grassl, G., y Finlay, B. B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, *85*(2), 112–118.
- Collins, Y. E., y Stotzky, G. (1992). Heavy Metals Alter the Electrokinetic Properties of Bacteria, Yeast, and Clay Minerals. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(5), 1592–1600.
- Connolly, L., De Las Peñas, A., Alba, B. M., y Gross, C. (1997). The response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is controlled by partially overlapping pathways. *Genes and Development*, *11*(15), 2012–2021.

- Costa, C. S., y Antón, D. N. (2001). Role of the *ftsA1p* promoter in the resistance of mucoid mutants of *Salmonella enterica* to mecillinam: Characterization of a new type of mucoid mutant. *FEMS Microbiology Letters*, 200(2), 201–205.
- Crawford, R. W., Rosales-Reyes, R., Ramírez-Aguilar, M. D. L. L., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C., & Gunn, J. S. (2010). Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4353–4358.
- Danese, P. N., Pratt, L., y Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3593–3596.
- 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 and Development*, 11(9), 1183–1193.
- Datsenko, K., y Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645.
- Davalos-Garcia, M., Conter, A., Toesca, I., Gutierrez, C., y Cam, K. (2001). Regulation of *osmC* Gene Expression by the Two-Component System *rcsB-rcsC* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5870–5876.
- De Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., y Wiersinga, W. J. (2012). Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathogens*, 8(10), 1–9.
- De Wulf, P., Kwon, O., y Lin, E. C. C. (1999). The CpxRA signal transduction system of *Escherichia coli*: Growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. *Journal of Bacteriology*, 181(21), 6772–6778.
- De Wulf, P., y Lin, E. C. C. (2000). Cpx two-component signal transduction in *Escherichia coli*: Excessive CpxR-P levels underlie CpxA* phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1423–1426.
- 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.
- deHaset, P. L., y Helmann, J. D. (1995). Open complex formation by *Escherichia coli* RNA polymerase: the mechanism of polymerase-induced strand separation of double helical DNA. *Mol Microbiol*, 16(5), 817–824.
- Delgado, M., Mouslim, C., y Groisman, E. (2006). The PmrA/PmrB and RcsC/YojN/RcsB systems control expression of the *Salmonella* O-antigen chain length determinant. *Molecular Microbiology*, 60(1), 39–50.

- Desideri, A., y Falconi, M. (2003). Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 6), 1322–1325.
- Detweiler, C. S., Monack, D. M., Brodsky, I. E., Mathew, H., y Falkow, S. (2003). virK, somA and rcsC are important for systemic Salmonella enterica serovar Typhimurium infection and cationic peptide resistance. *Molecular Microbiology*, 48, 385–400.
- DiGiuseppe, P., y Silhavy, T. J. (2003). Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System. *J. Bacteriol.*, 185(8), 2432–2440.
- Ding, Y., Davis, B. M., y Waldor, M. K. (2004). Hfq is essential for Vibrio cholerae virulence and downregulates σ^E expression. *Molecular Microbiology*, 53(1), 345–354.
- Dorel, C., Lejeune, P., y Rodriguez, 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.
- Duguay, A. R., y Silhavy, T. J. (2004). Quality control in the bacterial periplasm. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1-3), 121–134.
- Dupont, C., Grass, G., y Rensing, C. (2011). Copper toxicity and the origin of bacterial resistance: new insights and applications. *Metallomics.*, 3(11), 1109–18.
- Endt, K., Stecher, B., Chaffron, S., Slack, E., Tchitchek, N., Benecke, A., Hardt, W.-D. (2010). The Microbiota Mediates Pathogen Clearance from the Gut Lumen after Non-Typhoidal Salmonella Diarrhea. *PLoS Pathogens*, 6(9), 1-18.
- Erickson, K., y Detweiler C. S. (2006). The Rcs phosphorelay system is specific to enteric pathogens/ commensals and activates ydeI, a gene important for persistent Salmonella infection of mice. *Mol Microbiol*, 62(3), 883–894.
- 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(9), 2989–2997.
- Estrem, S. T., Gaal, T., Ross, W., & Gourse, R. L. (1998). Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(August), 9761–9766.
- Estrem, S. T., Ross, W., Gaal, T., Chen, Z. W. S., Niu, W., Ebright, R. H., y Gourse, R. L. (1999). Bacterial promoter architecture: Subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Genes and Development*, 13(16), 2134–2147.
- Fang, F. C., DeGroot, M. a, Foster, J. W., Bäuml, a J., Ochsner, U., Testerman, T., Laessig, T. (1999). Virulent Salmonella typhimurium has two periplasmic Cu, Zn-superoxide dismutases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), 7502–7507.

- Farr, S. B., y Kogoma, T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev*, 55(4), 561–85.
- Fedrigo, G. V, Campoy, E. M., Di Venanzio, G., Colombo, M. I., y García Vescovi, E. (2011). *Serratia marcescens* is able to survive and proliferate in autophagic-like vacuoles inside non-phagocytic cells. *PLoS One*, 6(8), 1-15.
- Ferrières, L., y Clarke, D. J. (2003). The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1665–1682.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(14), 5189–5193.
- Fierer, J., y Guiney, D. G. (2001). Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(7), 775–80.
- Finney, L. A., y O'Halloran, T. V. (2003). Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science*, 300(5621), 931–936.
- 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.
- Francez-Charlot, A., Laugel, B., Van Gemert, A., Dubarry, N., Wiorowski, F., Castanié-Cornet, M. P., Cam, K. (2003). RcsCDB His-Asp phosphorelay system negatively regulates the *flhDC* operon in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 49(3), 823–832.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., y Nies, D. H. (2003). Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 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 (p. 561). oxford: Clarendon Press.
- Gabbianelli, R., D'Orazio, M., Pacello, F., O'Neill, P., Nicolini, L., Rotilio, G., y Battistoni, A. (2004). Distinctive functional features in prokaryotic and eukaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biol Chem.*, 385(8), 749–754.
- Galas, D. J., & Schmitz, A. (1978). DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Research*, 5(9), 3157–3170.

- Garai, P., Gnanadhas, D. P., & Chakravorty, D. (2012). Salmonella enterica serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence*, 3(4), 377–388.
- García-Calderón, C. B., García-Quintanilla, M., Casadesús, J., y Ramos-Morales, F. (2005). Virulence attenuation in Salmonella enterica rcsC mutants with constitutive activation of the Rcs system. *Microbiology*, 151(2), 579–588.
- Gee, J. M., Valderas, M. W., Kovach, M. E., Grippe, V. K., Robertson, G. T., Ng, W., Roop, M. R. (2005). The Brucella abortus Cu⁺, Zn Superoxide Dismutase Is Required for Optimal Resistance to Oxidative Killing by Murine Macrophages and Wild-Type Virulence in Experimentally Infected Mice. *Infection and Immunity*, 73(5), 2873–2880.
- Georg, J., y Hess, W. R. (2011). cis-Antisense RNA, Another Level of Gene Regulation in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 286–300.
- Gervais, F. G., y Drapeau, G. R. (1992). Identification, cloning, and characterization of rcsF, a new regulator gene for exopolysaccharide synthesis that suppresses the division mutation ftsZ84 in Escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, 174(24), 8016–8022.
- Golubeva, Y., y Slauch, J. M. (2006). Salmonella enterica serovar typhimurium periplasmic superoxide dismutase SodCI is a member of the PhoPQ regulon and is induced in macrophages. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7853–7861.
- Gong, H., Vu, G. P., Bai, Y., Yang, E., Liu, F., y Lu, S. (2010). Differential expression of Salmonella type III secretion system factors InvJ, PrgJ, SipC, SipD, SopA and SopB in cultures and in mice. *Microbiology*, 156, 116–127.
- Gottesman, S. (1996). Osmotic shock induction of capsule synthesis in Escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology*, 178(4), 1204–1206.
- Gottesman, S., y Storz, G. (2010). Bacterial Small RNA Regulators: Versatile Roles and Rapidly Evolving Variations. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, pp.1-16
- Gottesman, S., y Stout, V. (1991). Regulation of capsular polysaccharide synthesis in Escherichia coli K12. *Molecular Microbiology*, 5(7), 1599–1606.
- Grass, G., y Rensing, C. (2001). CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in Escherichia coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 286(5), 902–908.
- Grass, G., Thakali, K., Klebba, P. E., Thieme, D., Müller, A., Wildner, G. F., y Rensing, C. (2004). Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 186(17),

- Grimshaw, J. P. a, Stirnimann, C. U., Brozzo, M. S., Malojcic, G., Grütter, M. G., Capitani, G., y Glockshuber, R. (2008). DsbL and DsbI Form a Specific Dithiol Oxidase System for Periplasmic Arylsulfate Sulfotransferase in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 380(4), 667–680.
- Guisbert, E., Rhodius, V., Ahuja, N., Witkin, E., y Gross, C. (2007). Hfq modulates the σ^E -mediated envelope stress response and the σ^{32} -mediated cytoplasmic stress response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1963–1973.
- Gupta, S. D., Lee, B. T. O., Camakaris, J., y Wu, H. C. (1995). Identification of cutC and cutF (nlpE) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 177(15), 4207–4215.
- Gupta, S. D., Wu, H. C., y Rick, P. D. (1997). A *Salmonella typhimurium* genetic locus which confers copper tolerance on copper-sensitive mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(16), 4977–4984.
- Hagiwara, D., Sugiura, M., Oshima, T., Mori, H., Aiba, H., Yamashino, T., y Mizuno, T. (2003). Genome-wide analyses revealing a signaling network of the RcsC-YojN-RcsB phosphorelay system in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 185(19), 5735–5746.
- Hakemian, A. S., Kondapalli, K. C., Telser, J., Hoffman, B. M., Stemmler, T. L., y Rosenzweig, A. C. (2008). The Metal Centers of Particulate Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biochemistry*, 47(26),
- Heras, B., Totsika, M., Jarrott, R., Shouldice, S. R., Guncar, G., Achard, M. E. S. Schembri, M. (2010). Structural and functional characterization of three DsbA paralogues from *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18423–18432.
- Hiniker, A., Collet, J. F., y Bardwell, J. C. (2005). Copper stress causes an in vivo requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33785–33791.
- Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2005). Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 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., Yamamoto, K., y Oshima, T. (2007). Transcriptomic Responses of Bacterial Cells to Sublethal Metal Ion Stress. En *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (pp. 73–115).
- Hobman, J., Wilkie, J., y Brown, N. (2005). A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators. *Biometals*, 18(4), 429–436.

- Hopkins, J. F., Panja, S., y Woodson, S. (2011). Rapid binding and release of Hfq from ternary complexes during RNA annealing. *Nucleic Acids Research*, 39(12), 5193–5202.
- Huang, Y. H., Ferrières, L., y Clarke, D. J. (2006). The role of the Rcs phosphorelay in Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*, 157(3), 206–212.
- Hughes, M. N. y Poole, R. K. (1989). Metals and microorganisms. London: Chapman and Hall.
- Humphreys, S., Rowley, G., Stevenson, A., Muna, F., Woodward, M. J., Gilbert, S., Kormanec, J. (2004). Role of the Two-Component Regulator CpxAR in the Virulence of Salmonella enterica Serotype Typhimurium. *Infection and Immunity*, 72(8), 4654–4661.
- Imlay, J., Chin, S., y Linn, S. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*, 240(4852), 640–642.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17775–17779.
- Jang, S., y Imlay, J. (2007). Micromolar Intracellular Hydrogen Peroxide Disrupts Metabolism by Damaging Iron-Sulfur Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 929–937.
- Johnson, D. C., Ishihama, y Stevens, M. (2003). Involvement of region 4 of the sigma70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation of the lux operon during quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett*, 228, 193–201.
- Kadokura, H. (2004). Snapshots of DsbA in Action: Detection of Proteins in the Process of Oxidative Folding. *Science*, 303(5657), 534–537.
- Kadokura, H., Katzen, F., & Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in Prokaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), 111–135.
- Karlsen, O., Lillehaug, J. R., y Jensen, H. B. (2008). The presence of multiple c-type cytochromes at the surface of the methanotrophic bacterium Methylococcus capsulatus (Bath) is regulated by copper. *Molecular Microbiology*, 70(1), 15–26.
- Kashmiri, Z. N., y Mankar, S. (2014). Free radicals and oxidative stress in bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(9), 34–40.
- Kato, A., Hayashi, H., Nomura, W., Emori, H., Hagihara, K., y Utsumi, R. (2012). A connector-like factor, CacA, links RssB/RpoS and the CpxR/CpxA two-component system in Salmonella. *BMC Microbiology*, 12(1), 224–236

- Kelley, W. L., y Georgopoulos, C. (1997). Positive control of the two-component RcsC/B signal transduction network by DjIA: a member of the DnaJ family of molecular chaperones in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 25(5), 913–931.
- Kelm, O., Kiecker, C., Geider, K., & Bernhard, F. (1997). Interaction of the regulator proteins RcsA and RcsB with the promoter of the operon for amylovoran biosynthesis in *Erwinia amylovora*. *Molecular & General Genetics: MGG*, 256(1), 72–83.
- Kershaw, C. J., Brown, N. L., Constantinidou, C., Patel, M. D., y Hobman, J. L. (2005). The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology*, 151(4), 1187–1198.
- Keseler, I. M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martinez, C., Karp, P. D. (2013). EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 605–612.
- Kiaune, L. y Singhasemanon, N. (2011). Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.*, 213, 1–26.
- Korshunov, S., y Imlay, J. (2006). Detection and quantification of superoxide formed within the periplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(17), 6326–6334.
- Kroger, C., Dillon, S. C., Cameron, a. D. S., Papenfort, K., Sivasankaran, S. K., Hokamp, K., Hinton, J. C. D. (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(20), 1277–1286.
- Lane, D., Prentki, P., y Chandler, M. (1992). Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiological Reviews*, 56(4), 509–528.
- Laubacher, M. E., y Ades, S. E. (2008). The Rcs phosphorelay is a cell envelope stress response activated by peptidoglycan stress and contributes to intrinsic antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2065–2074.
- Leblanc, S. K. D., Oates, C. W., y Raivio, T. L. (2011). Characterization of the induction and cellular role of the BaeSR two-component envelope stress response of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 193(13), 3367–3375.
- Lee, L. J., Barrett, J., y Poole, R. K. (2005). Genome-Wide Transcriptional Response of Chemostat-Cultured. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 1124–1134.
- Lemire, J. a., Harrison, J. J., y Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 371–384.
- Leverrier, P., Declercq, J. P., Denoncin, K., Vertommen, D., Hiniker, A., Cho, S. H., y Collet, J. F. (2011). Crystal structure of the outer membrane protein RcsF, a

- new substrate for the periplasmic protein-disulfide isomerase DsbC. *Journal of Biological Chemistry*, 286(19), 16734–16742.
- Lim, S.-Y., Joe, M.-H., Song, S.-S., Lee, M.-H., Foster, J. W., y Park, Y.-K. (2002). cuiD Is a Crucial Gene for Survival at High Copper Environment in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Mol. 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).
- Lin, D., Kim, B., y Slauch, J. M. (2009). DsbL and DsbI contribute to periplasmic disulfide bond formation in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microbiology*, 155(12), 4014–4024.
- Lin, D., Rao, C. V., & Slauch, J. M. (2008). The Salmonella SPI1 type three secretion system responds to periplasmic disulfide bond status via the flagellar apparatus and the RcsCDB system. *Journal of Bacteriology*, 190(1), 87–97.
- Liu, J. Z., Jellbauer, S., Poe, A. J., Ton, V., Pesciaroli, M., Kehl-Fie, T. E., Raffatellu, M. (2012). Zinc Sequestration by the Neutrophil Protein Calprotectin Enhances Salmonella Growth in the Inflamed Gut. *Cell Host & Microbe*, 11(3), 227–239.
- Lund, P., Ford, S. J., y Brown, N. L. (1986). Transcriptional regulation of the mercury-resistance genes of transposon Tn501. *Journal of General Microbiology*, 132(2), 465–480.
- Macomber, L., y Imlay, J. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(20), 8344–8349.
- Macomber, L., Rensing, C., & Imlay, J. (2007). Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 189(5), 1616–1626.
- Magnani, D. y Solioz, M. (2007). How Bacteria Handle Copper. En D. H. Nies y S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Heidelberg, Springer. 259-285
- Magrisso, S., Erel, Y., y Belkin, S. (2008). Microbial reporters of metal bioavailability. *Microbial Biotechnology*, 1(4), 320–330.
- Majdalani, N., y Gottesman, S. (2005). The Rcs Phosphorelay: A Complex Signal Transduction System. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 379–405.
- Majdalani, N., y Gottesman, S. (2005). The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol*, 59, 379–405.

- Majdalani, N., Heck, M., Stout, V., y Gottesman, S. (2005). Role of RcsF in signaling to the Rcs phosphorelay pathway in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *187*(19), 6770–6778.
- Majdalani, N., Hernandez, D., y Gottesman, S. (2002). Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Molecular Microbiology*, *46*(3), 813–826.
- Manon, R., Nadia, A., Isabelle, V., y Philippe, V. (2008). The Different Strategies Used by *Salmonella* to Invade Host Cells. pp. 339-364
- Martell, D. J., Joshi, C. P., Gaballa, A., Santiago, A. G., Chen, T.-Y., Jung, W., Chen, P. (2015). Metalloregulator CueR biases RNA polymerase's kinetic sampling of dead-end or open complex to repress or activate transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(44), 13467-13472.
- Martin-Orozco, N., Touret, N., Zaharik, M. L., Park, E., Kopelman, R., Miller, S., Grinstein, S. (2006). Visualization of Vacuolar Acidification-induced Transcription of Genes of Pathogens inside Macrophages. *Molecular Biology of the Cell*, *17*, 498–510.
- McCracken, A., & Timms, P. (1999). Efficiency of transcription from promoter sequence variants in *Lactobacillus* is both strain and context dependent. *Journal of Bacteriology*, *181*(20), 6569–6572.
- Miki, T., Okada, N., y Danbara, H. (2004). Two periplasmic bisulfide oxidoreductases, DsbA and SrgA, target outer membrane protein SpiA, a component of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(33), 34631–34642.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory
- Mitchell, J. E., Zheng, D., Busby, S. J. W., y Minchin, S. D. (2003). Identification and analysis of “extended -10” promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, *31*(16), 4689–4695.
- Mitschke, J., Georg, J., Scholz, I., Sharma, C. M., Dienst, D., Bantscheff, J., Hess, W. R. (2011). An experimentally anchored map of transcriptional start sites in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(5), 2124–2129.
- Mousslim, C., Delgado, M., y Groisman, E. (2004). Activation of the RcsC/YojN/RcsB phosphorelay system attenuates *Salmonella* virulence. *Molecular Microbiology*, *54*(2), 386–95.
- Mousslim, C., Latifi, T., y Groisman, E. (2003). Signal-dependent Requirement for the Co-activator Protein RcsA in Transcription of the RcsB-regulated *ugd* Gene. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(50), 50588–50595.

- Nakamura, H. (2005). Thioredoxin and its related molecules. *Antioxid.Redox.Signal*, 7, 823–838.
- Nakayama, S. I., Kushiro, A., Asahara, T., Tanaka, R. I., Hu, L., Kopecko, D. J., y Watanabe, H. (2003). Activation of hilA expression at low pH requires the signal sensor CpxA, but not the cognate response regulator CpxR, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology*, 149(10), 2809–2817.
- Newberry, K. J., y Brennan, R. G. (2004). The Structural Mechanism for Transcription Activation by MerR Family Member Multidrug Transporter Activation, N Terminus. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20356–20362.
- Neyens, E., y Baeyens, J. (2003). A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique. *Journal of Hazardous Materials*, 98(1-3), 33–50.
- Nies, D. (2007). Bacterial transition metal homeostasis. En D. Nies y S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Heidelberg, Springer.
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbial Biotechnol*, 51, 730–750.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 313–339.
- O'Halloran, T. V., Frantz, B., Shin, M. K., Ralston, D. M., y Wright, J. G. (1989). The MerR heavy metal receptor mediates positive activation in a topologically novel transcription complex. *Cell*, 56(1), 119–129.
- O'Halloran, T. V. y Walsh, C. (1987). Metalloregulatory DNA-binding protein encoded by the merR gene: isolation and characterization. *Science*, 235(4785), 211–214.
- 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(8), 2470–2483.
- Ophir, T., & Gutnick, D. L. (1994). A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 740–745.
- Osman, D., y Cavet, J. S. (2008). Copper Homeostasis in Bacteria. En *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Inc. pp. 217-247
- Osman, D., Patterson, C. J., Bailey, K., Fisher, K., Robinson, N. J., Rigby, S. E. J., y Cavet, J. S. (2013). The copper supply pathway to a *Salmonella* Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P1B-type ATPase copper efflux and periplasmic CueP. *Molecular Microbiology*, 87(3), 466–477.

- Osman, D., Waldron, K. J., Denton, H., Taylor, C. M., Grant, A. J., Mastroeni, P., Cavet, J. S. (2010). Copper homeostasis in Salmonella is atypical and copper-CueP is a major periplasmic metal complex. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25259–25268.
- Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., y Aiba, H. (2011). PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), 13059–13064.
- Otto, K., y Silhavy, T. J. (2002). Surface sensing and adhesion of Escherichia coli controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(4), 2287–2292.
- Outten, C. E., Outten, F. W., y O'Halloran, T. V. (1999). DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 37517–37524.
- Outten, F. W., Huffman, D. L., Hale, J., y O'Halloran, T. V. (2001). The Independent cue and cus Systems Confer Copper Tolerance during Aerobic and Anaerobic Growth in Escherichia coli. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30670–30677.
- Papenfort, K., Said, N., Welsink, T., Lucchini, S., Hinton, J. C. D., y Vogel, J. (2009). Specific and pleiotropic patterns of mRNA regulation by ArcZ, a conserved, Hfq-dependent small RNA. *Molecular Microbiology*, 74(1), 139–158.
- Pearson, R. G. (1963). Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society*, 85(22), 3533–3539.
- Peña, M. M., Lee, J., y Thiele, D. J. (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *The Journal of Nutrition*, 129(7), 1251–1260.
- Pescaretti, M., López, F. E., Morero, R. D., y Delgado, M. (2010). Transcriptional autoregulation of the RcsCDB phosphorelay system in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microbiology*, 156(12), 3513–3521.
- Pescaretti, M., Morero, R., & Delgado, M. (2009). Identification of a new promoter for the response regulator rcsB expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett*, 300(2), 165–173.
- Philips, S. J., Canalizo-Hernandez, M., Yildirim, I., Schatz, G. C., Mondragon, a., & O'Halloran, T. V. (2015). Allosteric transcriptional regulation via changes in the overall topology of the core promoter. *Science*, 349(6250), 877–881.
- Piddington, D. L., Fang, F. C., Laessig, T., Cooper, M., Orme, I. M., Buchmeier, N., y Cooper, A. M. (2001). Cu²⁺, Zn Superoxide Dismutase of Mycobacterium tuberculosis Contributes to Survival in Activated Macrophages That Are Generating an Oxidative Burst. *Infection and Immunity*, 69(8), 4980–4987.

- Pogliano, J., Lynch, 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 & Development*, *11*(9), 1169–1182.
- Poh, J., Odendall, C., Spanos, A., Boyle, C., Liu, M., Freemont, P., y Holden, D. W. (2008). SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling. *Cellular Microbiology*, *10*(1), 20–30.
- Pontel, L. B. 2009. “Caracterización de factores específicos de resistencia a metales de transición en *Salmonella enterica*” Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Argentina.
- Pontel, L. B., Audero, M. E. P., Espariz, M., Checa, S. K., & 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. *Molecular Microbiology*, *66*(3), 814–825.
- Pontel, L. B., Checa, S. K., & Soncini, F. C. (2015). Bacterial Copper Resistance and Virulence. En *Bacteria-Metal Interactions* (pp. 1–19). Springer International Publishing.
- Pontel, L. B., Pezza, A., y Soncini, F. C. (2010). Copper stress targets the Rcs system to induce multiaggregative behavior in a copper-sensitive *Salmonella* strain. *Journal of Bacteriology*, *192*(23), 6287–6290.
- Pontel, L. B., Scampoli, N. L., Porwollik, S., Checa, S. K., McClelland, M., y Soncini, F. C. (2014). Identification of a *Salmonella* ancillary copper detoxification mechanism by a comparative analysis of the genome-wide transcriptional response to copper and zinc excess. *Microbiology*, *160*(8), 1659–1669.
- Pontel, L. B., y Soncini, F. C. (2009). Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Molecular Microbiology*, *73*(2), 212–225.
- Porcheron, G., Garénaux, A., Proulx, J., Sabri, M., y Dozois, C. M. (2013). Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*(90), 1-24.
- Prévost, K., Desnoyers, G., Jacques, J. F., Lavoie, F., y Massé, E. (2011). Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. *Genes and Development*, *25*(4), 385–396.
- Price, N. L., y Raivio, T. L. (2009). Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *Journal of Bacteriology*, *191*(6), 1798–1815.

- Rademacher, C., y Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology*, 158(10), 2451–2464.
- Raffatellu, M., George, M. D., Akiyama, Y., Hornsby, M. J., Nuccio, P., Paixao, T., Bäumlér, A. J. (2010). Lipocalin-2 resistance of Salmonella enterica serotype Typhimurium confers an advantage during life in the inflamed intestine. *Cell Host Microbe*, 5(5), 476–486.
- Raivio, T. L. (2014). Everything old is new again: An update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(8), 1529–1541.
- Raivio, T. L., Leblanc, S. K. D., y Price, N. L. (2013). The Escherichia coli Cpx Envelope Stress Response Regulates Genes of Diverse Function That Impact Antibiotic Resistance and Membrane Integrity. *Journal of Bacteriology*, 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. *Journal of Bacteriology*, 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. *Journal of Bacteriology*, 179(24), 7724–7733.
- Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B., & Rosen, B. P. (2000). CopA: An Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 652–656.
- Rensing, C., & Grass, G. (2003). Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 197–213.
- Robb, N. C., Cordes, T., Hwang, L. C., Gryte1, K., Duchi1, D., Craggs, T. D., Kapanidis1. (2013). The Transcription Bubble of the RNA Polymerase–Promoter Open Complex Exhibits Conformational Heterogeneity and Millisecond-Scale Dynamics: Implications for Transcription Start-Site Selection. *J Mol Biol*, 425(5), 875–885.
- Roberts, S. a, Weichsel, A., Grass, G., Thakali, K., Hazzard, J. T., Tollin, G., Montfort, W. R. (2002). Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2766–71.
- Robinson, N. J., y Winge, D. R. (2010). Copper Metallochaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 537–562.
- Ross, J., Ellis, M. J., Hossain, S., y Haniford, D. B. (2013). Hfq restructures RNA-IN and RNA-OUT and facilitates antisense pairing in the Tn10/IS10 system. *RNA*, 19(5), 670–84.

- Ross, W., Gosink, K. K., Salomon, J., Igarashi, K., Zou, C., Ishihama, A., Gourse, R. L. (1993). A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science*, 262(5138), 1407–1413.
- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J. y Roberts, M. (2006). Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 383–394.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X.-J., Beuzón, C. R., Blakey, A. N., Galyov, E. E., y Holden, D. W. (2002). Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the Salmonella typhimurium vacuolar membrane. *Molecular Microbiology*, 44(3), 645–61.
- Sakurai, T., & Kataoka, K. (2007). Basic and Applied Features of Multicopper Oxidases, CueO, BilirubinOxidase, and Laccase. *Chem Rec*, 7(4), 220–229.
- Salscheider, S. L., Jahn, A., y Schnetz, K. (2014). Transcriptional regulation by BglJ-RcsB, a pleiotropic heteromeric activator in Escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 2999–3008.
- Samanovic, M. I., Ding, C., Thiele, D. J., & Darwin, K. H. (2012). Copper in microbial pathogenesis: Meddling with the metal. *Cell Host and Microbe*, 11(2), 106–115.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*.
- Samelis, J., Ikeda, J. S., y Sofos, J. N. (2003). Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in Listeria monocytogenes and Salmonella Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with Escherichia coli O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 563–575.
- Santos, R. L., Zhang, S., Tsolis, R. M., Kingsley, R., Garry Adams, L., y Bäumlér, A. J. (2001). Animal models of Salmonella infections: Enteritis versus typhoid fever. *Microbes and Infection*, 3(14-15), 1335–1344.
- Sauer, E., y Weichenrieder, O. (2011). Structural basis for RNA 3'-end recognition by Hfq. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(32), 13065–13070.
- Shepherd, M., Heras, B., Achard, M. E. S., King, G. J., Argente, M. P., Kurth, F., McEwan, A. G. (2013). Structural and functional characterization of ScsC, a periplasmic thioredoxin-like protein from Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(13), 1494–506.
- Shi, X., Festa, R. a, Ioerger, T. R., Butler-Wu, S., Sacchettini, J. C., Darwin, K. heran, y Samanovica, M. I. (2014). tuberculosis Virulence The Copper-Responsive RicR Regulon Contributes to Mycobacterium, 5(1), 1–13.

- Shiba, Y., Miyagawa, H., Nagahama, H., Matsumoto, K., Kondo, D., Matsuoka, S., Hara, H. (2012). Exploring the relationship between lipoprotein mislocalization and activation of the Rcs signal transduction system in *Escherichia coli*. *Microbiology*, *158*(5), 1238–1248.
- Shiba, Y., Yokoyama, Y., Aono, Y., Kiuchi, T., Kusaka, J., Matsumoto, K., & Hara, H. (2004). Activation of the Rcs Signal Transduction System Is Responsible for the Thermosensitive Growth Defect of an *Escherichia coli* Mutant Lacking Phosphatidylglycerol and Cardiolipin. *Journal of Bacteriology*, *186*(19), 6526–6535.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(5), 1-16.
- Silver, S. y Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *32*(11), 587–605.
- Singh, S. K., Grass, G., Rensing, C., & Montfort, W. R. (2004). Cuprous Oxidase Activity of CueO from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *186*(22), 7815–7817.
- Sittka, A., Sharma, C. M., Rolle, K., & Vogel, J. (2009). Deep sequencing of *Salmonella* RNA associated with heterologous Hfq proteins in vivo reveals small RNAs as a major target class and identifies RNA processing phenotypes. *RNA Biology*, *6*(3), 266–275.
- Slauch, J. M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*, *80*(3), 580–583.
- Sly, L. M., Guiney, D. G., y Reiner, N. E. (2002). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium periplasmic superoxide dismutases SodCI and SodCII are required for protection against the phagocyte oxidative burst. *Infect Immun*, *70*(9), 5312–5315.
- Snyder, W. B., Davis, L. J. B., 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. *Journal of Bacteriology*, *177*(15), 4216–4223.
- Soncini, F. C., Vescovi, E. G., y Groisman, E. (1995). Transcriptional autoregulation of the *Salmonella typhimurium* phoPQ operon. *Journal of Bacteriology*, *177*(15), 4364–4371.
- Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing Vacuole – Moving with the Times. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(1), 38–45.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., y Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, *56*, 187–209.

- Storz, G., Vogel, J., y Wassarman, K. M. (2011). Regulation by Small RNAs in Bacteria: Expanding Frontiers. *Molecular Cell*, 43(6), 880–891.
- Stout, V., & Gottesman, S. (1990). RcsB and RcsC: A two-component regulator of capsule synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 659–669.
- Stoyanov, J., Magnani, D., y Solioz, M. (2003). Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 546(2-3), 391–394.
- Stoyanov, J. V., Hobman, J. L., y Brown, N. L. (2001). CueR (Ybbl) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Molecular Microbiology*, 39(2), 502–511.
- Strainic, M., Sullivan, J., Velevis, A., y DeHaseth, P. (1998). Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase: effects of the UP element on open complex formation and promoter clearance. *Biochemistry*, 37(51), 18074–80.
- Sutton, H. C., y Winterbourn, C. C. (1989). On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(1), 53–60.
- Takeda, S., Fujisawa, Y., Matsubara, M., Aiba, H., y Mizuno, T. (2001). A novel feature of the multistep phosphorelay in *Escherichia coli*: a revised model of the RcsC --> YojN --> RcsB signalling pathway implicated in capsular synthesis and swarming behaviour. *Molecular Microbiology*, 40(2), 440–450.
- Thieme, D., Neubauer, P., Nies, D. H., y Grass, G. (2008). Sandwich hybridization assay for sensitive detection of dynamic changes in mRNA transcript levels in crude *Escherichia coli* cell extracts in response to copper ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7463–7470.
- Thiennimitr, P., Winter, S. E. and, & Bäumler, A. J. (2012). Salmonella, the host and its microbiota. *Curr Opin Microbiol*, 15(1), 108–114.
- Tobe, T., Ando, H., Ishikawa, H., Abe, H., Tashiro, K., Hayashi, T., Sugimoto, N. (2005). Dual regulatory pathways integrating the RcsC-RcsD-RcsB signalling system control enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity. *Molecular Microbiology*, 58(1), 320–33.
- Tree, J., Ulett, G., Hobman, J., Constantinidou, C., Brown, N., Kershaw, C., McEwan, A. (2007). The multicopper oxidase (CueO) and cell aggregation in *Escherichia coli*. *Environ Microbiol.*, 9(8), 2110–2116.
- Tsolis, R. M., Bäumler, a J., y Heffron, F. (1995). Role of *Salmonella typhimurium* Mn-superoxide dismutase (SodA) in protection against early killing by J774 macrophages. *Infection and Immunity*, 63(5), 1739–44.

- Uchiya, K., Barbieri, M. a, Funato, K., Shah, a H., Stahl, P. D., y Groisman, E. (1999). A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. *The EMBO Journal*, 18(14), 3924–3933.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., y Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15264–15269.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M., y Udesen, C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Molecular Microbiology*, 51, 1525–1533.
- Van der Velden, a W., Lindgren, S. W., Worley, M. J., y Heffron, F. (2000). Salmonella pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by Salmonella enterica serotype typhimurium. *Infection and Immunity*, 68(10), 5702–5709.
- Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé, M., Virlogeux-Payant, I. (2012). Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis. *MicrobiologyOpen*, 1(3), 243–258.
- Vogt, S. L., Nevesinjac, A. Z., Humphries, R. M., Donnenberg, M. S., Armstrong, G. D., y Raivio, T. L. (2010). The Cpx envelope stress response both facilitates and inhibits elaboration of the enteropathogenic Escherichia coli bundle-forming pilus. *Molecular Microbiology*, 76(5), 1095–1110.
- Vogt, S. L., y Raivio, T. L. (2012). Just scratching the surface: An expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiology Letters*, 326(1), 2–11.
- Volkman, B. F., Lipson, D., Wemmer, D. E., y Kern, D. (2001). Two-state allosteric behavior in a single-domain signaling protein. *Science*, 291(5512), 2429–2433.
- Voskuil, M. I., And, K. V., y Chambliss, G. H. (1995). The -16 region, a vital sequence for the utilization of a promoter in Bacillus subtilis and Escherichia coil. *Molecular Microbiology*, 17(2), 271–279.
- Wackett, L. P., Dodge, A. G., Lynda, B. M., y Ellis, L. B. M. (2004). Microbial Genomics and the Periodic Table MINIREVIEW Microbial Genomics and the Periodic Table. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2), 647–655.
- Waldron, K. J., Tottey, S., Yanagisawa, S., Dennison, C., y Robinson, N. J. (2007). A periplasmic iron-binding protein contributes toward inward copper supply. *Journal of Biological Chemistry*, 282(6), 3837–3846.
- Walker, K., y Miller, V. L. (2009). Synchronous gene expression of the Yersinia enterocolitica Ysa type III secretion system and its effectors. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1816–1826.

- Wang, D., Korban, S. S., Pusey, P. L., y Zhao, Y. (2011). Characterization of the RcsC sensor kinase from *Erwinia amylovora* and other Enterobacteria. *Phytopathology*, 101(6), 710–717.
- Ward, S. K., Abomoelak, B., Hoye, E., Steinberg, H., y Adel, M. (2011). CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, 77(5), 1096–1110.
- Waters, L. S., y Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 136(4), 615–628.
- Wayne Outten, F., y Munson, G. P. (2013). Lability and liability of endogenous copper pools. *Journal of Bacteriology*, 195(20), 4553–4555.
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., y Petris, M. J. (2009). A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), 33949–33956.
- Winter, S. E., Winter, M. G., Ave, O. S., Ca, D., y Butler, B. P. (2011). NIH Public Access, 467(7314), 426–429.
- Wolfe, A. J., Parikh, N., Lima, B. P., y Zemaitaitis, B. (2008). Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2314–2322.
- Wolschendorf, F., Ackart, D., Shrestha, T. B., Hascall-Dove, L., Nolan, S., Lamichhane, G., Niederweis, M. (2011). Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1621–1626.
- Yamamoto, K., Hirao, K., Oshima, T., Aiba, H., Utsumi, R., y Ishihama, A. (2005). Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(2), 1448–1456.
- Yamamoto, K., y Ishihama, A. (2005). Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Molecular Microbiology*, 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.
- Yoon, B. Y., Kim, Y. H., Kim, N., Yun, B. Y., Kim, J. S., Lee, J. H., Ha, N. C. (2013). Structure of the periplasmic copper-binding protein CueP from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(10), 1867–1875.

- Yoon, B.-Y., Kima, J.-S., Umb, S.-H., Job, I., Yooa, J.-W., Leec, K., Hab, N.-C. (2014). Periplasmic disulfide isomerase DsbC is involved in the reduction of copper binding protein CueP from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(4), 971–976.
- Yoon, B.-Y., Yeom, J.-H., Kim, J.-S., Um, S.-H., Jo, I., Lee, K., Ha, N.-C. (2014). Direct ROS scavenging activity of CueP from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecules and Cells*, 37(2), 100–108.
- Zhen, M., Jacobsen, F. E., y Giedroc, D. P. (2010). Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis. *Chem Rev*, 109(10), 4644–4681.