



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario**

**Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas**

**Reconocimiento selectivo sensor/operador en  
reguladores de respuesta a metales monovalentes en  
*Salmonella enterica***

**Presentada por: Lic. María Victoria Humbert**

**Director: Dr. Fernando C. Soncini**

**Rosario, Argentina**

**2014**

# **Reconocimiento selectivo sensor/operador en reguladores de respuesta a metales monovalentes en *Salmonella enterica***

**María Victoria Humbert**

Licenciada 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 (IBR-CONICET), área Biología Molecular de Microorganismos Patógenos, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 04 de Junio de 2009 y el 27 de Marzo de 2014, bajo la dirección del Dr. Fernando C. Soncini.

*A mi familia y amigos*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer enormemente al Dr. Fernando Soncini por haberme dado la posibilidad de realizar mi Tesis Doctoral bajo su dirección. Por estar siempre dispuesto a escucharme y a brindarme generosamente toda su experiencia al momento de discutir ideas y resultados. Por su incansable empuje, por su dedicación y paciencia, Gracias. A las Dras. Eleonora García Vescovi y Susana Checa, por sus innumerables consejos y vasta experiencia. Por brindarme siempre una segunda opinión desde otro punto de vista, muchas veces esclarecedora. Al Dr. Rodolfo Rasia, por haberme ayudado a comprender, al menos un poquito, ese distante y tan temido mundo de la Biofísica. Al Dr. Iñigo Lasa, por haberme brindado información valiosa para el desarrollo de mi Tesis. A mis inigualables compañeros del laboratorio, a los que empezaron y terminaron antes que yo y a los que siguen estando, por haber hecho de cada uno de mis días de trabajo un momento inolvidable. Por todas y cada una de esas anécdotas, comentarios, miradas, complicidades y risas compartidas. Por entenderme, a veces, y por aguantarme siempre. Porque al cabo de estos cinco años no sólo me llevo el título de Doctora, también me llevo amigos. Quisiera finalmente también agradecer a mi familia, porque gran parte de mi esfuerzo se sustenta en ellos. GRACIAS.

Parte de los resultados que se describen en el primer capítulo de esta Tesis han sido publicados en la siguiente revista y presentaciones científicas:

### Publicación:

**Humbert MV**, Rassia R, Checa SK y Soncini FC. **2013**. *Protein signatures that promote operator selectivity among paralog MerR monovalent metal-ion regulators*. *J. Biol. Chem.* 288(28): 20510-9. doi: 10.1074/jbc.M113.452797. Epub 2013 Jun 3.

### Presentaciones científicas:

- **Humbert MV**, Checa SK and Soncini FC. **2013**. *Co-evolution of the regulator/operator selectivity among MerR transcription factors*. IX Argentine Meeting of General Microbiology. Argentine Society of General Microbiology (SAMIGE).
- **Humbert MV**, Checa SK and Soncini FC. **2011**. *Insights into the co-evolution of regulator/operator selectivity among MerR transcription factors*. XLVII Reunion Meeting. 47<sup>th</sup> Annual Meeting. Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research (SAIB). *Biocell* (Supplement 2011) 35, pp 53.
- **Humbert MV**, Checa SK and Soncini FC. **2010**. *Molecular bases of sensor/operator selectivity in MerR monovalent metal ion sensors*. 3<sup>rd</sup> Latin American Protein Society Meeting. XXXIX Annual Meeting of the Argentinean Biophysical Society (SAB 2010). Abstract book P091, pp 209.
- Soncini FC, Checa SK, Ibáñez MM, Zafra M, **Humbert MV**, Cerminati S and Pérez Audero ME. **2010**. *Operator discrimination between paralog MerR regulators in Salmonella*. 7<sup>th</sup> Internacional Biometals Symposium. (Supplement 2010) S4-03, pp 25.
- *Ibáñez MM, Humbert MV, Zafra M, Cerminati S, Checa SK and Soncini FC. 2009. Molecular bases of metal/operator selectivity in MerR monovalent metal ion sensors*. XLV Reunion Meeting. 45<sup>th</sup> Annual Meeting. Argentine Society for Biochemistry and Molecular Biology Research (SAIB). *Biocell* (Supplement 2009) 33, pp 112.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1. El género <i>Salmonella</i>	14
1.1 Ciclo infectivo de <i>Salmonella</i> y supervivencia en el medio ambiente	15
2. El género <i>Escherichia</i>	16
3. <i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i> como modelos de estudio	17
4. Reguladores transcripcionales	18
4.1 Familia MerR de reguladores transcripcionales	18
4.2 Estructura de reguladores de la familia MerR	19
4.2.1 Dominio HTH: un denominador común en reguladores transcripcionales	20
4.3 Reguladores MerR y su interacción con el ADN	23
4.3.1 Reguladores MerR típicos: Paradigma clásico de regulación transcripcional	23
4.3.2 Reguladores MerR no convencionales	26
4.3.2.1 Reguladores CarA/CarS	28
4.3.2.2 Reguladores LitR	31
4.3.2.3 Reguladores MlrA	32
4.3.2.4 Reguladores BluR	37
4.3.2.5 Reguladores Hsp_2	37
5. Metales: esenciales, no esenciales y tóxicos	38
5.1 Clasificación de metales	38
5.2 Estrategias de homeostasis/resistencia a metales de transición	39
6. Homeostasis de cobre	40
6.1 Homeostasis de cobre en <i>E. coli</i>	41
6.1.1 El regulón <i>cue</i>	42
6.1.2 El regulón <i>cus</i>	43
6.1.3 El sistema alternativo de resistencia a cobre PcoABCD	44
6.2 Homeostasis de cobre en <i>Salmonella</i>	45
6.2.1 El regulón <i>cue</i>	45

7. Toxicidad y resistencia a oro	46
7.1 Resistencia a oro en <i>Salmonella</i> . El regulón <i>gol</i>	47
8. Sistemas <i>cue</i> y <i>gol</i> : funcional y estructuralmente análogos	49
8.1 Operadores de los regulones <i>cue</i> y <i>gol</i> : similares pero específicos	51
<b>OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>56</b>
1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	57
2. Medios de cultivo y antibióticos	57
3. Extracción de ADN	64
3.1 Extracción de ADN cromosomal	64
3.2 Extracción de ADN plasmídico	64
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	65
5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	66
6. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	67
7. Digestión de ADN con enzimas de restricción	67
8. Tratamiento del vector digerido con fosfatasa alcalina	67
9. Reacción de ligación de fragmentos de ADN	67
10. Transformación de <i>E. coli</i> y <i>S. Typhimurium</i> con ADN plasmídico (electroporación)	68
10.1 Preparación de células competentes	68
10.2 Transformación física: electroporación. Selección de células transformantes	68
10.3 Verificación del clonado	69
11. Transformación de <i>E. coli</i> y <i>S. Typhimurium</i> con ADN lineal (electroporación). Construcción de mutantes cromosomales	69
12. Construcción de fusiones transcripcionales cromosomales a <i>lacZY</i>	71
13. Transducción generalizada con bacteriófago P22	73
13.1 Obtención de lisados de la cepa dadora en medio semisólido	73
13.2 Obtención de lisados de la cepa dadora en medio líquido	74
13.3 Transducción generalizada	74
14. Transducción generalizada con bacteriófago P1	75
14.1 Obtención de lisados de la cepa dadora en medio semisólido	75

14.2	Transducción generalizada	75
<b>15.</b>	<b>Ensayos de actividad <math>\beta</math>-galactosidasa</b>	<b>76</b>
15.1	En medio sólido: análisis cualitativo	76
15.2	En medio líquido: análisis cuantitativo	76
<b>16.</b>	<b>Construcción de los plásmidos de expresión pCueR, pGolS y sus respectivas mutantes quimeras y puntuales</b>	<b>77</b>
16.1	Construcción de los alelos silvestres <i>cueR</i> y <i>golS</i>	77
16.2	Construcción de los alelos híbridos <i>cueR-N<sub>S</sub></i> , <i>cueR-HTH1<sub>S</sub></i> , <i>cueR-(HTH1+L)<sub>S</sub></i> y <i>golS-N<sub>R</sub></i>	78
16.3	Construcción de los alelos híbridos <i>cueR-(L+HTH2)<sub>S</sub></i> y <i>cueR-HTH2<sub>S</sub></i>	78
16.4	Construcción de los alelos híbridos <i>cueR-<math>\alpha</math>2<sub>S</sub></i> , <i>golS-<math>\alpha</math>2<sub>R</sub></i> y mutantes puntuales	78
16.5	Construcción de los alelos híbridos <i>cueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub></i> y <i>cueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub></i>	86
16.6	Clonado de los alelos silvestres, híbridos y mutantes puntuales en vectores de expresión	86
<b>17.</b>	<b>Expresión y purificación de CueR, CueR-<math>\alpha</math>2<sub>S</sub>, GolS y GolS-<math>\alpha</math>2<sub>R</sub> nativas</b>	<b>87</b>
<b>18.</b>	<b>Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida</b>	<b>88</b>
<b>19.</b>	<b>Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (“Western blot”)</b>	<b>88</b>
<b>20.</b>	<b>Determinación de la concentración de proteínas</b>	<b>89</b>
<b>21.</b>	<b>Análisis estructural de proteínas por dicroísmo circular</b>	<b>90</b>
<b>22.</b>	<b>Fosforilación de oligonucleótidos</b>	<b>90</b>
<b>23.</b>	<b>Cuantificación de oligonucleótidos marcados radiactivamente</b>	<b>91</b>
<b>24.</b>	<b>Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)</b>	<b>91</b>
<b>25.</b>	<b>Anisotropía de fluorescencia</b>	<b>92</b>
<b>26.</b>	<b>Electroforesis de ADN en geles de Tris-Glicina</b>	<b>93</b>
<b>27.</b>	<b>Modelado <i>in silico</i> de los reguladores transcripcionales</b>	<b>94</b>
<b>28.</b>	<b>Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)</b>	<b>94</b>
<b>29.</b>	<b>Antibiograma. Halos de inhibición</b>	<b>95</b>
29.1	Técnica con espátula de Drigalsky	95
29.2	Técnica con LB-agar	95
<b>30.</b>	<b>Ensayo de formación de biopelícula en condición de crecimiento estático</b>	<b>96</b>
30.1	Formación de biopelícula	96
30.2	Tinción con cristal violeta	96



31. Ensayos de motilidad en placa	96
31.1 Motilidad tipo swarming	96
31.2 Motilidad tipo swimming	97
32. Placas de calcoflúor	97
33. Fenotipo Rdar. Placas de Rojo Congo	98
34. Herramientas bioinformáticas	98
<b>RESULTADOS</b>	<b>108</b>
<b>CAPÍTULO I. Co-evolución de selectividad sensor/operador en metalo-reguladores transcripcionales de la familia MerR</b>	<b>109</b>
1. El reconocimiento selectivo sensor/operador está dirigido por residuos de aminoácidos en la hélice- $\alpha$ 2 de la proteína sensora	110
2. Caracterización <i>in vitro</i> de la interacción de cada regulador transcripcional con fragmentos de los promotores de genes de los regulones <i>gol</i> y <i>cue</i>	113
3. Los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 16 y 19 del sensor determinan el reconocimiento de la secuencia blanco	116
4. Los residuos de las posiciones 16 y 19 del regulador reconocen las bases selectivas del operador 3' y 3	120
5. Diferencias en el dominio N-terminal de unión al ADN de los sensores ortólogos CueR <sub>STM</sub> y CueR <sub>EC</sub> afectan la inducción residual de los genes del regulón <i>gol</i>	122
<b>Discusión</b>	<b>130</b>
1. CueR y GolS: evolución selectiva	130
2. CueR <sub>STM</sub> y CueR <sub>EC</sub> : ¿imágenes especulares?	133
<b>CAPÍTULO II. STM1266: Un nuevo regulador MerR implicado en la regulación de la formación de biopelículas</b>	<b>137</b>
1. Análisis <i>in silico</i> del entorno génico de <i>STM1266</i>	138
1.1 Arquitectura génica de <i>STM1266</i>	143
1.2 Reguladores <i>STM1266</i> y <i>STM1265</i> : ¿cascada regulatoria?	144
2. Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta$ <i>STM1266</i> y de una mutante que expresa ectópicamente a <i>STM1266</i>	149

2.1	Altos niveles de STM1266 disminuyen la motilidad	149
2.2	La sobre-expresión de <i>STM1266</i> estimula la formación de biopelículas	150
2.3	La inducción de <i>STM1266</i> incrementa la producción y secreción de celulosa	152
2.4	Altos niveles de STM1266 confieren resistencia a estreptomicina	153
3.	STM1266 y su implicancia en la regulación de la formación de biopelículas	155
	<b>Discusión</b>	<b>158</b>
1.	<b>Análisis comparativo de la regulación transcripcional de <i>csgD</i> en <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i></b>	<b>159</b>
2.	<b>Proteínas con dominios GGDEF: regulación positiva de <i>csgD</i></b>	<b>164</b>
3.	<b>Proteínas con dominios EAL: regulación negativa de <i>csgD</i></b>	<b>166</b>
	<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>168</b>
	<b>RESUMEN</b>	<b>174</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>176</b>

*Abreviaturas*


---

A	Amperios
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHL	N-acyl-homoserin lactona
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNPol	ARN polimerasa
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3-indolfosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Cbl	Cobalamina
c-di-GMP	bis-(3';5')-guanosina monofosfato cíclico
C <sub>f</sub>	Concentración final
Ci	Curie
CIM	Concentración inhibitoria mínima
Cm	Cloramfenicol
C-terminal	Carboxilo-terminal
DGC	Diguanilato ciclasa
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>Escherichia coli</i>
EGTA	Ácido etilenglicol bis(β-aminoetil éter) N,N,N',N'-tetraacético
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
Estrep	Estreptomicina
Fw	Directo

g	Gramo
g/l	Gramos por litro
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HTH	Hélice-giro-hélice
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
$k_A$	Constante de equilibrio (asociación)
kb	Kilobase
$k_D$	Constante de equilibrio (disociación)
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
NB	Nutrient Broth
NBT	Azul de nitrotetrazolio
nt	Nucleótido
N-terminal	Amino-terminal
ONPG	O-nitrofenil-galactopiranosido
ORF	Marco de lectura abierto
p	Plásmido
P	Promotor
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDE	Fosfodiesterasa
(p)ppGpp	Guanosina pentafofato
p/v	Peso en volumen
$r$	Anisotropía de fluorescencia
R	Resistente
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto

Rv	Reverso
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SN	Sobrenadante
STM	<i>Salmonella</i> Typhimurium
Tc	Tetraciclina
U	Unidad
u. a.	Unidades arbitrarias
U. M.	Unidades Miller
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltios
V <sub>f</sub>	Volumen final
v/v	Volumen en volumen
wHTH	Hélice-giro-hélice alado
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido
α	Hélice-α
β	Lámina-β
Δ	Delección

# Introducción

## Introducción

---

### 1. El género *Salmonella*

La primera descripción de bacterias del género *Salmonella* se remonta a finales del siglo XIX, cuando Daniel Elmer Salmon y Theobald Smith aislaron *Salmonella Choleraesuis* en muestras tomadas en un cerdo con peste porcina clásica, creyendo que era el agente de esta enfermedad. Ya en 1900 el bacteriólogo francés Joseph Léon Marcel Lignières sugirió que estas bacterias se denominaran *Salmonella*, en honor a Salmon.

*Salmonella* es un género perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, compuesto de bacilos Gram negativos móviles, anaerobios facultativos (Scherer y Miller, 2003). Comprende a las especies *bongori* y *enterica* (Brenner y col., 2000), y esta última se divide a su vez en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *indica* (IV), y *houtenaue* (VI), también denominadas subespecies del grupo I, II, IIIa, IIIb, IV y VI, respectivamente (Porwollik y col., 2004). Las distintas subespecies, a su vez se pueden clasificar en serotipos o serovariedades considerando los perfiles de antigenicidad de cada una. Hasta el momento se han identificado más de 2400 serotipos dentro de la subespecie *enterica*, incluyendo a *S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Porwollik y col., 2004). Sólo algunos de estos serotipos son capaces de causar enfermedades en humanos y en animales domésticos. Cepas con serotipos pertenecientes a las demás subespecies fueron aislados fundamentalmente de animales de sangre fría y del ambiente, especialmente del acuático (Baudart y col., 2000).

Las infecciones causadas por *Salmonella* constituyen un problema importante en salud pública sobre todo en países en vías de desarrollo, donde su incidencia está en aumento, y en algunos casos es endémica (Velge y col., 2005). Mientras que *S. Typhi* y *S. Paratyphi* sólo afectan al hombre causando enfermedades severas como fiebre entérica, serotipos como *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium*, son de rango amplio de hospedador afectando a diversos tipos de animales, y comúnmente producen infecciones gastrointestinales menos severas en humanos (Velge y col., 2005). Desde inicios de la década de 1990 se han incrementado los aislamientos de serotipos multirresistentes a

antibióticos (Velge y col., 2005). Sobre esto radica la importancia del estudio minucioso de este patógeno a nivel molecular.

### 1.1 Ciclo infeccioso de *Salmonella* y supervivencia en el medio ambiente

Los dos síndromes clínicos más importantes causados por la infección con *Salmonella* son la fiebre tifoidea y la gastroenteritis (Scherer y Miller, 2003). Existe además el síndrome conocido como fiebre paratifoidea, que tiene ciertas similitudes con la fiebre tifoidea, pero con un curso más benigno (Scherer y Miller, 2003). Esta última enfermedad está habitualmente ocasionada por los serotipos Paratyphi, mientras que la fiebre tifoidea habitualmente es provocada por cepas de *S. Typhi*. En ambos casos la bacteria es ingerida a través del agua o de los alimentos y es transportada por el tracto gastrointestinal al lumen del intestino delgado. *Salmonella* penetra la mucosa intestinal a través de células epiteliales especializadas que están asociadas a los folículos linfoides denominados placas de Peyer, y posteriormente es internalizada por macrófagos. En el caso de la fiebre tifoidea, la bacteria se disemina a través del sistema linfático e induce una respuesta inflamatoria crónica. Los serotipos no tifoideos, en general, quedan contenidos en las placas de Peyer, induciendo una respuesta inflamatoria aguda (Scherer y Miller, 2003).

A diferencia de otras bacterias patógenas, *Salmonella* tiene la capacidad de persistir y proliferar en el medio ambiente, aún frente a variaciones en la temperatura, osmolaridad, pH y disponibilidad de nutrientes, desarrollando un estilo de vida cíclico hospedador-ambiente-hospedador (Winfield y Groisman, 2003). Si bien el paradigma actual indica que el hospedador animal es el hábitat primario de esta bacteria entérica, la misma es frecuentemente aislada de diferentes fuentes acuosas que sirven como reservorio bacteriano y pueden facilitar la transmisión entre hospedadores (Winfield y Groisman, 2003). Además puede estar ampliamente diseminada en suelos y sedimentos (Thomason y col., 1977). Las partículas de suelo funcionan como nichos microecológicos en las cuales las bacterias pueden sobrevivir y replicarse. Se ha observado que *Salmonella* posee una amplia capacidad de adhesión que le permite establecerse en la superficie de partículas sólidas, de donde obtiene nutrientes, se replica y protege de la acción de protozoos predadores (Paul y col., 1995; Baudart y col., 2000).



Si se la compara con *E. coli*, uno de los géneros más cercanos (McClelland y col., 2001), *Salmonella* puede soportar una mayor variedad de condiciones asociadas a fluctuaciones ambientales y puede persistir en ambientes acuosos por más tiempo (Winfield y Groisman, 2003). Esta capacidad adaptativa sugiere que esta bacteria cuenta con un repertorio de genes que le permiten adaptar su metabolismo a las diversas condiciones a las que se enfrenta. De hecho, *Salmonella* posee un número importante de genes que están ausentes en otras especies entéricas relacionadas, y que no serían requeridos para la virulencia (McClelland y col., 2001; Winfield y Groisman, 2003), y es posible que los mismos estén involucrados en su supervivencia fuera del hospedador. Entre los nichos de donde suele aislarse esta bacteria se distinguen los ambientes ricos en metales pesados (Olukoya y col., 1997). Aunque los metales se encuentran principalmente secuestrados como depósitos de minerales, con la industrialización, grandes cantidades de éstos fueron extraídos, liberados y dispersados sobre la superficie terrestre, proceso que está aumentando exponencialmente. Sumado a esto y a diferencia de la mayoría de los contaminantes orgánicos, los metales pesados son persistentes y por lo tanto se acumulan en el medio ambiente (Han y col., 2002). En los últimos años se ha observado un gran incremento en la resistencia microbiana a metales, en la que se involucran tanto el desarrollo o la adquisición de mecanismos de resistencia por medio de transferencia horizontal de genes (Roane y Perkins, 2000).

## 2. El género *Escherichia*

El género *Escherichia* contiene seis especies pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* (*E. coli*), *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* y *E. coli inactiva* (Pumarola, 1994). Son bacilos Gram negativos móviles, anaerobios facultativos y con flagelación perimetral (Joklik y col., 1989). *E. coli* se encuentra en bajo número como flora normal en el intestino grueso de humanos junto a otros anaerobios facultativos ( $10^7$  UFC/g de contenido intestinal), siendo los anaerobios obligados los predominantes en este nicho ( $10^{10}$ - $10^{11}$  UFC/g de contenido intestinal). Es una de las primeras especies en colonizar el intestino del recién nacido pero a los pocos días es reemplazada por lactobacilos y anaerobios estrictos (Joklik y col., 1989). También es flora normal de la vagina (antes de la pubertad y luego de la menopausia), de la uretra anterior, y de la próstata (Joklik y col., 1989).

Bajo circunstancias de inmunodepresión o de alteración de la flora normal, puede actuar como patógeno oportunista, siendo una de las causas más frecuente de sepsis por Gram negativos, y pudiendo causar meningitis neonatal, infección de heridas (principalmente abdominales), peritonitis, neumonías intrahospitalarias e infecciones urinarias (Pumarola, 1994).

Además existen cepas altamente virulentas, asociadas con enfermedades específicas. Estas cepas están caracterizadas por determinados antígenos de superficie, que permiten su diferenciación serológica. Entre estas se destaca *E. coli* enteropatógena (ECEP), principal agente causal de diarrea en niños y viajeros a países en vías de desarrollo; *E. coli* enterotoxigénica (ECET), que excreta una toxina similar a la de *Vibrio cholerae*, se adhiere a la mucosa del intestino delgado, y elabora toxinas que producen diarrea intensa en niños y adultos; *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), que invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos, y en algunos casos casual de artritis y arterioesclerosis; y *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica (ECEH), que produce la verotoxina (o “toxina de Shiga”) que causa colitis hemorrágica, y de no ser tratada a tiempo, puede producir daño renal conocido como síndrome urémico hemolítico (SUH), potencialmente mortal en niños de hasta 5 años.

### 3. *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* como modelos de estudio

*Salmonella* y *Escherichia coli* se han establecido como paradigmas de estudio de las bacterias Gram negativas. Dentro del género *Salmonella*, el serovar Typhimurium posee crecimiento rápido, falta de requerimientos nutricionales exigentes, y gran versatilidad para la modificación genética, habilitando el uso de técnicas tales como conjugación, recombinación, transducción y transformación. Es un excelente modelo para el estudio de los procesos de invasión a células eucariotas y de supervivencia extra e intracelular (Groisman y Saier, Jr., 1990). Su genoma se encuentra secuenciado y se conoce la organización de sus genes (McClelland y col., 2001). Sin embargo, se desconoce la función de más de un cuarto de sus genes, y se cree que una gran parte de ellos participan en facilitar la supervivencia fuera del hospedador (Winfield y Groisman, 2003).

Por su parte, *E. coli* ha sido el bacilo entérico más utilizado en el laboratorio, siendo objeto de más investigación experimental que cualquier otro microorganismo, especialmente en el campo de la biología molecular (Joklik y col., 1989).

#### 4. Reguladores transcripcionales

Las bacterias responden a cambios ambientales por medio de una variedad de sistemas sensores que transmiten la señal o estímulo a los correspondientes dominios de unión al ADN para modular, en consecuencia, la transcripción de genes cuyos productos son necesarios para la respuesta o adaptación al cambio (Alon, 2007; Pérez y Groisman, 2009; van Hijum y col., 2009). En general, a excepción de los sistemas de dos componentes en los cuales la transducción de la señal depende de una unidad de reconocimiento y otra de modulación transcripcional, en los mecanismos de transducción de señales procariotas el sensor y el dominio de unión al ADN están generalmente presentes en una misma molécula proteica, un regulador transcripcional (Ulrich y col., 2005). Cuando se produce el cambio ambiental, el regulador transcripcional detecta una señal ambiental difusible, un cambio fisicoquímico o un metabolito endógeno producido o modificado en respuesta a la nueva condición, y transmite esa información desde su dominio sensor a su dominio de unión al ADN, el cual asume una conformación activa que le permite regular, positiva o negativamente, la transcripción de sus genes blanco (van Hijum y col., 2009).

##### 4.1 Familia MerR de reguladores transcripcionales

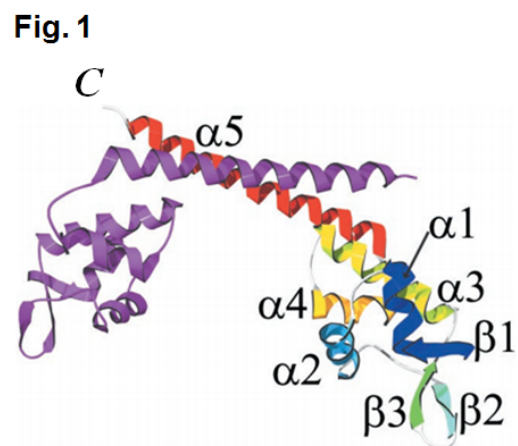
La familia MerR comprende un grupo de reguladores transcripcionales bacterianos capaces de monitorear y responder específicamente a una variedad de estímulos ambientales, tales como metales pesados (mercurio, cobre, oro, cobalto, cadmio, zinc, entre otros), estrés oxidativo, antibióticos, toxinas lipofílicas, colorantes, estrés térmico, y participan de otras funciones como por ejemplo nodulación y modulación de la síntesis de adhesinas, tal como la fimbria tipo curli (Brocklehurst y col., 1999; Rutherford y col., 1999; Outten y col., 2000; Borremans y col., 2001; Stoyanov y col., 2001; Lee y col., 2001; Reeve y col., 2002; Brown y col., 2003; Changela y col., 2003). El primer regulador de esta familia en ser caracterizado fue

MerR de *Pseudomonas aeruginosa*, que controla la expresión de un sistema de detoxificación de mercurio (Stanisich y col., 1977). Este regulador actúa en función de la concentración de metal, controlando negativamente su propia expresión y positivamente la del operón *merTPAD* que participa en la captación y reducción del  $Hg^{2+}$  a  $Hg^0$  (Lund y col., 1986; Lund y Brown, 1989).

#### 4.2 Estructura de reguladores de la familia MerR

Si bien los reguladores pertenecientes a esta familia presentan bajos niveles de homología en su secuencia primaria, están muy relacionados estructuralmente (Brown y col., 2003). Están compuestos básicamente por tres dominios, que incluyen una región N-terminal muy conservada de unión al ADN, caracterizada por un dominio hélice-giro-hélice con topología  $\beta 1 - \alpha 1 - \alpha 2 - \beta 2 - \beta 3 - \alpha 3 - \alpha 4$ , un dominio de dimerización con estructura de hélice enrollada también muy conservada ( $\alpha 5$ ), y una región C-terminal de unión al efector específico muy variable, tanto en estructura como en tamaño (**Fig. 1**). Estos últimos dos dominios están implicados en el reconocimiento y transducción de la señal.

Estudios iniciales en MerR, y luego confirmados por análisis estructurales en los homólogos BmrR y MtaN de *Bacillus subtilis* (siendo la última una mutante truncada del regulador del tipo MerR Mta), TipAL de *Streptomyces lividans* y SoxR de *Escherichia coli*, permitieron definir que la interacción de los reguladores del tipo MerR con sus promotores blanco involucra tanto cambios en la estructura de la proteína como en la conformación del ADN, característica inusual en otros reguladores transcripcionales (O'Halloran y col., 1989; Blocklehurst y col., 1999; Godsey y col., 2001; Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Godsey y col., 2002; Changela y col., 2003; Newberry y Brennan, 2004; Watanabe y col., 2008).



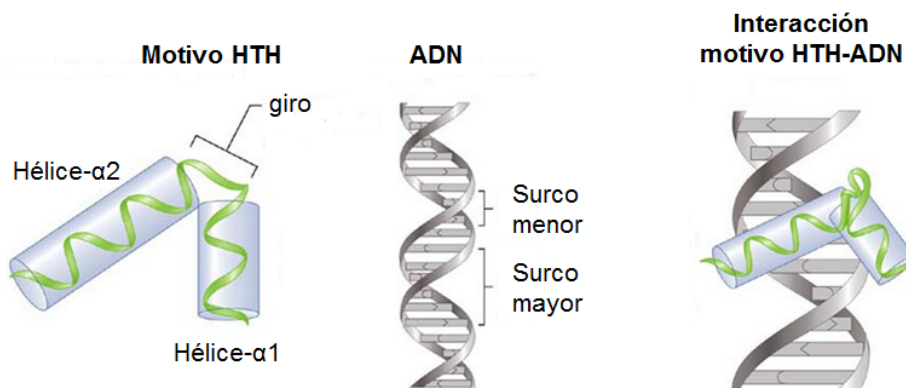
**Fig. 1: Esquema conformacional de un regulador MerR.** En la figura se esquematiza la estructura dimérica de un regulador transcripcional MerR típico. Una sub-unidad está coloreada de azul (dominio N-terminal) a blanco (dominio C-terminal). El otro monómero se muestra en violeta. Se detallan los elementos de estructura secundaria: hebra  $\beta 1$ , hélices  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en azul (HTH1), hebras  $\beta 2$  y  $\beta 3$  en verde (giro), hélices  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$  en amarillo (HTH2), hélice  $\alpha 5$  (dominio de dimerización) en rojo y extremo C-terminal en blanco. Las 2 hélices  $\alpha 5$  del dímero constituyen una hélice enrollada antiparalela en la región de dimerización (Adaptado de Godsey y col., 2001).

#### 4.2.1 Dominio HTH: un denominador común en reguladores transcripcionales

El dominio hélice-giro-hélice, del inglés “helix-turn-helix” (HTH), uno de los dominios de unión a ADN doble hebra más estudiados, es una de las unidades estructurales claves de la maquinaria transcripcional de organismos procariotas y eucariotas. De hecho, es un motivo de unión al ADN común tanto en represores como en activadores, siendo posiblemente la estructura más antigua conservada entre reguladores transcripcionales (Aravind y col., 2005). El reclutamiento de dominios HTH para funciones biológicas distintas de la regulación transcripcional es también relevante. Proteínas involucradas en funciones como reparación del ADN y metabolismo del ARN explotan las propiedades del dominio HTH de la misma manera que lo hacen los reguladores transcripcionales (Moore y col., 1994; Wah y col., 1997; Selmer y Su, 2002; Alfano y col., 2004; Dong y col., 2004). Se han reportado también casos en los cuales el dominio HTH ha sido adaptado a funciones tales como la mediación en interacciones específicas proteína-proteína, o como unidades estructurales de dominios catalíticos de diversas enzimas (Guo y col., 1997; Wong y col., 2000; Zheng y col., 2002).

El motivo HTH clásico consiste de dos hélices, empaquetadas con un ángulo de aproximadamente  $120^\circ$ , unidas por un giro de cuatro residuos de aminoácidos en el cual la glicina generalmente se encuentra en la segunda posición (**Fig. 2**) (Huffman y Brennan, 2002; Religa y col., 2007). El motivo HTH en sí es aparentemente insuficiente para plegarse de manera independiente y requiere de una tercera hélice que establezca el motivo como un dominio globular compacto (Wintjens y Rooman, 1996). La segunda hélice en el motivo HTH se conoce con el nombre de “hélice de reconocimiento”, ya que se inserta en el surco mayor de la doble hélice del ADN y es crítica para la especificidad en dicha interacción (**Fig. 2**) (Huffman y Brennan, 2002; Aravind y col., 2005).

Fig. 2



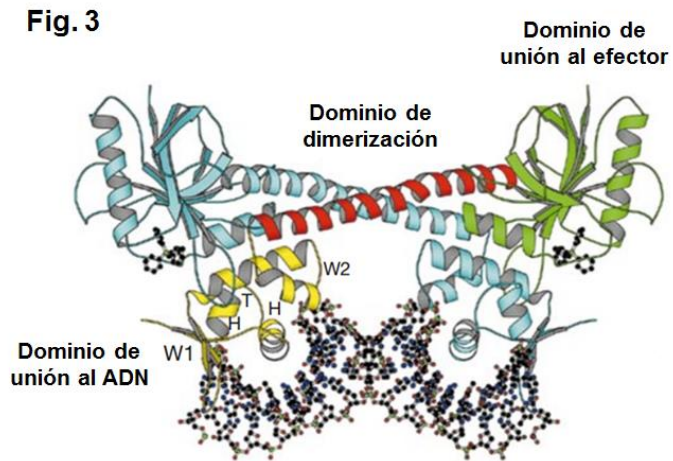
**Fig. 2: Dominio HTH, una estructura clave en regulación transcripcional.** Representación esquemática del motivo HTH básico y de la disposición geométrica de su interacción con los surcos mayor y menor de la doble hélice.

Una de las variantes de esta estructura es la conocida con el nombre de dominio hélice-giro-hélice alado, del inglés “winged HTH” (wHTH), que se distingue de la conformación clásica por la presencia de dos giros  $\beta$  (“alas”) que se disponen de manera adyacente al motivo HTH (Brennan, 1993; Clark y col., 1993; Gajiwala y Burley, 2000; Huffman y Brennan, 2002; Aravind y col., 2005). Las versiones más simples de dominios wHTH presentan un núcleo tri-helicoidal compacto seguido de un giro constituido por una lámina- $\beta$  de dos hebras, con topología  $\alpha 1 - \beta 1 - \alpha 2 - T - \alpha 3 - \beta 2 - W1 - \beta 3 - W2$ , donde  $\alpha$  representa una hélice,  $\beta$  una lámina, T un giro (del inglés “turn”) y W un ala.  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y la secuencia entre ellas constituyen el motivo HTH, donde  $\alpha 3$  es la hélice de reconocimiento (Gajiwala y Burley, 2000). En el caso de reguladores transcripcionales con dominio wHTH, la lámina- $\beta$  provee una interfase adicional para la interacción con el sustrato, generalmente mediante la interacción con el surco menor del ADN a través de residuos cargados del ala (Brennan, 1993; Clark y col., 1993).

En el caso particular de los reguladores transcripcionales de la familia MerR, el dominio N-terminal de unión al ADN se caracteriza por presentar una topología  $\beta 1 - \alpha 1 - \alpha 2 - \beta 2 - \beta 3 - \alpha 3 - \alpha 4$  (sección 4.2 – **Fig. 1**). La conservación de un núcleo de residuos hidrofóbicos entre diferentes miembros de la familia MerR indica que el dominio N-terminal adopta, en todos los casos, un plegamiento similar. A partir de las estructuras cristalinas de los complejos BmrR (**Fig. 3**), MtaN y SoxR unidos a sus respectivas secuencias operadoras, se observó que el dominio de unión al ADN se organiza en tres

motivos mediante los cuales ocurre la interacción con el promotor (Godsey y col., 2001; Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Newberry y Brennan, 2004; Watanabe y col., 2008):

- un motivo hélice-giro-hélice (HTH) formado por las hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y el giro que las conecta,
- un motivo W1 (ala 1) que comprende las hebras  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , unidas por un giro, y
- un motivo W2 (ala 2) que, a diferencia de otros dominios wHTH en los cuales la segunda ala consiste en un giro, éste es otro tipo de dominio HTH compuesto por las hélices  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  y el giro que las une.



**Fig. 3: Estructura cristalina del complejo BmrR-droga-ADN.** Representación esquemática del regulador BmrR unido como dímero a su secuencia operadora blanca. Para uno de los monómeros se indican el dominio N-terminal de unión al ADN (amarillo), el dominio de dimerización (rojo) y el dominio C-terminal de unión al efector específico (verde). El otro monómero se muestra en celeste. El ADN y el ligando (TPP) están representados como varillas y esferas. (Adaptado de Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001).

El primer motivo HTH interactúa con dos surcos mayores consecutivos del ADN, de manera tal que cada eje helicoidal queda dispuesto de manera casi perpendicular al eje local del ADN. Aunque la hélice- $\alpha_1$  contribuye con enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals, la mayoría de los contactos proteína-ADN son ejercidos por residuos de la hélice- $\alpha_2$ . La mayoría de las interacciones establecidas entre los distintos motivos y el ADN son enlaces puente de hidrógeno e interacciones de Van der Waals entre cadenas laterales de aminoácidos y grupos fosfato o anillos de desoxirribosa del ADN. A pesar del gran número de contactos entre BmrR y su promotor, el ADN permanece accesible para unir la ARN polimerasa (ARNPol).

La estructura del complejo no reveló la existencia de contactos base-específicos. Además se observó que la mayoría de los aminoácidos que establecieron contactos con el esqueleto del ADN no están conservados en la familia MerR, por lo que se postula que BmrR podría alcanzar el reconocimiento por medio de una lectura indirecta o bien podría ocurrir que sólo la forma apo del regulador contacte de manera secuencia-específica con el promotor y la unión del co-activador (ligando) generase una interfase

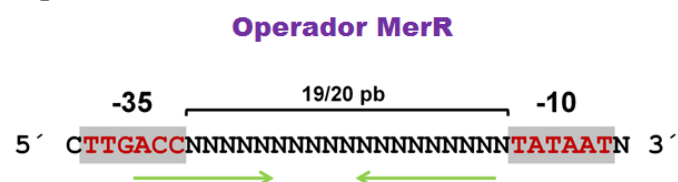
proteína-ADN caracterizada por la inexistencia de contactos base-específicos (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001). Cabe destacar, sin embargo, que estudios recientes en nuestro laboratorio (Pérez Audero y col., 2010; Humbert y col., 2013 – *Capítulo I*) demuestran que en el caso particular de los reguladores CueR y GolS el reconocimiento selectivo de operador se da por medio de contactos entre determinadas bases de selectividad y residuos de aminoácidos específicos en el dominio N-terminal de unión al ADN de la proteína sensora.

### 4.3 Reguladores MerR y su interacción con el ADN

#### 4.3.1 Reguladores MerR típicos: Paradigma clásico de regulación transcripcional

Los reguladores tipo MerR actúan como homodímeros sobre promotores que son blancos de la subunidad  $\sigma^{70}$  de la ARNPol en bacterias Gram-negativas, y de  $\sigma^A/\sigma^{54}$  en Gram-positivas (Newberry y Brennan, 2004). A su vez, los operadores

**Fig. 4**



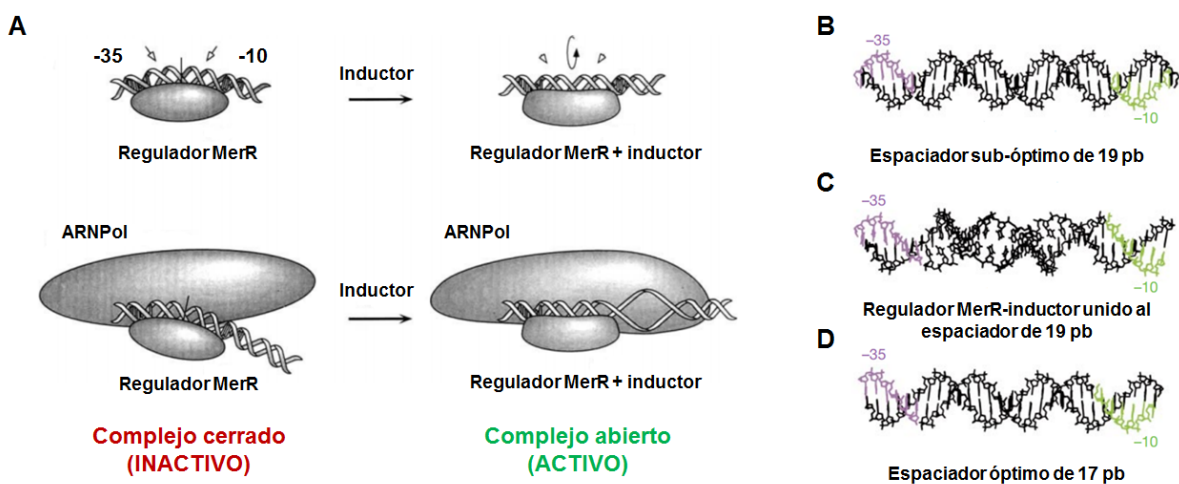
**Fig. 4: Arquitectura general de operadores MerR.** Los elementos promotores -35 y -10 se muestran resaltados en rojo y enmarcados en gris. Las flechas verdes muestran la posición aproximada de las repeticiones invertidas (diada), donde se une el regulador MerR. Se indica, además, el espaciamiento sub-óptimo de 19 pb o 20 pb entre las cajas promotoras.

reconocidos por esta clase de reguladores presentan como característica particular (**Fig. 4 y 7-A**), su disposición como repeticiones invertidas (o secuencias diadas) localizadas entre los elementos -35 y -10, que a su vez muestran un espaciamiento sub-óptimo de 19 o 20 pb, siendo el óptimo de  $17 \pm 1$  pb en los promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  (Lund y Brown, 1989; O'Halloran y col., 1989; Park y col., 1992; Brocklehurst y col., 1999). Un espaciamiento de 19 pb o 20 pb ubica a los elementos -35 y -10 sobre caras opuestas de la doble hélice, afectando la interacción simultánea de la ARNPol con ambos elementos del promotor, aunque no la impide (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001). A diferencia de la mayoría de los factores transcripcionales bacterianos caracterizados hasta el momento, el regulador, en su forma dimérica, permanece unido al promotor, aún en ausencia del inductor. En este caso, el regulador se une a la región promotora y secuestra la ARNPol en un complejo cerrado. Simultáneamente, la unión del dímero curva el ADN, lo que lleva a que la sub-unidad  $\alpha$  de la polimerasa pueda interaccionar con el elemento -35 pero no con el -10, impidiendo así el inicio de la transcripción



(Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001). La interacción del regulador con su co-activador no afecta significativamente la afinidad del mismo por el ADN. En cambio, provoca una alteración conformacional que se transmite intramolecularmente al dominio de unión del ADN y se traduce finalmente en la relajación de la curvatura y el desenrollamiento del ADN en la secuencia operadora, resultando en el realineamiento de las cajas -35 y -10, la formación del complejo abierto por la ARNPol, y el consiguiente inicio de la transcripción (**Fig. 5**) (Ansari y col., 1992, Outten y col., 1999; Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Newberry y Brennan, 2004).

**Fig. 5**



**Fig. 5: Mecanismo de activación-represión mediado por un regulador transcripcional de la familia MerR.** **A.** Apo-MerR se une en forma dimérica a su secuencia operadora blanco, torsionándola hacia sí y evitando, en consecuencia, el inicio de la transcripción. En ausencia de inductor, la ARNPol es capaz de interactuar sólo con el elemento -35, formando un complejo cerrado transcripcionalmente inactivo. La unión del inductor al regulador induce un cambio conformacional en el mismo, lo que permite la relajación de la curvatura y desenrollamiento del ADN. Este cambio estructural del operador favorece el alineamiento y acercamiento de las cajas -35 y -10, quedando las mismas espaciadas a una distancia similar a la de un operador clásico de 17 pb. Esta condición permite la interacción simultánea de la ARNPol con ambos elementos promotores y la consiguiente formación del complejo abierto (activo). **B** y **D.** Posición relativa de las cajas -35 y -10 en promotores que poseen 19 (**B**) o 17 (**D**) pares de bases entre ellas, respectivamente. **C.** Modificación estructural sufrida por la secuencia operadora como resultado de la unión del regulador MerR unido al inductor. La posición final que adquieren las cajas -35 y -10 se asemeja a la observada para un promotor con 17 pb de separación entre las mismas (**D**). (Adaptado de Ansari y col., 1995; Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001).

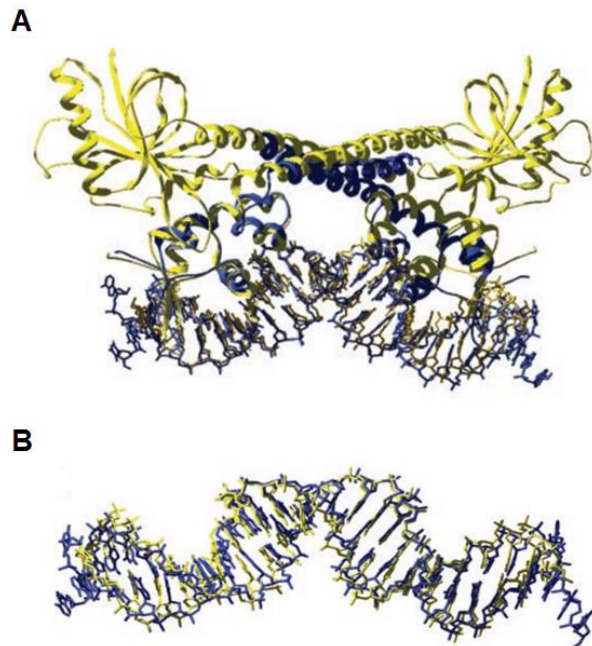
El desenrollamiento del ADN tiene origen en el debilitamiento de los enlaces de hidrógeno del par de bases A-T que generalmente se encuentra en el centro de la diada simétrica del operador, permitiendo una distorsión en el centro del mismo. Este desplazamiento de bases estaría estabilizado por la interacción entre residuos de la proteína y el esqueleto fosfato del ADN. Dado que la identidad del par de bases central de la secuencia palindrómica se encuentra conservada como adenina o timina en la mayoría de los promotores MerR y sumado a que no afectan la afinidad del regulador

por el ADN, se propone que éste es un mecanismo común a otros miembros de la familia. Además, la resolución estructural de los complejos de los reguladores de unión a drogas BmrR y Mta, y del regulador de respuesta a estrés oxidativo SoxR, cada uno unido a su correspondiente secuencia operadora, revela que la estructura de los promotores y los contactos proteína-ADN son casi idénticos en cada

complejo, con residuos en posiciones equivalentes haciendo contactos similares (**Fig. 6**) (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Newberry y Brennan, 2004; Watanabe y col., 2008). BmrR y MtaN, al igual que otros reguladores MerR cuyos mecanismos regulatorios han sido caracterizados, se unen como homodímeros a una diada simétrica de manera tal que el dominio N-terminal de cada monómero interactúa con una de las mitades de la diada, provocando una distorsión en el centro de la misma (**Fig. 6-A**) (Newberry y Brennan, 2004). Ensayos de footprinting con DNasa I de reguladores MerR muestran bandas

hipersensibles que evidencian la distorsión del operador en la región interna a los sitios de unión de los monómeros al ADN (Outten y col., 2000). Estas observaciones indican que el mecanismo estructural de reconocimiento del ADN y activación transcripcional inicialmente predicho para MerR por estudios funcionales, genéticos y bioquímicos (O'Halloran y col., 1989; Frantz y O'Halloran, 1990; Parkhill y col., 1993), y posteriormente demostrado para BmrR mediante estudios cristalográficos (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001), constituye el paradigma de regulación para reguladores del tipo MerR (**Fig. 7-A**).

**Fig. 6**



**Fig. 6: Conservación del mecanismo estructural para la activación transcripcional mediada por reguladores MerR. A.** Superposición de las estructuras cristalográficas de los complejos MtaN-ADN (azul) y BmrR-inductor-ADN (amarillo). **B.** Superposición de las estructuras promotoras MtaN-*mta* (azul) y BmrR-*bmr* (amarillo). El alineamiento destaca las conformaciones casi idénticas en la región promotora distorsionada por la unión del regulador a la misma. (Adaptado de Newberry y Brennan, 2004).

### 4.3.2 Reguladores MerR no convencionales

Estudios recientes en miembros más divergentes de esta familia, como CarA, LitR, MlrA, BluR y HspR\_2, muestran mecanismos de interacción con el ADN diferentes al modelo de acción hasta hoy unificado mencionado en el apartado anterior. En este subgrupo de reguladores recientemente caracterizados, el regulador podría actuar o como activador o como represor de sus genes blanco. El modelo de acción incluiría, además, la participación de otras proteínas reguladoras que competirían por la interacción del regulador tipo MerR por el ADN, o impedirían su interacción con la secuencia operadora, uniéndose directamente al dominio de unión al ADN por medio de una interacción proteína-proteína, y desplazando así al regulador MerR de su sitio blanco. Además, un análisis comparativo de las secuencias operadoras blanco reconocidas por reguladores MerR atípicos (**Fig. 7-B**) revela diferencias significativas con aquellas reconocidas como operadores característicos de esta familia, invalidando la posibilidad de establecer reglas generales que describan un mecanismo estructural y funcional común entre todos los reguladores transcripcionales MerR.

**Fig. 7**

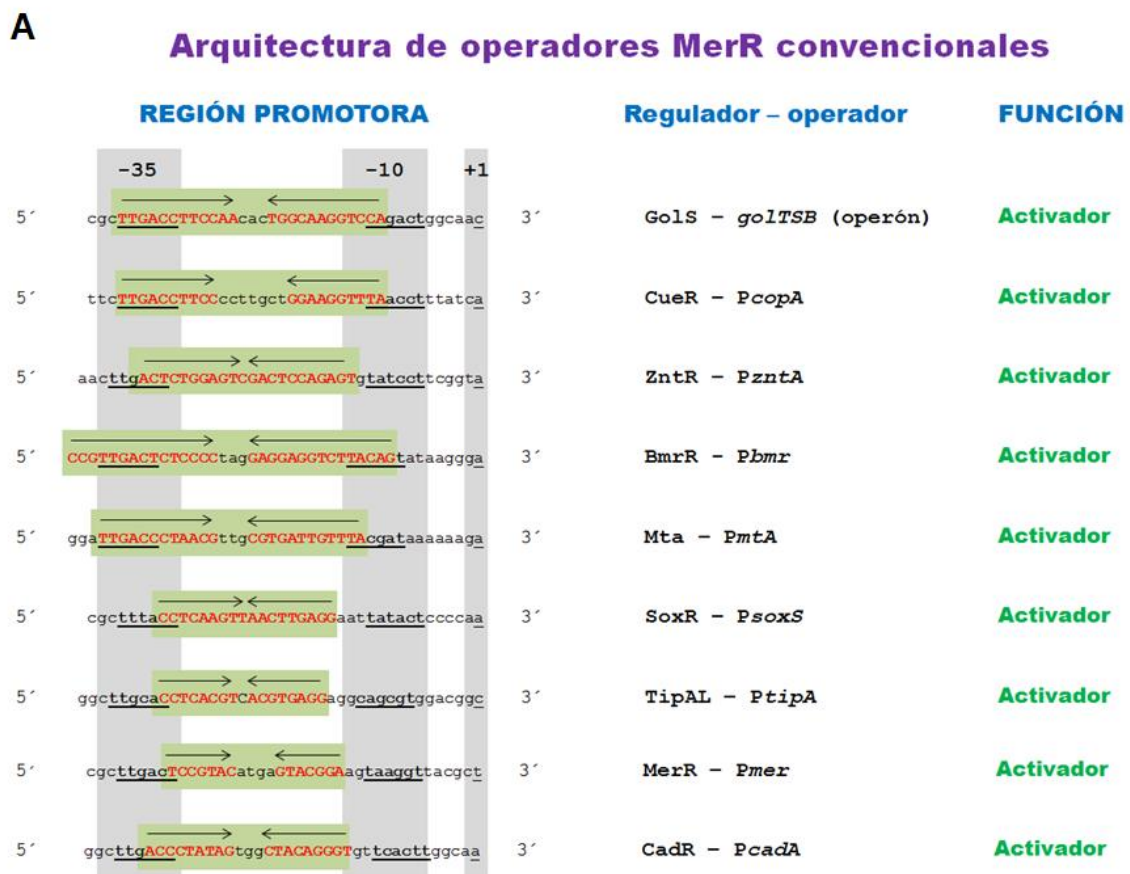
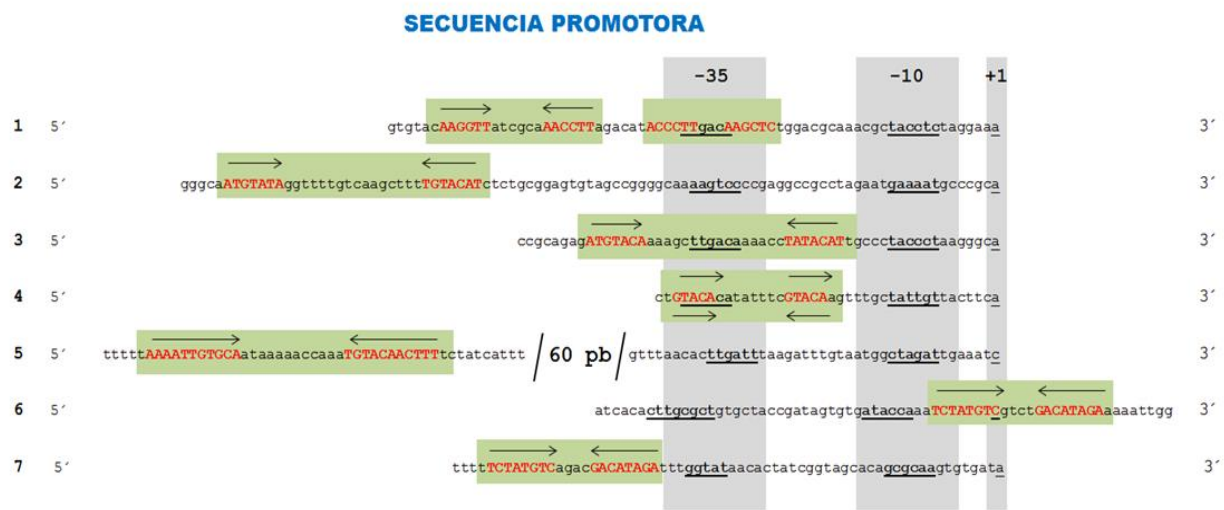


Fig. 7

B

**Arquitectura de operadores MerR atípicos**



**Regulador – operador**

**FUNCIÓN**

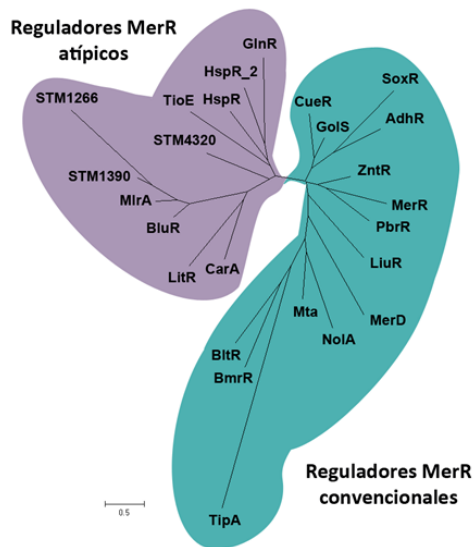
1	<i>CarA/CarH - carB</i> (operón)	<b>Represor</b>
2	<i>LitR - PcrfB</i>	<b>Represor</b>
3	<i>LitR - PlitR</i>	<b>Represor</b>
4	<i>BluR - PycgZ</i>	<b>Represor</b>
5	<i>MlrA - csgD</i> (operón)	<b>Activador</b>
6	<i>HspR_2 - Phsp18</i>	<b>Represor</b>
7	<i>HspR_2 - PhspR-2</i>	<b>Activador</b>

**Fig. 7: Arquitectura de operadores MerR.** Alineamiento de las secuencias promotoras reconocidas por reguladores MerR convencionales (A) y atípicos (B). Se destacan las cajas -35 y -10, y el sitio de inicio de la transcripción +1 (recuadro gris). Las flechas corresponden a las repeticiones invertidas (rojo) a las cuales se une el regulador (recuadro verde). A. Todos los operadores blanco de reguladores MerR convencionales conservan la posición de la diada entre los elementos promotores -35 y -10. Esta arquitectura explica el mecanismo estructural de reconocimiento del ADN y activación transcripcional postulado para metalo-reguladores y otros miembros de la familia MerR. B. Los operadores MerR atípicos muestran un corrimiento de la secuencia diada respecto de las cajas promotoras, quedando ésta ubicada de manera superpuesta a la caja -35 o corriente arriba de la misma. Estas características estructurales podrían explicar porqué la mayoría de los reguladores MerR atípicos actúan como represores, invalidando el paradigma de regulación transcripcional postulado para los reguladores de esta familia.

En el caso particular de los operadores reconocidos por reguladores MerR no convencionales, la diada simétrica se ubica desplazada respecto de las cajas -35 y -10, generalmente superpuesta a la caja -35, o corriente arriba de la misma (Fig. 7-B). Esta característica estructural, inusual en la mayoría de los operadores MerR (Fig. 7-A), indica que el modelo mecánico de regulación, generalmente represión, sería diferente al planteado para los reguladores del tipo MerR convencionales o típicos. En los reguladores no convencionales no dependería de la reconfiguración conformacional del operador y del reposicionamiento de las cajas -35 y -10 mediados por el regulador, sugiriendo dos modelos de regulación diferentes dentro de esta familia de reguladores

filogenéticamente emparentados y estructuralmente análogos, sobre todo a nivel del dominio N-terminal de unión al ADN (**Fig. 8**).

**Fig. 8**



**Fig. 8: Diversidad filogenética en reguladores MerR: excepciones al paradigma de regulación transcripcional.** Árbol filogenético obtenido por comparación de las secuencias aminoacídicas completas de reguladores transcripcionales de la familia MerR. En verde se agrupan los reguladores que responden al mecanismo clásico de regulación transcripcional (convencionales) y en violeta se destacan aquellos que difieren en su mecanismo de acción (atípicos). El árbol fue contruido como se describe en la **sección 34** de *Materiales y Métodos*. El nombre de las especies, el número de acceso al GenBank y las secuencias proteicas para cada regulador se detallan en la **Tabla 4** (*Materiales y Métodos*).

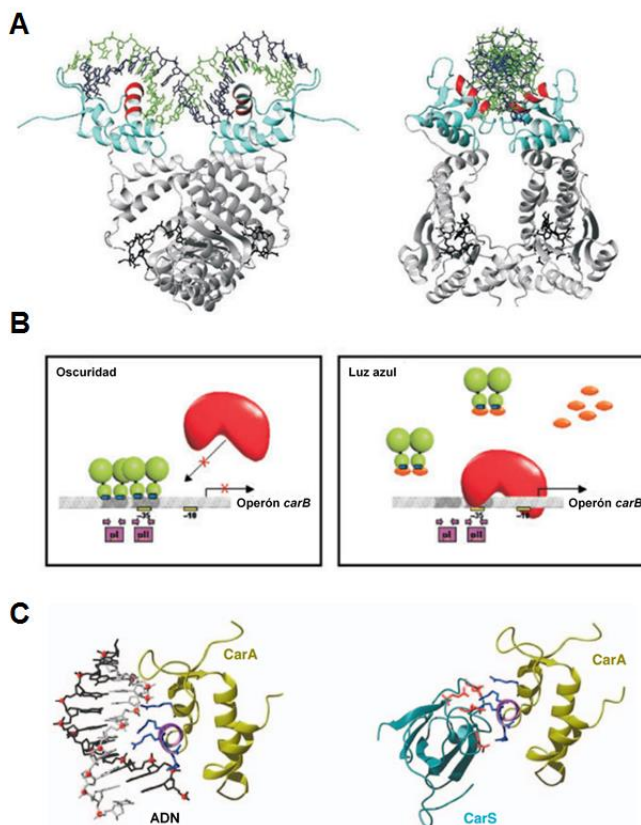
#### 4.3.2.1 Reguladores CarA/CarS

Dentro del grupo de reguladores transcripcionales MerR atípicos se distinguen los reguladores tipo CarA/LitR, que presentan en su dominio C-terminal un motivo de unión a cobalamina (vitamina B12). Están involucrados en la regulación transcripcional modulada por luz en una amplia variedad de bacterias no fototróficas (Actinobacterias y bacterias Gram-negativas tales como *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio*). La inhibición del estrés fotooxidativo por medio de la producción de carotenoides, pigmentos amarillos, naranjas o rojos que protegen a la célula del daño provocado por radicales libres del oxígeno, es una característica fisiológica fotodependiente muy caracterizada en muchas bacterias no fototróficas. Un grupo importante de especies bacterianas acumulan esta clase de pigmentos cuando son iluminadas. Esto sugiere la conservación evolutiva de un cierto sistema regulatorio que traduce una señal lumínica en la expresión de genes necesarios para la biosíntesis de carotenoides. Los detalles de dichos sistemas regulatorios aún se desconocen.

El mecanismo de producción de carotenoides inducido por luz más caracterizado es el de *Myxococcus xanthus*. La compleja red de señalización de este organismo involucra a múltiples reguladores, incluyendo dos reguladores transcripcionales CarA y CarH, de la familia MerR (Ortiz-Guerrero y col., 2011). El sitio de unión de CarA en la región promotora de su gen blanco *carB* ( $P_B$ ) presenta un dominio bipartito atípico (**Fig. 7-B**), constituido por un sitio de unión de alta afinidad (pI) que abarca una secuencia diada perfecta corriente arriba de la caja -35 del promotor, y un segundo sitio de unión de baja afinidad (pII), con una secuencia pseudopalindrómica que se superpone con la región -35 de  $P_B$  (Navarro-Avilés y col., 2007). CarA se une de manera cooperativa primero al sitio pI y luego al sitio pII, inhibiendo el acceso de la ARNPol y reprimiendo, en consecuencia, la expresión de *carB* (Navarro-Avilés y col., 2007).

En reguladores como MtaN, BmrR, ZntR y CueR, la hélice- $\alpha 5$  media la dimerización y la correcta disposición de los dominios N-terminal en la unión del ADN (Newberry y Brennan, 2004). A pesar de que la predicción de estructura secundaria muestra ausencia de dicha hélice en CarA (Navarro-Avilés y col., 2007), este regulador dimeriza por medio de su dominio C-terminal (López-Rubio y col., 2002; Pérez-Marín y col., 2004). Y de manera análoga al mecanismo de unión específico de ligandos a los dominios C-terminales de reguladores MerR, como por ejemplo metales o drogas, CarA conserva un sitio de unión a cobalamina en el mismo dominio proteico. Si bien la unión de este cofactor a CarA fue demostrado empíricamente (Pérez-Marín y col., 2004), el rol fisiológico sobre la funcionalidad de CarA se desconoce. A diferencia del mecanismo descrito para muchos reguladores de la familia MerR, en donde la presencia del inductor estimula un cambio conformacional del regulador provocando la activación de los genes bajo su control transcripcional, CarA reprime la activación de *carB*, cuya activación requiere de la disrupción del complejo CarA-operador mediante la unión competitiva del anti-represor CarS a la hélice- $\alpha 2$  de CarA (**Fig. 9**).

Fig. 9



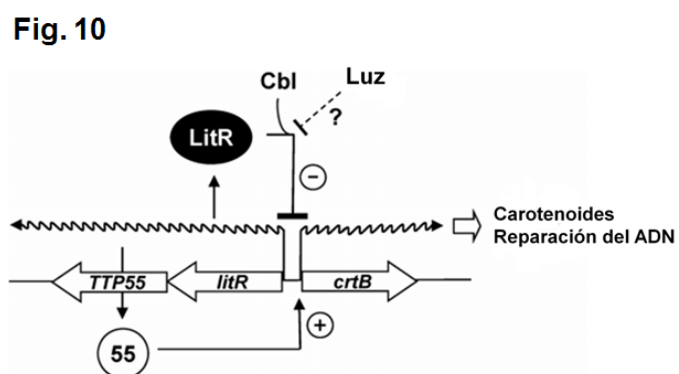
**Fig. 9: A. Modelo estructural del complejo CarA-operador.** Representación gráfica del dominio N-terminal (celeste) y C-terminal (gris) de CarA, unido al ligando vitamina B12 (negro). En rojo se destaca la hélice- $\alpha 2$ , interaccionando con el surco mayor de la doble hélice (verde y negro) en el complejo CarA-operador. Los diagramas corresponden a una vista perpendicular (izquierda) y paralela (derecha) al eje del ADN. **B. Mecanismo de represión y antirrepresión del operón *carB*.** En oscuridad, CarA dimérica (verde) se une a su secuencia operadora blanco bipartita (pI-pII) (violeta) por medio de su dominio N-terminal, a nivel de la hélice- $\alpha 2$  (celeste), impidiendo el acceso de la ARNPol (rojo) y reprimiendo, en consecuencia, la transcripción de *carB*. En condición de luz azul, la unión de CarS (naranja) a la hélice- $\alpha 2$  de CarA disgrega el complejo CarA-operador, permitiendo que la ARNPol inicie la transcripción del operón *carB*. **C. Similitud estructural entre los complejos CarA-operador y CarA-CarS.** La comparación esquemática de la unión del dominio N-terminal de CarA con uno de los hemi-sitios del operador blanco (izquierda) o con CarS (derecha) demuestra de qué manera el antirrepressor imita a la secuencia operadora en el secuestro de la hélice- $\alpha 2$  (violeta) del represor. En el diagrama se indican las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos cargados en la interfase de los complejos proteína-ADN o proteína-proteína (azul para básicos y rojo para ácidos). Las esferas rojas corresponden a los grupos fosfato del ADN. (Adaptado de Navarro-Avilés y col., 2007 y de Elías-Arnanz y col., 2011).

Los mecanismos de antirrepresión por medio de la unión de antirrepresores a represores más caracterizados consisten o en modificaciones conformacionales, o en el estado de oligomerización del represor (Lewis y col., 1998; Masuda y Bauer, 2002), o en la agregación intracelular, o en la relocalización del represor (Davis y col., 2002), o en la degradación del mismo (Luo y col., 2001). El mecanismo de antirrepresión CarA/CarS constituye un mecanismo diferente a los anteriormente descritos, ya que la unión de CarS a CarA bloquea el acceso de la hélice- $\alpha 2$  del regulador al sitio blanco en el ADN (Navarro-Avilés y col., 2007). CarS es un antirrepressor con un dominio del tipo SH3 que simula la secuencia operadora (Fig. 9-C). CarS se expresa en presencia de luz y es capaz de unirse específicamente a la hélice- $\alpha 2$  en el dominio de unión al ADN no sólo de CarA, sino también del represor parálogo CarH que se une a la misma región operadora reconocida por CarA. CarA y CarH no sólo son estructuralmente homólogos y reconocen el mismo promotor, sino que además conservan un motivo de unión a cobalamina similar en sus dominios C-terminales. Sin embargo, sólo CarH requiere de este cofactor para su actividad represora. La unión de vitamina B12 al dominio sensor de CarH estimula la oligomerización e incrementa la afinidad de unión del mismo a la

secuencia operadora, favoreciendo en consecuencia la represión de sus genes blancos (Ortiz-Guerrero y col., 2011). La luz, en un amplio rango de longitudes de onda a las cuales absorbe la cobalamina, disgrega el complejo oligomérico represor mediante la fotólisis del cofactor unido a CarH, debilitando la unión de este represor al sitio operador y activando en consecuencia la transcripción de los genes bajo su control. En contraste, la cobalamina no altera ni el estado de oligomerización ni la afinidad de unión de CarA a la misma región promotora. Por lo tanto, la fotosensibilidad intrínseca de la vitamina B12 unida a CarH sirve como un segundo interruptor de encendido y apagado que acopla la regulación de la expresión génica en respuesta a cambios en la señal lumínica en un amplio rango de longitudes de onda. Esto provee una vía fotosensorial de regulación por luz azul para la carotenogénesis en *Myxococcuss xanthus* independiente de CarS (Ortiz-Guerrero y col., 2011).

#### 4.3.2.2 Reguladores LitR

En *Thermus thermophilus*, la regulación transcripcional del grupo de genes implicado en la biosíntesis de carotenos (*crt*) está modulada por dos reguladores transcripcionales codificados en tándem bajo el control de un mismo promotor (*PlitR*): LitR (*light-induced transcription regulator*) y TTP55. LitR, homólogo a CarA, también pertenece al subgrupo de reguladores MerR atípicos y presenta un sitio de unión a cobalamina en su dominio sensor C-terminal (Takano y col., 2011). LitR reprime su propio promotor *PlitR* y el promotor del operón divergente *PcrtB* por medio de su unión a un sitio único localizado entre estos dos elementos promotores adyacentes. Su desrepresión por luz (posiblemente por inestabilidad en la unión de cobalamina y consecuente disociación del ADN) permite la



**Fig. 10**

**Fig. 10: Modelo para la regulación transcripcional modulada por luz en la región intergénica entre *litR* y *crtB* de *T. thermophilus*.** LitR se une a un sitio único entre los promotores divergentes *PlitR* y *PcrtB*, situado de manera superpuesta a la caja -35 de *PlitR*, regulando negativamente la actividad del mismo. Su desrepresión por medio de un mecanismo aún desconocido activa *PcrtB* vía TTP55. *PcrtB* dirige la transcripción de genes codificantes para enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y reparación del ADN. La luz posiblemente induzca la actividad de *PcrtB* provocando inestabilidad en la unión de cobalamina (Cbl) y consecuente disociación de LitR de su secuencia operadora (Adaptado de Takano y col., 2011).



producción de TTP55, también codificado bajo el control del promotor *PlitR*. TTP55 activa luego la expresión de *PcrtB*, induciendo en consecuencia la biosíntesis de carotenoides y enzimas fotoliasas de reparación del ADN (**Fig. 10**) (Takano y col., 2011). Si bien LitR clasifica dentro de la familia MerR por la estructura de su dominio de unión al ADN, difiere de esta clase de reguladores en lo que respecta a la geometría del promotor al cual se une (**Fig. 7-B**). La región *PlitR* a la cual se une LitR exhibe una geometría normal (17 pb entre las cajas -35 y -10), sugiriendo que el mecanismo de acción y/o la función de LitR difiere de aquella de la mayoría de los reguladores de la familia MerR (Takano y col., 2011). LitR de *Vibrio salmonicida*, por ejemplo, es un regulador implicado en la regulación de densidad poblacional, conocida comúnmente como *quorum sensing*, y su función es reprimir adhesión, agregación y la habilidad de formar biopelículas, en tanto que activa la expresión del operón *lux* y en consecuencia la bioluminiscencia (Mohn Bjelland y col., 2012).

#### 4.3.2.3 Reguladores MlrA

Además de los reguladores tipo CarA/LitR, que contienen un motivo de unión a cobalamina en su región C-terminal, existen también otros reguladores MerR funcionalmente diferentes a la mayoría de los reguladores de esta familia (metaloreguladores). Entre estos se destacan los reguladores tipo MlrA, que incluyen a BluR de *Escherichia coli* y a los reguladores STM1390 y STM1266 de *Salmonella enterica* (este último, objeto de análisis en este trabajo de Tesis Doctoral – *Capítulo II*). MlrA presenta un alto grado de homología a reguladores transcripcionales de la familia MerR, principalmente su extremo N-terminal (Brown y col., 2001). De allí la denominación MlrA (*merR-like regulator A*). El dominio N-terminal de esta proteína presenta un motivo de unión al ADN de hélice-giro-hélice. De los 70 residuos de aminoácidos de este dominio, 17 son idénticos o similares a los 22 residuos conservados en diferentes reguladores MerR provenientes de distintos organismos (Summers, 1992). Sin embargo, el dominio C-terminal de unión al efector de MlrA tiene homología significativa sólo con tres reguladores putativos de función desconocida: BluR (también conocido como YcgE) de *E. coli* K-12, ORF242 de *S. enterica* y VCA0056 de *V. cholerae*, con una similitud proteica del 76 %, 70 % y 50 %, respectivamente (**Fig. 11**). MlrA fue identificada como un regulador positivo para la síntesis de fimbria tipo curli y matriz

Fig. 11

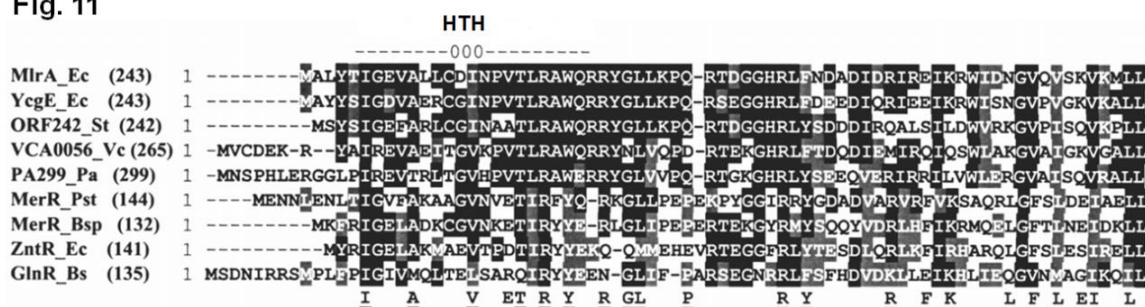


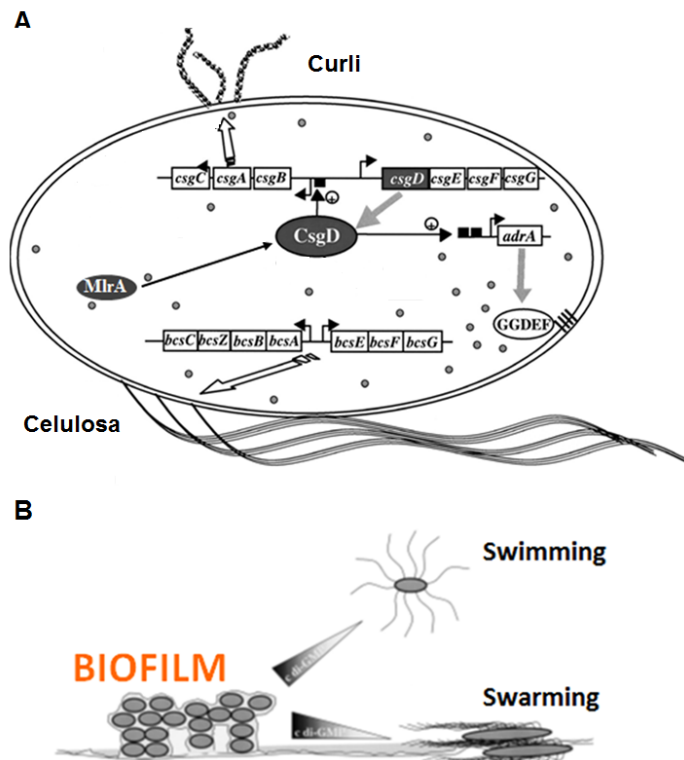
Fig. 11: Alineamiento de los dominios N-terminal de unión al ADN de MlrA de *E. coli* y de las proteínas con mayor grado de homología en la familia MerR. Los residuos de aminoácidos conservados idénticos se resaltan en negro y los similares, en gris. La longitud completa de las proteínas se indica entre paréntesis. El dominio HTH conservado, implicado en la interacción del regulador con el ADN, se indica sobre el alineamiento. Debajo del mismo, se detallan los 22 residuos de aminoácidos conservados en la mayoría de los reguladores MerR (Summers, 1992). De estos, los subrayados corresponden a los que son idénticos o similares en MlrA. (Ec) *E. coli*; (St) *S. typhimurium*; (Vc) *Vibrio cholerae*; (Pa) *Pseudomonas aeruginosa*; (Pst) *Pseudomonas stutzeri*; (Bsp) *Bacillus sp.*; (Bs) *Bacillus subtilis* (Adaptado de Brown y col., 2001).

extracelular en *E. coli* y *S. Typhimurium* (Fig. 12) (Brown y col., 2001). Su única función conocida hasta el momento es la de activar la transcripción del regulador maestro de producción de curli y celulosa CsgD, también denominado AgfD. El sensor CsgD pertenece a la familia de reguladores LuxR y es el principal regulador de respuesta para la formación de biopelículas. En *E. coli* y *S. Typhimurium*, CsgD es el activador principal de los genes responsables de la biosíntesis de curli (*csg*), codificados en los operones divergentes *csgBAC* y *csgDEFG* (Ogasawara y col., 2010). CsgA y CsgB son los componentes estructurales de las fimbrias tipo curli (Hammar y col., 1995), y aunque *csgC* es parte del operón *csgBAC*, su función se desconoce. El operón *csgDEFG* codifica para el regulador y para proteínas accesorias en la biosíntesis del curli. CsgE y CsgF son proteínas periplásmicas que interactúan con CsgG, una lipoproteína de membrana externa (Loferer y col., 1997). Estas proteínas son requeridas para la correcta secreción y ensamblado de las sub-unidades estructurales CsgA y CsgB. Si bien CsgD es necesario para la activación transcripcional del operón *csgBAC* (Römbling y col., 2000; Brown y col., 2001; Gerstel y col., 2003; Weber y col., 2006), no ha sido aún demostrado que regule directamente la expresión del operón *csgDEFG* y, en consecuencia, que module su propia expresión (Barnhart y Chapman, 2006).

El efecto de MlrA en la producción de curli y celulosa es únicamente atribuible a su capacidad de activar *PcsgD*. CsgD es el responsable de activar luego la transcripción del operón divergente *csgBA(C)*, que codifica para los genes estructurales implicados en la formación de curli (Ogasawara y col., 2010). A su vez CsgD estimula de manera

indirecta la biosíntesis de celulosa mediante la activación transcripcional de *AdrA*. Esta proteína presenta actividad diguanilato ciclasa, por lo que es capaz de estimular la producción de bis-(3',5')-guanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP), una molécula señal bacteriana ubicua. Este metabolito actúa luego como mensajero secundario crucial para la biosíntesis de celulosa y, probablemente de otros exopolisacáridos (**Fig. 12-A**).

**Fig. 12**



**Fig. 12: Modulación de la producción de curli y celulosa: alternancia entre la forma de vida planctónica y la formación de biofilm.** A. MlrA tiene como única función conocida activar la transcripción del regulador maestro de producción de curli y celulosa, CsgD. El sensor CsgD pertenece a la familia de reguladores LuxR y es el principal regulador de respuesta en la formación de biofilm. En *E. coli* y *Salmonella*, el gen *csgD* es parte integral del operón de biosíntesis de curli *csgDEFG*. CsgD se une al promotor y activa la transcripción del operón divergente *csgBA(C)*, que codifica para los genes estructurales implicados en la formación de curli. Por otro lado, CsgD estimula, de manera indirecta, la biosíntesis de celulosa mediante la activación transcripcional de *AdrA*. Esta proteína presenta actividad diguanilato ciclasa, por lo que es capaz de estimular la producción de c-di-GMP. Este metabolito actúa luego como mensajero secundario crucial para la biosíntesis de celulosa y, probablemente, de otros exopolisacáridos. B. En *Salmonella*, la regulación de c-di-GMP es considerada clave en la toma de decisión entre la forma de vida libre y la formación de biofilm. La expresión de *AdrA* y el consecuente incremento en los niveles de c-di-GMP, reprimen la movilidad (swimming y swarming), estimulando la producción de moléculas constituyentes de la matriz extracelular (exopolisacáridos, fimbria y flagelo) y favoreciendo, de esta manera, la formación de biofilm. (Adaptado de Römling, 2005).

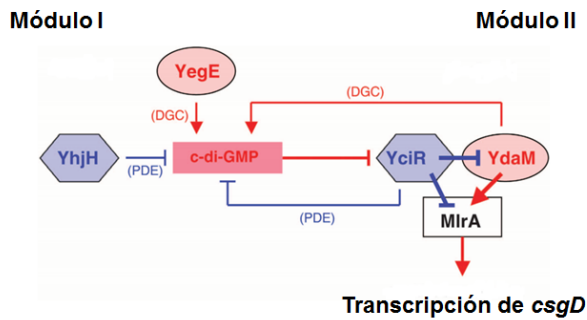
La regulación de CsgD es considerada clave en la toma de decisión entre la forma de vida planctónica y la formación de biopelículas. MlrA no es el único factor involucrado en la regulación transcripcional de *csgD* sino que existen otros reguladores que modulan la expresión de *csgD* en muy distintas condiciones inductoras: durante la fase de crecimiento estacionaria por la escasez de nutrientes, en microaerobiosis, en aerobiosis en medio mínimo, a pH alcalino (pH 8.5), baja osmolaridad y por temperatura (28 °C). Es por ello que el promotor de *csgD* es reconocido como uno de los promotores más complejos de *E. coli* (Gerstel y col., 2003; Ogasawara y col., 2010; Ogasawara y col., 2011).

La secuencia de unión de MlrA en la región promotora de *csgD* (**Fig. 7-B**) consta de una repetición invertida de 11 pb con un intervalo de 12 pb (MlrA-box), y está

ubicada entre los sitios de unión de otros dos factores positivos, IHF y OmpR, denominados *hot spot I* y *hot spot II*, respectivamente (Ogasawara y col., 2010). Un análisis del efecto activador de MlrA sobre el promotor de *csgD* en distintas mutantes de *E. coli*, cada una deficiente en uno de los reguladores involucrados en la regulación de *csgD*, demostró que MlrA actúa de manera independiente de los reguladores Crl, H-NS, RstA, CpxR y RcsB, pero interactúa de manera directa con los reguladores IHF y OmpR que, como se mencionó anteriormente, se unen en sitios adyacentes al identificado para MlrA en el promotor de *csgD* (Ogasawara y col., 2010). Como resultado de la búsqueda *in silico* de otros genes controlados por MlrA, se identificaron otras cuatro cajas MlrA putativas conservadas en las regiones promotoras de *rpiU* (proteína ribosomal L21), *dppB* (transportador de dipéptido), *yrbA* y *cadC* (factores transcripcionales putativos). Todas muestran interacción *in vitro* con MlrA mediante ensayos de EMSA e inducen la expresión del gen reportero *lacZ* en ensayos *in vivo* (Ogasawara y col., 2010). Estos genes, por lo tanto, podrían estar siendo también regulados por MlrA. Cabe destacar, además, que dos de estos cuatro genes blancos putativos codifican para reguladores transcripcionales, por lo que posiblemente MlrA estaría formando parte de una cascada regulatoria.

El dominio sensor de MlrA conserva 3 residuos de cisteínas. Se desconoce sin embargo la naturaleza del ligando y si dichas cisteínas están o no involucradas en la unión específica del mismo. Poco se sabe de la o las señales que modulan la expresión y la activación de MlrA, aunque resultados recientes sugieren que al menos en *Escherichia coli* estaría vinculada a los niveles de c-di-GMP. Además de interactuar con los reguladores IHF y OmpR, MlrA formaría un complejo con la fosfodiesterasa YciR (con dominios GGDEF/EAL) y con la diguanilato ciclasa YdaM (con dominio GGDEF) para la regulación del promotor de *csgD* (**Fig. 13**) (Lindenberg y col., 2013). Este tipo de regulación establece un precedente para la cooperación entre un regulador del tipo MerR y una proteína con dominio EAL en el inicio de la transcripción (Weber y col., 2006; Tschowri y col., 2009; Lindenberg y col., 2013).

Fig. 13



**Fig. 13: Modelo de la regulación transcripcional de *csgD* mediada por una cascada de señalización dependiente de c-di-GMP.** El módulo I (constituido por la diguanilato ciclasa (DGC) YegE y la fosfodiesterasa (PDE) YhjH) controla el nivel de c-di-GMP que es sentido y degradado por la PDE YciR, la que junto a la DGC YdaM, constituyen el módulo II. La segunda actividad de la enzima YciR (inhibición directa de YdaM y MirA) es reprimida cuando la misma se encuentra activa como PDE. La enzima YdaM también es bifuncional. Mientras que su actividad DGC contribuye al reservorio de c-di-GMP generado por el módulo I, también estimula la activación de MirA por interacción directa. Las enzimas con actividad DGC se indican con óvalos y aquellas con actividad PDE, con hexágonos. Los procesos dependientes de la actividad DGC y de altos niveles de c-di-GMP se muestran en rojo, y aquellos vinculados a la actividad PDE y a bajos niveles de c-di-GMP, en azul. (Adaptado de Lindenberg y col., 2013).

Las proteínas con dominios GGDEF y EAL se caracterizan, en su mayoría, por presentar actividad diguanilato ciclasa (DGC) (Ausmees y col., 2001; Chan y col., 2004; Paul y col., 2004; Hickman y col., 2005; Ryjenkov y col., 2005) y fosfodiesterasa (PDE) (Christen y col., 2005; Schmidt y col., 2005; Ryan y col., 2006), respectivamente. Están implicadas en la modulación del reservorio intracelular de c-di-GMP. El c-di-GMP es un mensajero secundario clave para la transición entre los estilos de vida planctónico y multicelular, que en general interfiere con el proceso de motilidad y promueve la formación de biopelículas (**Fig. 12-B**) (Römling y Amikan, 2006). En bacterias patógenas, el c-di-GMP también regula genes implicados en virulencia (Tamayo y col., 2007). Muchas especies bacterianas poseen un gran número de proteínas con dominios GGDEF/EAL, pudiendo presentar dichos dominios de manera individual o combinados en un mismo polipéptido. Sin embargo, en una determinada fracción de estas proteínas los dominios GGDEF y/o EAL, así como también otros residuos de aminoácidos relevantes para la función enzimática, no están conservados. Estas proteínas carecen de actividad DGC o PDE, pero requieren de sus dominios catalíticos GGDEF y/o EAL para llevar a cabo otras funciones. Entre las 29 proteínas con dominios GGDEF/EAL en *E. coli*, se destaca BluF (también denominada YcgF), la cual no sólo presenta un dominio EAL degenerado sino también un dominio sensor de luz azul en su extremo N-terminal, dependiente de FAD. BluF carece de actividad PDE pero requiere de su dominio EAL para actuar como antagonista directo del represor transcripcional BluR (o YcgE). Inducido por luz azul BluF libera al represor BluR de sus operadores blanco, resultando en la expresión de un set de pequeñas proteínas regulatorias que, por medio del sistema de fosfotransferencia de RcsC/RscD/RcsB, afectan positivamente la producción de ácido colánico (un componente de la matriz

extracelular del biofilm), y negativamente la síntesis de curli (fimbria adhesiva). La expresión de BluF y BluR, así como también la de sus genes blanco, es fuertemente inducida a bajas temperaturas (Tschowri y col., 2009).

#### 4.3.2.4 Reguladores BluR

BluR es un regulador transcripcional del tipo MerR con un alto grado de homología con MlrA (**Fig. 11**). El grado de conservación de secuencia entre BluR y MlrA (igual longitud y 49 % de identidad), sumado al hecho de que ambas interactúan de manera directa con proteínas con dominios EAL, sugiere que estos dos reguladores provienen de un ancestro común. De hecho, BluR conserva una cierta afinidad residual por el promotor de *csgD*. Además, un espaciamiento sub-óptimo de 18 pb entre las cajas -35 y -10 en la región promotora del gen *ycgZ*, regulado por BluR (Tschowri y col., 2012), es consistente con las características de los operadores comúnmente controlados por reguladores MerR (Brown y col., 2003). Si bien se postula que ambos reguladores provienen de un mismo gen ancestral, posiblemente como resultado de un evento de duplicación génica, cabe destacar que la interacción de MlrA con la fosfodiesterasa YciR inhibe la activación de *csgD* (**Fig. 13**) mientras que en el caso de BluR, la interacción con BluF por medio del sitio EAL degenerado, inhibe la unión del represor a la secuencia operadora de sus genes blanco, activando la transcripción de los mismos.

Un caso funcionalmente similar en el que un anti-represor compite con la secuencia operadora por la unión del regulador MerR es el anteriormente mencionado CarA/CarS de *Myxococcus xanthus* (sección 4.3.2.1) (Navarro-Avilés y col., 2007; León y col., 2010; Elías-Arnanz y col., 2011), aunque CarS no está estructuralmente relacionado a BluF ni a las proteínas con dominios EAL. Los reguladores MlrA/BluR y sus homólogos constituyen, por lo tanto, otro ejemplo de reguladores MerR que modulan la expresión de sus genes blanco por interacción con proteínas moduladoras.

#### 4.3.2.5 Reguladores Hsp\_2

Otro regulador MerR funcionalmente diferente es el denominado Hsp\_2 de *Mycobacterium* (Pidot y col., 2010). Hsp\_2 actúa como represor de Hsp18, una proteína

antigénica que promueve la formación de biopelículas, codificada corriente abajo y en orientación divergente al marco de lectura abierto para Hsp\_2 (Pidot y col., 2010). Una diada simétrica fue identificada en la región intergénica entre Hsp\_2 y Hsp18, corriente abajo de la caja -10 de Hsp18, superpuesta al sitio de inicio de la transcripción del mismo (**Fig. 7-B**). Esta observación fortalece el modelo en el cual Hsp\_2 reconoce la diada y, de manera simultánea, promueve su propia transcripción y bloquea la expresión de Hsp18 (Pidot y col., 2010). La geometría de la región intergénica Hsp\_2/Hsp18 implica un cambio en el modo de acción clásico postulado para la mayoría de los reguladores MerR en el cual el regulador activa la transcripción de su gen blanco sólo en presencia de la señal inductora, en tanto que reprime (o activa) su propia expresión (Brown y col., 2003). Hsp\_2 constituye, por lo tanto, otro ejemplo de regulador transcripcional que no ajusta al modelo de acción propuesto para la mayoría de los reguladores de la familia MerR. En este caso, no se han reportado evidencias de interacción de Hsp\_2 con otras proteínas moduladoras en la región promotora de Hsp18 sino que se postula un modelo de acción en el que la represión transcripcional de Hsp18 es consecuencia del impedimento estérico que provoca el regulador al unirse a su propia región operadora, superpuesta y en orientación inversa a la de su gen blanco (**Fig. 7-B**).

## 5. Metales: esenciales, no esenciales y tóxicos

### 5.1 Clasificación de metales

Además de los principales elementos químicos tales como C, H, O, N, P y S, utilizados por las células para la constitución de las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y azúcares, los organismos vivos contienen aniones y cationes inorgánicos. La totalidad de metales requeridos metabólicamente por las bacterias constituyen lo que se denomina el metaloma bacteriano (Outten y O'Halloran, 2001; Barton y col., 2007). Los principales cationes son iones metálicos entre los cuales se incluyen los macronutrientes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (Hobman, 2007). Los metales de transición V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo y W también son esenciales para la vida aunque en cantidades menores (micronutrientes), siendo adquiridos principalmente como iones inorgánicos a partir del entorno. A diferencia de los alcalinos y alcalino-térreos estos metales no están como iones libres en el interior celular sino que se encuentran unidos a sitios específicos en proteínas, ácidos nucleicos, etc (Barton y col., 2007). Cumplen diversas funciones

celulares que incluyen roles estructurales, catalíticos y como cofactores enzimáticos (Outten y col., 2000). También actúan como estabilizadores de proteínas o ácidos nucleicos (Ansari y col., 2004). Al, Au, Ag, Bi, Cd, Cr, Hg, Pb, Sn y Tl no poseen funciones biológicas conocidas y son llamados comúnmente, aunque a veces erróneamente, “metales pesados” o, más apropiadamente, “metales tóxicos” (Hobman, 2007). Además, cationes como Be, Cs, Li y Sr pueden ser tóxicos para las bacterias, aunque hasta el momento se sabe muy poco acerca de sus interacciones biológicas.

Si bien los metales juegan un rol esencial en la nutrición microbiana, también pueden generar estrés celular. Esto puede ocurrir por niveles tanto insuficientes como excesivos de estos iones metálicos esenciales o por la presencia de iones metálicos tóxicos (Nies, 1999; Valko y col., 2005). El mecanismo de toxicidad para la mayoría de los metales no está totalmente comprendido. Los cationes de estos metales tienen una fuerte tendencia a interactuar con los grupos sulfhidrilos de las proteínas inhibiendo su función biológica o bien desplazando a un metal esencial de su sitio de unión a una determinada proteína (Hathaway y col., 1987; Wulfsberg, 1991). Además, algunos metales resultan tóxicos porque pueden interactuar con compuestos fisiológicamente relevantes, inhibiendo su función. También, y dependiendo de sus propiedades redox, algunos metales pueden generar especies reactivas del oxígeno, provocando daños en el ADN, peroxidación de lípidos, depleción de grupos sulfhidrilos de proteínas y glutatión, entre otros efectos (Valko y col., 2005). La base de la toxicidad de algunos metales es esencialmente una función de su química bioinorgánica y es siempre el ión metálico, no el metal por sí mismo, el que es tóxico. La toxicidad también depende de factores ambientales que afectan la biodisponibilidad de los iones metálicos, la habilidad de los mismos de ingresar a la célula, de interactuar con distintos ligandos dentro de la misma y la capacidad de participar en reacciones perjudiciales para la célula (Hobman, 2007).

## **5.2 Estrategias de homeostasis/resistencia a metales de transición**

Las bacterias han desarrollado sistemas de captación, transporte y eflujo de metales, que les permiten regular su concentración intracelular para cubrir las necesidades celulares básicas (homeostasis de metales) o inducir mecanismos de resistencia para mitigar sus efectos tóxicos en caso necesario (resistencia a metales)



(Pennella y Giedroc, 2005). El secuestro extracelular del metal, la prevención de la entrada del metal a la célula reduciendo su permeabilidad, el transporte activo del metal hacia el exterior celular, el secuestro intracelular del metal por unión a ligandos, la alteración enzimática del metal a una forma menos tóxica, y/o la reducción de la sensibilidad al metal en el blanco celular son las estrategias más conocidas de resistencia a metales tóxicos utilizadas por las bacterias (Bruins y col., 2000). Hasta el momento han sido descritos sistemas de homeostasis y resistencia bacteriana para  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{TeO}_3^{2-}$ ,  $\text{Tl}^+$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Silver y Phung, 2005), y, en nuestro laboratorio, describimos por primera vez la resistencia bacteriana a  $\text{Au}^+$  (Checa y col., 2007).

## 6. Homeostasis de cobre

El cobre está ampliamente distribuido en la naturaleza. Es un micronutriente esencial y, junto con el hierro y zinc, es uno de los metales de transición más utilizados por los seres vivos (Solioz y Stoyanov, 2003). Tiene más de un estado de valencia, encontrándose en las células tanto en forma de Cu(II) como de Cu(I), y sus funciones biológicas están relacionadas con sus propiedades redox (Rensing y Grass, 2003). Es el ácido de Lewis más fuerte dentro del grupo IB de los metales de transición y su potencial redox puede variar desde 200 a 800 mV, dependiendo del entorno proteico en el cual el ión se encuentra inmerso. El Cu, en sus dos estados de oxidación, es capaz de unirse con gran afinidad a biomoléculas, interaccionando preferentemente con los grupos tioles de las proteínas. Debido a sus propiedades redox, cumple funciones biológicas como transportador de electrones, aceptando y donando electrones usados por metaloproteínas como la citocromo *c* oxidasa y la superóxido dismutasa. También actúa como grupo prostético de enzimas involucradas en la reducción de nitrito y óxido nítrico y se encuentra en la estructura de transportadores electrónicos como las plastocianinas y azurinas (Solioz y Stoyanov, 2003).

En aerobiosis, la homeostasis de cobre es esencial ya que su actividad redox lo hace altamente tóxico, incluso a bajas concentraciones. En condiciones anaeróbicas, el cobre se encuentra como  $\text{Cu}^+$  que es más tóxico que el  $\text{Cu}^{2+}$ . Su toxicidad está relacionada, entre otras cosas, con la generación por una reacción tipo Fenton de radicales hidroxilos extremadamente reactivos que pueden dañar fosfolípidos, enzimas y

otros componentes celulares (Solioz y Stoyanov, 2003). A su vez, el  $\text{Cu}^{2+}$  puede oxidar grupos tioles tanto del glutatión como de diversas proteínas, llevando a una disminución del contenido de glutatión reducido intracelular y a la inactivación proteica (Solioz y Stoyanov, 2003), además de desplazar a otros cofactores metálicos de su sitio de unión, debido a su gran afinidad por los grupos tioles (Koutmos y Coucouvanis, 2006; Fung y col., 2013). En consecuencia, las concentraciones de cobre intracelular deben estar estrictamente reguladas, resultando esencial para las células mantener la homeostasis de este metal mediante de la expresión de sistemas de captación y eflujo del mismo (Fan y Rosen, 2002; Lu y Solioz, 2002; Franke y col., 2003).

### 6.1 Homeostasis de cobre en *E. coli*

Hasta el momento no se ha identificado un sistema de importación de Cu en *E. coli*, posiblemente reflejando la falta de un alto requerimiento de este metal en el citoplasma. Se especula que la entrada del  $\text{Cu}^{2+}$  al periplasma se realiza a través de porinas (Lutkenhaus, 1977; Osman y Cavet, 2008). Estimativamente, más del 96 % del cobre celular de *E. coli* se encuentra en este compartimiento, y de hecho, todas las enzimas que requieren cobre como cofactor en *E. coli* poseen una localización periplásmica. En este compartimiento, el Cu se encuentra unido a diferentes enzimas o transportadores de electrones como la citocromo *o* oxidasa, o la oxidasa multicobre CueO. El  $\text{Cu}^{2+}$  es luego reducido a  $\text{Cu}^+$  mediante oxidorreductasas, probablemente la NADH deshidrogenasa 2 (Rapisarda y col., 1999; Rapisarda y col., 2002). El  $\text{Cu}^+$  sería capaz de difundir rápidamente a través de la membrana plasmática, estableciendo un equilibrio pasivo entre el periplasma y el citoplasma. Una vez en el citoplasma, el metal sería rápidamente secuestrado, probablemente por el glutatión, para evitar sus efectos tóxicos (Freedman y col., 1989).

Con el fin de mantener los niveles de cobre al mínimo en el citoplasma y a un nivel óptimo en el periplasma, *E. coli* cuenta con sistemas que median el eflujo de este metal. La respuesta a niveles elevados de cobre involucra al regulón *cue* y al locus *cus*. El regulón *cue*, agrupa a los genes que codifican para el sistema primario de resistencia al exceso de Cu. Estos factores son inducidos cuando se altera el equilibrio homeostático del metal. El locus *cus* codifica para un sistema alternativo de resistencia

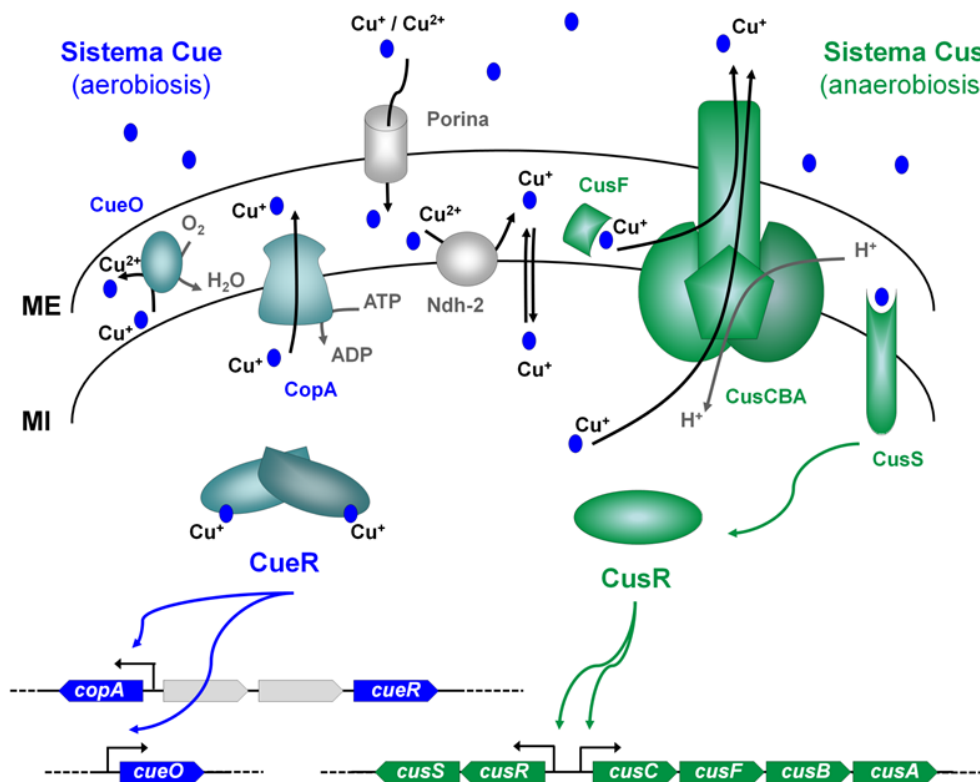
al metal que actúa bajo condiciones extremas de toxicidad (Outten y col., 2001; Yamamoto e Ishihama, 2005).

### 6.1.1 El regulón *cue*

El regulón *cue* (del inglés “*Cu* efflux”) está controlado por CueR, un regulador perteneciente a la familia MerR (Stoyanov y Brown, 2003). CueR responde a Cu con una sensibilidad del orden zeptomolar ( $10^{-21}$  M) (Changela y col., 2003). Esto equivaldría a  $1/10^{10}$  veces menos cobre que la concentración generada por un átomo libre del metal por célula. CueR controla la expresión de los genes *copA* y *cueO* (Outten y col., 2001). El gen *copA* codifica para una ATPasa del tipo P<sub>1B</sub> denominada CopA, que transporta Cu<sup>+</sup> utilizando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP (Petersen y Moller, 2000). El gen *cueO* codifica para la oxidasa multicobre CueO de localización periplásmica, responsable de la oxidación de Cu<sup>+</sup> a Cu<sup>2+</sup> en presencia de O<sub>2</sub> (Outten y col., 2000; Outten y col., 2001). Cuando la concentración de cobre intracelular aumenta, la ATPasa CopA expulsaría Cu<sup>+</sup> al periplasma, donde la oxidasa CueO lo oxidaría a Cu<sup>2+</sup>, menos tóxico para la célula (**Fig. 14**) (Outten y col., 2001; Rensing y col., 2003). CueR responde además a Ag<sup>+</sup> y Au<sup>+</sup>. Sin embargo, la respuesta a este último ha sido atribuida exclusivamente a las propiedades químicas del ión ya que se observó que CopA de *E. coli* es capaz de transportar tanto Cu<sup>+</sup> como Ag<sup>+</sup> pero no Au<sup>+</sup> (Outten y col., 2001; Rensing y Grass, 2003; Stoyanov y Brown, 2003).

En anaerobiosis, la oxidasa CueO se encuentra inactiva y los efectos tóxicos del cobre son mayores. En estas condiciones, el sistema *cue* es ineficiente y el sistema *cus* se vuelve esencial para la supervivencia de la bacteria en concentraciones elevadas de Cu<sup>+</sup> (Outten y col., 2001).

Fig. 14



**Fig. 14:** Mecanismos de homeostasis de Cu en *E. coli*. Se esquematizan los sistemas más importantes que participan en la homeostasis del cobre: el sistema Cue, activo principalmente en aerobiosis (azul), y el sistema Cus, funcional en condiciones de anaerobiosis (verde). CopA es una ATPasa tipo  $P_{1B}$  que trasloca  $\text{Cu}^+$ , CueO una multicobre oxidasa, CueR un regulador transcripcional, Ndh-2 una reductasa de cobre, y CusCFBA un sistema de eflujo del tipo CBA controlado por el sistema de dos componentes CusSR. Los componentes individuales se discuten en el texto. El cobre posiblemente entre al periplasma a través de porinas. Se detalla la organización génica de los regulones *cue* y *cus* en el genoma de *E. coli* K-12.

### 6.1.2 El regulón *cus*

El sistema *cus* (del inglés “*Cu* sensing”) consta de un sistema de dos componentes, que incluye la quinasa sensora CusS y el regulador de respuesta CusR. Ambos modulan la expresión del operón *cusCFBA* en función de la concentración de cobre periplásmico (Fig. 14). El operón *cusRS* se localiza próximo y en orientación divergente a *cusCFBA*. Este último codifica para un sistema de resistencia a Cu y Ag, y consiste de un antiportador tripartito catión- $\text{H}^+$  formado por las proteínas CusA, CusB y CusC, y una chaperona periplasmática de cobre, CusF, que actuaría como chaperón de cobre periplásmico transportando el  $\text{Cu}^+$  hacia la bomba de eflujo CusCBA. CusA funciona como un transportador secundario energizado por un gradiente de  $\text{H}^+$  y es responsable de la especificidad de sustrato. CusB es una proteína de fusión a membrana

y sirve como adaptador entre CusA y CusC, componente de la membrana externa. Esta bomba está relacionada con la familia de transportadores CBA, que sólo se encuentran en bacterias Gram negativas, involucrados en el transporte de iones metálicos, xenobióticos y drogas (Rensing y Grass, 2003; Kittleson y col., 2006). Se postula que este sistema transportaría  $\text{Cu}^+$  directamente desde el citoplasma y/o el periplasma hacia el espacio extracelular (**Fig. 14**) (Outten y col., 2001; Rensing y Grass, 2003).

En aerobiosis, el regulón *cue* actúa como sistema primario de detoxificación, mientras el regulón *cus* contribuiría a la resistencia al metal sólo cuando la concentración del mismo es muy elevada (Outten y col., 2001). Debido a que mutaciones en el regulón *cus* sólo afectan la resistencia a cobre en anaerobiosis, se postula que el regulón *cus* sería el sistema primario de resistencia en ambientes anaeróbicos en los cuales CueO no es funcional ya que depende del  $\text{O}_2$  para catalizar la oxidación del  $\text{Cu}^+$ .

### 6.1.3 El sistema alternativo de resistencia a cobre PcoABCD

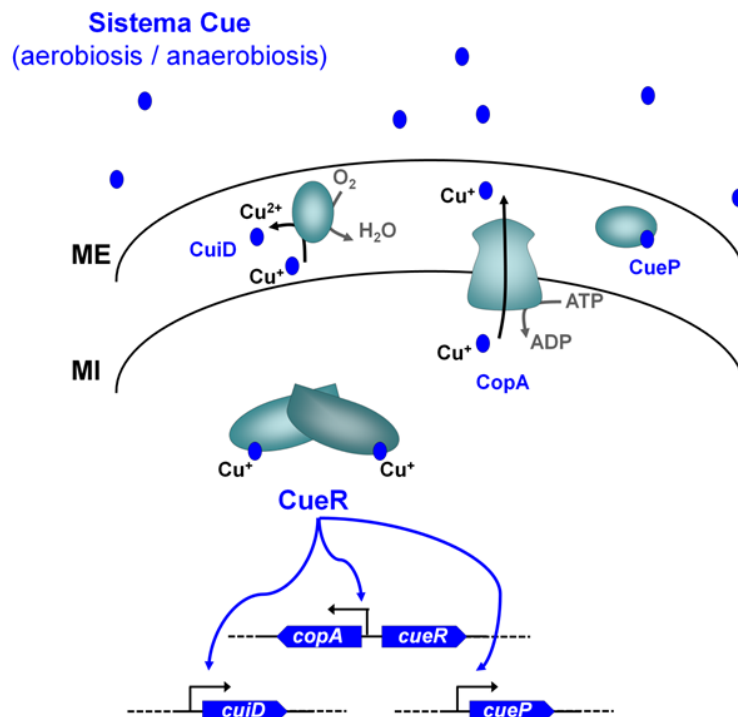
Algunas cepas de *E. coli* poseen además genes adicionales de resistencia a cobre codificados en plásmidos que le confieren mayor tolerancia al metal (Tetaz y Luke, 1983). Por ejemplo, el plásmido pRJ1004 codifica para el sistema de resistencia a cobre PcoABCDS, homólogo al sistema codificado en el plásmido pPT23D de *Pseudomonas syringae*. El operón *pcoABCD* está regulado por el sistema de dos componentes PcoRS, homólogo a CusRS pero de codificación plasmídica (Munson y col., 2000). PcoA es homóloga a CueO, y puede sustituirla funcionalmente (Lee y col., 2002). PcoB se localiza en el interior de la membrana externa e interacciona con PcoA, mientras que estudios realizados con PcoC y PcoD sugieren que los mismos podrían cumplir un rol en el importe de cobre. Según el modelo propuesto para este sistema, PcoC le entregaría el cobre periplásmico a PcoD para ser transportado al citoplasma, posiblemente para su incorporación en PcoA (Rensing y Grass, 2003). Además, pRJ1004 codifica para la proteína de unión a cobre PcoE, que se desempeñaría como chaperona de cobre periplasmática.

## 6.2 Homeostasis de cobre en *Salmonella*

### 6.2.1 El regulón *cue*

A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, en donde la homeostasis de cobre intracelular está mayoritariamente controlada por la acción coordinada de los sistemas *cue* y *cus*, *Salmonella* posee sólo el regulón *cue*. Estudios realizados en nuestro laboratorio (Espariz y col., 2007; Pontel y Soncini, 2009) indican que los factores codificados en el regulón *cue* de *Salmonella* son responsables de la protección al cobre tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Este regulón incluye el regulador transcripcional CueR (91 % idéntico a su ortólogo en *E. coli*), que en presencia de cobre activa la expresión de la oxidasa periplásmica CueO, también llamada CuiD, que posee un 80 % de identidad con CueO de *E. coli* (Kim y col., 2002; Lim y col., 2002) y de la ATPasa de tipo P<sub>1B</sub>, CopA (Espariz y col., 2007). En reemplazo del sistema *Cus*, *Salmonella* cuenta además con *cueP*, un gen que codifica para un factor periplásmico de unión a Cu (Pontel y Soncini, 2009). CueP también está transcripcionalmente regulado por CueR (Pontel y Soncini, 2009) (Fig. 15).

**Fig. 15**



**Fig. 15: Sistema Cue de homeostasis de Cu en *Salmonella*.** CopA es una ATPasa tipo P<sub>1B</sub> que transloca Cu<sup>+</sup>, CuiD una oxidasa multicobre homóloga a CueO de *E. coli*, CueP es una proteína periplásmica que brinda resistencia en condiciones anaeróbicas y CueR es el regulador transcripcional. Los componentes individuales se discuten en el texto. En *Salmonella* los genes que constituyen el regulón *cue* están ordenados de manera diferente que en *E. coli*.

En aerobiosis, el mecanismo empleado por *Salmonella* para eliminar el exceso de cobre sería similar a lo reportado para *E. coli*; esto es la exportación del ión desde el citoplasma al periplasma por CopA, y en su ausencia por un homólogo llamado GolT, y la conversión de Cu(I) a Cu(II) por medio de CueO (Espariz y col., 2007). En anaerobiosis, y a diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, la oxidasa periplásmica parecería también cumplir un rol en la resistencia al metal (Outten y col., 2001; Espariz y col., 2007), lo cual adquiere relevancia en un sistema celular carente del sistema auxiliar *cus* (Espariz y col., 2007). Sumado a esto, CueP sería el principal responsable de proteger al periplasma de la toxicidad provocada por el metal en condiciones de anaerobiosis. De hecho, en el laboratorio se demostró que CueP es capaz de reemplazar funcionalmente al complejo sistema de resistencia Cus en la detoxificación de Cu periplasmático en una cepa de *E. coli* delecionada del locus *cus* (Pontel y Soncini, 2009).

## 7. Toxicidad y resistencia a oro

A diferencia del Cu, un metal esencial pero perjudicial en altas concentraciones, no ha sido reportada ninguna función biológica para el Au, por lo que su presencia, incluso en niveles de concentración traza, resulta extremadamente tóxico. Aunque el oro es un elemento muy distribuido en la corteza terrestre, su concentración en la biosfera es muy baja. Sin embargo, existen regiones localmente enriquecidas por causas naturales o antropogénicas (Karamushka y Gadd, 1999). Se han identificado regiones ricas en complejos movilizables de oro en sedimentos o suelos que contienen el metal como mineral, en fuentes hidrotermales, así como en ambientes afectados por deposiciones atmosféricas del metal como resultado de actividades geotermales (Moss y col., 2001; Eisler, 2004). Asimismo, se ha observado que diversas especies animales y vegetales son capaces de absorber y acumular oro (Eisler, 2004). Se han reportado varias especies de bacterias, arqueas y levaduras capaces de precipitar el oro disuelto del medio mediante su reducción (Karamushka y Gadd, 1999; Kashefi y col., 2001; Karthikeyan y Beveridge, 2002; Reith y col., 2006), aunque los mecanismos de tolerancia a altos niveles de Au de estos organismos no han sido descriptos.

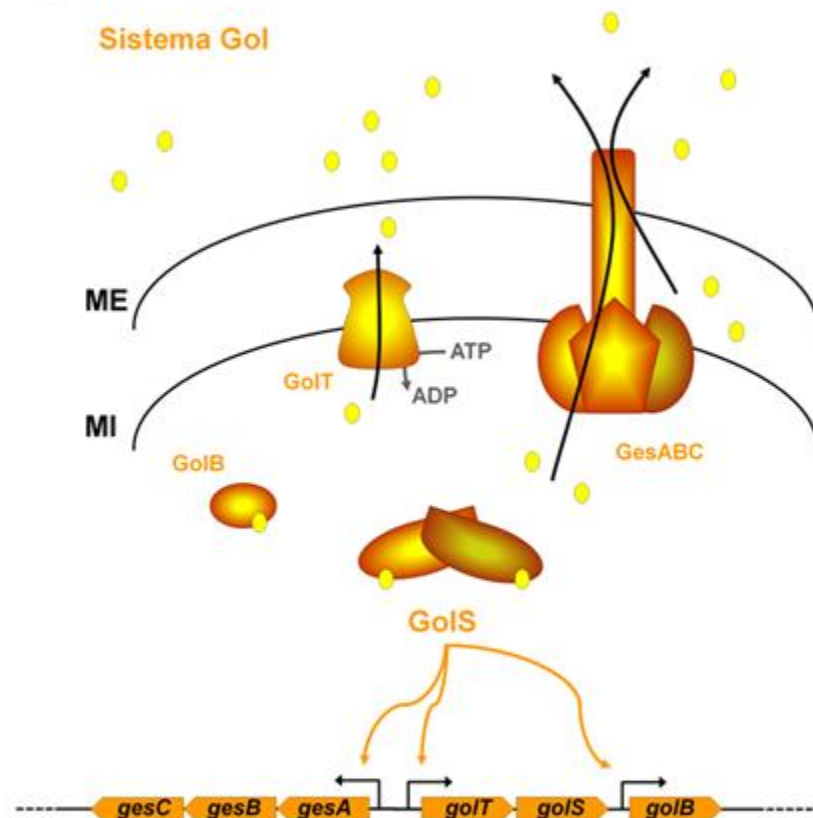
## 7.1 Resistencia a oro en *Salmonella*. El regulón *gol*

En nuestro laboratorio caracterizamos el primer sistema bacteriano de resistencia a sales de oro codificado en un locus específico de especie en *S. Typhimurium* (Checa y col., 2007). El locus *gol* (por su sigla en inglés *gold-resistance*) se encuentra ubicado en una región genómica de 45 kb presente exclusivamente en algunos serotipos de *Salmonella*, y comprende los operones *golTS* (*golT*, del inglés *GolS regulated transporter*, y *golS* por *gold sensor*), *gesABC* (del inglés *GolS induced CBA-efflux system*) y el gen *golB* (*GolS induced binding protein*) (**Fig. 16**). *GolS* es un activador transcripcional de la familia MerR, 41 % idéntico a CueR de *E. coli* y *Salmonella*. Actúa controlando la transcripción de los genes *golB*, *golT* y *ges* en presencia de Au(I) en el medio de cultivo (Checa y col., 2007; Pontel y col., 2007). Aunque es altamente selectivo para iones de Au, *GolS* es capaz de detectar otros metales del grupo IB como Cu y Ag, aunque el nivel de activación de *GolS* en presencia de estos iones es mucho menor que el observado para CueR (Checa y col., 2007). El gen *golT*, ubicado corriente arriba del regulador, codifica para una ATPasa de tipo P (estructural y funcionalmente homóloga a CopA, con un 42 % de identidad), mientras que el gen *golB*, corriente abajo del regulador, codifica para una proteína de unión a metal. El operón *gesABC*, que codifica para un sistema de eflujo CBA, está ubicado inmediatamente corriente arriba del operón *golTS* y se transcribe en dirección opuesta al mismo. *GesABC* es homólogo a los sistemas de eflujo tipo CBA que dirigen el eflujo de iones metálicos, xenobióticos o drogas, principalmente desde el periplasma o desde la membrana interna bacteriana, aunque no se ha descartado el eflujo desde el citoplasma, y a través de la membrana externa, hacia el espacio extracelular (McKeegan y col., 2003; Nies, 2003; Checa y col., 2007; Pontel y col., 2007). El componente central de estos sistemas tripartitos es la proteína de membrana interna del complejo conocida como proteína RND (de su sigla en inglés *resistance-nodulation-cell division*) (Checa y col., 2007; Hernandez-Mendoza y col., 2007). Esta proteína media el transporte activo y determina la especificidad de sustrato. Los otros dos componentes del complejo son la proteína accesoria de la familia MFP (*membrane fusion protein*) y el factor de membrana externa OMF (*outer-membrane factor*) (Nies, 2003; Eswaran y col., 2004; Checa y col., 2007). Experimentos realizados también en nuestro laboratorio demostraron que en una cepa delecionada en el principal transportador de drogas *acrAB*, *GesABC* también puede mediar la resistencia a drogas cuando es inducido por *GolS* en presencia de oro (Pontel y col.,



2007). *GolS* está autoregulado, de manera que en presencia de Au su concentración intracelular aumenta alrededor de 420 veces (Checa y col., 2007; Pérez Audero y col., 2010). La transcripción del operón *gesABC* difiere de la de los otros genes controlados por *GolS* debido a que presenta un operador menos conservado que el presente en los promotores de *golTS* y de *golB*, requiriendo mayores concentraciones de *GolS* y por lo tanto mayor concentración de Au para su inducción (Pontel y col., 2007). Esto indica que la inducción del regulón *gol* está regulado de manera jerárquica (Pontel y col., 2007; Pérez Audero y col., 2010). Es decir, a bajas concentraciones de Au sólo se inducen *golTS* y *golB*, mientras que cuando la exposición al metal es prolongada, o cuando los niveles del mismo son elevados, se produce la inducción del operón *ges*.

**Fig. 16**



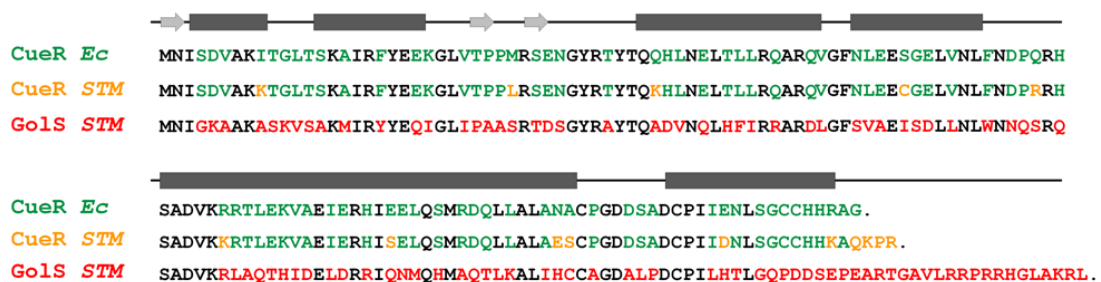
**Fig. 16:** Sistema de resistencia a Au en *Salmonella*. *GoIT* es una ATPasa tipo P que transloca Au (homóloga a *CopA* en *E. coli*), *GoIB* es una proteína citoplasmática de unión a Au, *GesABC* es un sistema de eflujo CBA y *GolS* es el regulador transcripcional. Los componentes individuales se discuten en el texto. Se detalla la organización génica del locus *gol* en el genoma de *S. Typhimurium* LT2.

## 8. Sistemas *cue* y *gol*: funcional y estructuralmente homólogos

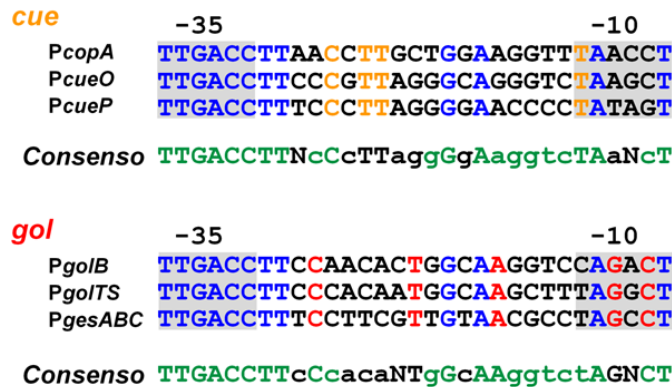
El regulón *gol* es similar, en sus componentes y regulación, al regulón *cue*. Estos sistemas están controlados por dos homólogos MerR que responden a metales monovalentes, CueR y GolS. El primero es el regulador principal de la homeostasis de cobre y forma parte del regulón *cue* (sección 6.2.1), mientras que GolS controla la transcripción del regulón *gol* en respuesta a sales de oro (sección 7.1). Ambos reguladores son similares no sólo a nivel proteico, sino también a nivel de la secuencia que reconocen en los promotores de sus genes blanco, sobre todo en la región del operador que se superpone con el elemento -35 de los mismos (**Fig. 17**) (Espariz y col., 2007; Pontel y col., 2007; Pontel y Soncini, 2009).

**Fig. 17**

**A**



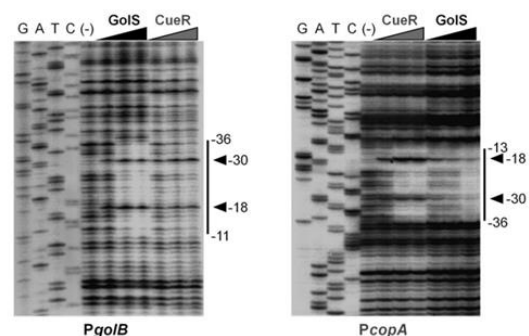
**B**



**Fig. 17: A. CueR y GolS son 41% idénticos.** Alineamiento de las secuencias proteicas de los reguladores transcripcionales GolS y CueR de *E. coli* y *Salmonella*. Los aminoácidos idénticos en los dos reguladores se muestran en negro, y en color los residuos específicos para cada regulador: verde para los aminoácidos conservados en CueR de *E. coli* y *Salmonella*, naranja para aquellos presentes sólo en CueR de *Salmonella*, y rojo para los residuos específicos de GolS. Se muestra además un esquema de las estructuras secundarias correspondientes a cada región proteica. Los rectángulos negros simbolizan hélices- $\alpha$  y las flechas grises, estructuras del tipo láminas- $\beta$ . **B. CueR y GolS reconocen, de manera específica, secuencias operadoras muy similares.** Alineamiento de los sitios de unión de CueR y GolS. En azul se destacan las bases conservadas entre todos los operadores de los regulones *cue* y *gol*. En naranja se muestran las bases específicamente conservadas en los operadores reconocidos por CueR, y en rojo aquellas conservadas sólo en los sitios de unión de GolS. Las bases idénticas o similares entre las secuencias consenso de ambos grupos de operadores se indican en verde. En todos los casos, las cajas promotoras -35 y -10 se muestran recuadradas en gris.

Por medio de ensayos de huella dactilar del ADN (ADN-footprinting) y de retardo de la movilidad electroforética (o EMSA por sus siglas en inglés) realizados previamente en el laboratorio (Pérez Audero y col., 2010) se demostró que GolS y CueR interaccionan con la misma región en los promotores de *copA* y *golB* (Fig.18). Ambos reguladores son capaces de inducir la expresión de los genes del otro regulón en ausencia de su regulador innato, indicando la posibilidad de regulación cruzada entre ambos regulones, si bien cada regulador reconoce con mayor afinidad sus secuencias operadoras nativas (Pérez Audero y col., 2010). Esta observación sugiere que los componentes de un regulón podrían suplir a los componentes del otro, auxiliando a la detoxificación del metal ante una deficiencia en el sistema de homeostasis o resistencia principal. De hecho, estudios previos sugieren que la ausencia del transportador principal de cobre CopA provoca un aumento en la concentración citoplasmática de este metal (Stoyanov y Brown, 2003; Checa y col., 2007; Espariz y col., 2007). En estas condiciones, se observó que GolS es capaz de inducir la expresión de *golB* y *golT*, aunque no de *ges*, y que la expresión de *GolT* podría contribuir con la extrusión del exceso de cobre supliendo parcialmente la acción de CopA (Espariz y col., 2007). De manera inversa, ha sido reportado que una cepa mutante doble en *copA* y en *golTSB* es más sensible a Au que una mutante simple  $\Delta$ *golTSB*, sugiriendo que la bomba de eflujo de cobre CopA puede contribuir al exporte del metal en condiciones de altas concentraciones citoplasmáticas del mismo (Checa y col., 2007).

**Fig. 18**



**Fig. 18: GolS y CueR reconocen de igual manera los mismos operadores.** Ensayo de Footprinting con las regiones promotoras *PgolB* y *PcopA*. (Adaptado de Pérez Audero y col., 2010).

GlnR y TnrA constituyen el único precedente de regulación cruzada entre sistemas controlados por reguladores de tipo MerR en *Bacillus subtilis* (Zaliecckas y col., 2006). Sin embargo, cada uno de estos reguladores transcripcionales es funcional en diferentes condiciones nutricionales, actuando de manera alternada. Nuestros resultados demuestran que este no es el caso para GolS y CueR, ya que estos reguladores contribuyen a la resistencia al metal siempre que el otro regulador no sea funcional o se encuentre ausente (Pérez Audero y col., 2010).

### 8.1 Operadores de los regulones *cue* y *gol*: similares pero específicos

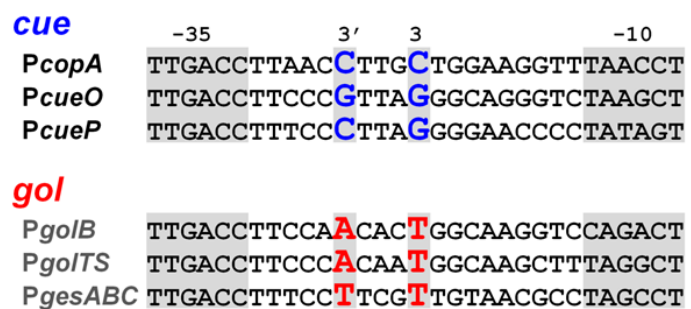
La evolución de circuitos regulatorios bacterianos generalmente involucra la duplicación de genes codificantes para factores transcripcionales, los que a su vez pueden sufrir tanto modificaciones en la señal que detectan, como así también reasignación de las secuencias operadoras que regulan. Esto, y los subsecuentes eventos de transferencia génica horizontal, contribuyen a la generación de diversos arreglos de vías regulatorias que le confieren al organismo una importante ventaja evolutiva (Teichmann y Babu, 2004; van Hijum y col., 2009; Martínez-Núñez y col., 2010). Un ejemplo de duplicación del factor transcripcional y de sus genes blanco, seguido de la segregación de operador y de la señal detectada, ha sido recientemente reportado para dos reguladores tipo MerR de *E. coli*: el sensor de Zn(II) ZntR, y el sensor de Cu(I) anteriormente mencionado CueR (Martínez-Núñez y col., 2010). Estos reguladores controlan la transcripción de los genes parálogos *zntA* y *copA*, codificantes para bombas de eflujo de Zn y Cu, respectivamente (Brocklehurst y col., 1999; Outten y col., 2000; Stoyanov y col., 2001; Brown y col., 2003; Hobman y col., 2005; Summers, 2009).

Además de ZntR y CueR, *Salmonella* también alberga a GolS que, como se ha mencionado anteriormente, posee una identidad en aminoácidos del 41 % con CueR, (McClelland y col., 2001; Checa y col., 2007; Espariz y col., 2007). Su ubicación y su presencia sólo en *Salmonella* sugiere que este gen y los genes adyacentes que conforman el locus *gol* fueron adquiridos por transferencia génica horizontal (Checa y Soncini, 2011). El análisis de los operadores controlados por CueR y GolS revela que ambos reguladores reconocen secuencias blanco muy similares (Outten y col., 2000; Stoyanov y col., 2001; Checa y col., 2007; Espariz y col., 2007; Pontel y col., 2007; Pontel y Soncini, 2009), especialmente en la región 5' del operador, que es idéntica en todos los operadores de los regulones *cue* y *gol* (**Fig. 17-B**). Sin embargo, CueR y GolS reconocen selectivamente sus operadores innatos y únicamente reconocen las secuencias regulatorias heterólogas en ausencia del otro regulador (Pérez Audero y col., 2010). De hecho, durante la caracterización inicial del regulón *gol*, reportamos un muy bajo nivel de expresión de los genes regulados por GolS, inducida por Au, en cepas  $\Delta$ *golS*, y esta activación transcripcional fue atribuida a CueR (Checa y col., 2007; Pontel y col. 2007). Cabe destacar que el operador en la secuencia promotora de *gesABC* constituye una excepción a la regla por estar menos conservado que los otros

operadores regulados por *GolS* (Pontel y col., 2007) y no es reconocido por *CueR*, aún en ausencia del regulador nativo (Pérez Audero y col., 2010).

Esta selectividad regulador/operador se logra por combinación de la presencia de bases nucleotídicas distintivas, correspondientes a las posiciones 3' y 3 respecto al centro del operador, que actúan como determinantes de selectividad de sensor, y por modulación de la concentración intracelular del mismo (Pérez Audero y col., 2010). Básicamente, se conservan las bases A y T en los promotores reconocidos por *GolS*, y C y C o C y G en los promotores reconocidos por *CueR* (**Fig. 19**) (Pérez Audero y col., 2010). Además, en el laboratorio demostramos que al reemplazar estas bases por las presentes en los promotores del regulón parálogo se produce una reversión en la especificidad de sensor. Es decir, *GolS* reconoce el promotor *P<sub>copA</sub>(AT)* de manera similar a como reconoce su promotor nativo *P<sub>golB</sub>*, mientras que *CueR* reconoce a *P<sub>copA</sub>* silvestre, pero también al promotor *P<sub>golB</sub>(CC)* (Pérez Audero y col., 2010).

**Fig. 19**



**Fig. 19: Comparación de los operadores reconocidos por *CueR* y por *GolS*.** Se indican las cajas -35 y -10 y las bases de selectividad 3' y 3.

Resultados similares se obtuvieron cuando se realizaron ensayos de actividad transcripcional en *E. coli*. Para estos estudios, dado que esta bacteria carece de *golS*, se generó una cepa en la cual el marco de lectura de *cueR* se reemplazó por el de *golS*. Nuevamente, *GolS* es capaz de transcribir el gen reportero *lacZ* ya sea desde el promotor nativo *P<sub>golB</sub>* o *P<sub>copA</sub>(AT)*, mientras que *CueR* reconoce su promotor parental *P<sub>copA</sub>* y el mutante *P<sub>golB</sub>(CC)*. Estos resultados indican que los reguladores *GolS* y *CueR* deben diferir en su dominio de unión al ADN para poder discriminar entre operadores tan similares.

En el presente trabajo de Tesis decidimos completar la caracterización del mecanismo de reconocimiento selectivo sensor/operador para los regulones responsables de la homeostasis y resistencia a cobre y oro en *Salmonella*,

respectivamente. Para ello, nos propusimos identificar los residuos de aminoácidos que dictan la selectividad de operador en estos reguladores MerR parálogos.

Además, como un segundo objetivo, nos propusimos iniciar la caracterización de otro regulador transcripcional MerR específico de *Salmonella* y homólogo a MlrA (sección 4.3.2.3) cuya función no ha sido aún dilucidada.

# Objetivos

## Objetivos

---

El **primer objetivo general** de este proyecto de Tesis es caracterizar el mecanismo de reconocimiento selectivo sensor/operador para los regulones responsables de la homeostasis y resistencia a cobre y oro en *Salmonella*, respectivamente. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- delimitar la región responsable de la discriminación de operador en los reguladores transcripcionales GolS y CueR;
- caracterizar *in vitro* la interacción de cada regulador transcripcional con promotores de los genes de los regulones *gol* y *cue*;
- identificar los residuos de aminoácidos que dictan la selectividad de operador;
- analizar el rol de las bases conservadas en las posiciones 3' y 3 en los operadores de cada regulón, en su interacción específica con las bases de selectividad en ambos reguladores;
- caracterizar *in silico* dicha interacción;
- analizar las causas de la actividad regulatoria diferencial de los sensores maestros de los regulones *cue* de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub>.

El **segundo objetivo general** de este proyecto de Tesis se centra en el análisis molecular y funcional de STM1266, un regulador transcripcional homólogo a MlrA, específico de *Salmonella*. Para ello, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- analizar *in silico* el entorno génico de STM1266;
- caracterizar fenotípicamente las mutantes  $\Delta$ STM1266 y una cepa que sobreexpresa ectópicamente a STM1266;
- determinar su participación en los mecanismos regulatorios implicados en la formación de biopelículas.

Estos estudios contribuirán a la comprensión de los mecanismos funcionales de reguladores MerR no convencionales.



# **Materiales y Métodos**

## ***Materiales y Métodos***

---

### **1. CEPAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS**

Las cepas y plásmidos empleados se detallan en las **Tablas 1 y 2**, respectivamente.

Los oligonucleótidos que fueron utilizados para el clonado de las regiones especificadas, para la generación de mutantes, en ensayos de anisotropía de fluorescencia o en ensayos de retardo de la movilidad electroforética se detallan en la **Tabla 3**. Los oligonucleótidos de más de 40 pb de extensión fueron sintetizados por Sigma, y los oligos más cortos por GenBiotech. En todos los casos, los oligonucleótidos se disolvieron en agua destilada estéril hasta una concentración 100  $\mu\text{M}$  y se guardaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **2. MEDIOS DE CULTIVO Y ANTIBIÓTICOS**

Se utilizaron los medios de cultivo Luria-Bertani (LB), compuesto por 10 g/l de peptona de carne, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl, el medio SLB idéntico al anterior pero sin el agregado de NaCl para evitar el quenching (apagado) de la fluorescencia por la presencia de iones  $\text{Cl}^-$ , y el medio rico Nutrient Broth (NB), compuesto por 3 g/l de extracto de carne bovina y 5 g/l de peptona, al cual se le agregó glucosa en concentración final de 5 g/l para los ensayos de movilidad.

Para la preparación de medios sólidos y semisólidos se agregó agar en concentraciones finales de 15 g/l y 6 g/l, respectivamente. Para los ensayos de motilidad tipo swarming y swimming, el medio de cultivo correspondiente se suplementó con 5 g/l y 3 g/l de agar, respectivamente.

Los antibióticos empleados fueron: ampicilina (Amp) (100  $\mu\text{g/ml}$ ), cloranfenicol (Cm) (10  $\mu\text{g/ml}$ ), kanamicina (Km) (50  $\mu\text{g/ml}$ ), tetraciclina (Tc) (15  $\mu\text{g/ml}$ ), espectinomomicina (Espect) (50  $\mu\text{g/ml}$ ) y estreptomomicina (Estrep) (100  $\mu\text{g/ml}$ ).

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F-Z-( <i>tp80lacZAM15</i> ) <i>endA1 recA1 supE44 thi-1</i>	(Sambrook y col., 1989)
XL1-Blue	<i>gyrA96 hsdR17 relA1? A(lacZYA-argF)U169</i>	Stratagene, CA, USA.
W3110	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI<sup>f</sup> ZAM15 Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )]	
W3110	F $\lambda$ IN( <i>rrnD-rrnE</i> )1 <i>rph-1</i>	(Bachmann, 1972)
PB8885	W3110 <i>lacZ::cm</i>	Este trabajo
PB6731	W3110 <i>cueR::cm</i>	(Pontel y Soncini, 2009)
PB8934	W3110 $\Delta$ <i>cueR lacZ::cm</i>	Este trabajo
PB10285	W3110 $\Delta$ <i>lacZ copA::km</i>	Este trabajo
PB10295	W3110 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>copA</i>	Este trabajo
PB10305	W3110 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>copA cueR::cm</i>	Este trabajo
PB7485	MC4100 $\Delta$ <i>cueR<sub>EC</sub>::cueR<sub>EC</sub></i>	(Lic. Grisolía - Tesina, 2009)
PB7768	MC4100 $\Delta$ <i>cueR<sub>EC</sub>::cueR<sub>STM</sub></i>	(Lic. Grisolía - Tesina, 2009)
PB7825	MC4100 $\Delta$ <i>PcueR<sub>EC</sub>::PcueR<sub>STM</sub></i>	(Lic. Grisolía - Tesina, 2009)
PB7828	MC4100 $\Delta$ <i>PcueR<sub>EC</sub>-cueR<sub>EC</sub>::PcueR<sub>STM}-cueR<sub>STM</sub></sub></i>	(Lic. Grisolía - Tesina, 2009)
<b><i>Salmonella Typhimurium</i></b>		
14028	Silvestre	(Fields y col., 1986)
7065	<i>metA22 metE551 trpD2 ilv<sup>-</sup>452 leu<sup>-</sup> pro<sup>-</sup> hsdSA29 hsdB<sup>-</sup> strA120 galE</i>	(Bullas y Ryu, 1983)
PB10683	14028 $\Delta$ <i>gol</i> $\Delta$ <i>gesABC</i> $\Delta$ <i>cueP</i> $\Delta$ <i>copA cueR::cm</i>	Stock de laboratorio
PB5900	14028 $\Delta$ <i>gol cueR::km</i>	(Espariz y col., 2007)
PB10583	14028 $\Delta$ <i>rpoS STM1266::lacZ-cm</i>	Este trabajo
PB10456	14028 <i>STM1265::lacZ-cm</i>	Este trabajo
PB10486	14028 <i>STM1265::lacZ-cm STM1266::km</i>	Este trabajo
PB10458	14028 <i>STM1266::lacZ-cm</i>	Este trabajo
PB10504	14028 <i>STM1266::lacZ-cm STM1265::km</i>	Este trabajo
PB11187	14028 <i>STM1266::lacZ-cm</i> $\Delta$ <i>STM1265</i>	Este trabajo
PB11182	14028 <i>STM1266::lacZ-cm</i> $\Delta$ <i>STM1265<sub>5</sub>::km</i>	Este trabajo
PB10451	14028 <i>STM1266::km</i>	Este trabajo
PB10523	14028 $\Delta$ <i>STM1264</i>	Este trabajo
PB10631	14028 <i>PcsgD::lacZ-cm</i>	Este trabajo
PB10913	14028 <i>PcsgD::lacZ-cm STM1266::km</i>	Este trabajo
PB10915	14028 <i>PcsgD::lacZ-cm</i> $\Delta$ <i>mIra</i>	Este trabajo
PB10919	14028 <i>PcsgD::lacZ-cm</i> $\Delta$ <i>mIra STM1266::km</i>	Este trabajo
PB10633	14028 <i>PmlrA::lacZ-cm</i>	Este trabajo
PB10918	14028 <i>PmlrA::lacZ-cm STM1266::km</i>	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia
pKD46	ori <sub>R<sub>pSC101</sub></sub> ts P <sub>araB</sub> exo-bet-gam Amp <sup>R</sup>	(Datsenko y Wanner, 2000)
pKD3	ori <sub>γ</sub> Amp <sup>R</sup> FRT Cm <sup>R</sup> FRT	(Datsenko y Wanner, 2000)
pKD4	ori <sub>γ</sub> Amp <sup>R</sup> FRT Km <sup>R</sup> FRT	(Datsenko y Wanner, 2000)
pJB20	Derivado del pKD3. <i>lacZY</i> , Cm <sup>R</sup> , (cassette flanqueado por sitios FRT), Amp <sup>R</sup>	Waldor, no publicado
pCP20	λ-cI857-ts Pr- <i>flp</i> Amp <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	(Datsenko y Wanner, 2000)
pUH21-2 <i>lacI</i> <sup>q</sup>	ori <sub>pMB1</sub> Amp <sup>R</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup>	(Soncini y col., 1995)
pPB1205	pUH:: <i>gols</i>	(Checa y col., 2007)
pPB1209	pUH:: <i>cueR</i>	(Espariz y col., 2007)
pPB1291	pUH:: <i>gols-α2<sub>R</sub></i>	Este trabajo
pPB1304	pUH:: <i>cueR-α2<sub>S</sub></i>	Este trabajo
pPB1405	pUH:: <i>STM1265</i>	Este trabajo
pPB1407	pUH:: <i>STM1266</i>	Este trabajo
pPB1428	pUH:: <i>mrA</i>	Este trabajo
pSU36	Ori <sub>p15A</sub> , Km <sup>R</sup>	Addgene
pPB1389	pSU36:: <i>cueR</i>	Este trabajo
pPB1395	pSU36:: <i>cueR-N<sub>S</sub></i>	Este trabajo
pPB1391	pSU36:: <i>cueR-(HTH1+L)<sub>S</sub></i>	Este trabajo
pPB1392	pSU36:: <i>cueR-HTH1<sub>S</sub></i>	Este trabajo
pPB1393	pSU36:: <i>cueR-(L+HTH2)<sub>S</sub></i>	Este trabajo
pPB1394	pSU36:: <i>cueR-HTH2<sub>S</sub></i>	Este trabajo
pPB1396	pSU36:: <i>cueR-α2<sub>S</sub></i>	Este trabajo
pPB1423	pSU36:: <i>cueR<sub>SI4A</sub></i>	Este trabajo
pPB1399	pSU36:: <i>cueR<sub>AI6M</sub></i>	Este trabajo
pPB1424	pSU36:: <i>cueR<sub>AI6T</sub></i>	Este trabajo
pPB1400	pSU36:: <i>cueR<sub>F19Y</sub></i>	Este trabajo
pPB1425	pSU36:: <i>cueR<sub>E22Q</sub></i>	Este trabajo
pPB1401	pSU36:: <i>cueR<sub>AI6M-F19Y</sub></i>	Este trabajo
pPB1390	pSU36:: <i>gols</i>	(Checa y col., 2007)
pPB1397	pSU36:: <i>gols-N<sub>R</sub></i>	Este trabajo
pPB1398	pSU36:: <i>gols-α2<sub>R</sub></i>	Este trabajo
pPB1414	pSU36:: <i>gols<sub>AI4S</sub></i>	Este trabajo
pPB1402	pSU36:: <i>gols<sub>M16A</sub></i>	Este trabajo
pPB1403	pSU36:: <i>gols<sub>Y19F</sub></i>	Este trabajo
pPB1416	pSU36:: <i>gols<sub>Q22E</sub></i>	Este trabajo
pPB1404	pSU36:: <i>gols<sub>M16A-Y19F</sub></i>	Este trabajo
pPB1258	pSU36:: <i>cueR<sub>EC</sub></i>	(Lic. Grisolí - Tesina, 2009)
pPB1427	pSU36:: <i>cueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub></i>	Este trabajo
pPB1426	pSU36:: <i>cueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub></i>	Este trabajo
pMC1871	pBR322, Tet <sup>R</sup> , <i>lacI</i> <sup>q</sup>	Amersham Biosciences
pPB1225 (pP <i>copA</i> )	pMC1871:: <i>PcopA</i>	(Pérez Audero y col., 2010)
pPB1222 (pP <i>golB</i> )	pMC1871:: <i>PgolB</i>	(Pérez Audero y col., 2010)
pPB1233 (pP <i>copA<sub>AT</sub></i> )	pMC1871:: <i>PcopA<sub>AT</sub></i>	(Pérez Audero y col., 2010)
pPB1230 (pP <i>golB<sub>CC</sub></i> )	pMC1871:: <i>PgolB<sub>CC</sub></i>	(Pérez Audero y col., 2010)

Tabla 3. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio Restr. 5'	Función	Referencia
<i>lacZ</i> -P1	TTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGAT GTGTAGGCTGGAGCTGCTC		Delección del gen <i>lacZ</i>	Este trabajo
<i>lacZ</i> -P2	GCGAAATACGGGCAGACATGGCCTGCCGGTTATTATTATC ATATGAATATCCTCCTTA		Delección del gen <i>lacZ</i>	Este trabajo
<i>copA</i> -P1	CACAGCCAGTCAAAACTGTCTTAAAGGAGTGTTTTATGGTGT AGGCTGGAGCTGCTTCG		Delección del gen <i>copA</i>	(Checa y col., 2007)
<i>copA</i> -P2	CTAAAGCAGCGCATCCGCAATGATGTACTTACATATGAATA TCCTCCTTA		Delección del gen <i>copA</i>	(Checa y col., 2007)
<i>cueR</i> -P1	CCCTTTAAACAAAGCACAGGAGGCGTTGCGGAACGATGGTG TAGGCTGGAGCTGCTTCG		Delección del gen <i>cueR</i>	(Espariz y col., 2007)
<i>cueR</i> -P2	GGGATAACCCTACATATCCGAGCCGTCTCGTCTTAATCACAT ATGAATATCCTCCTTA		Delección del gen <i>cueR</i>	(Espariz y col., 2007)
CueR-ORF-Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCG	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR</i> silvestre o híbrido	(Espariz y col., 2007)
CueR-ORF-Rv	CGCAAGCTTGATCAACGTGGCTTTTGCGCC	<i>Hind</i> III	Amplificación de <i>cueR</i> silvestre o híbrido	(Espariz y col., 2007)
CueR <sub>EC</sub> -ORF-Fw	GAGGATCCATATGAACATCAGCG	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR</i> <sub>EC</sub> silvestre o híbrido	(Lic. Grisolía – Tesina, 2009)
CueR <sub>EC</sub> -ORF-Rv	CGCAAGCTTGATCACCCCTGCCGATGATGA	<i>Hind</i> III	Amplificación de <i>cueR</i> <sub>EC</sub> silvestre o híbrido	(Lic. Grisolía – Tesina, 2009)
GolS-ORF-Fw	GAGGATCCATATGAACATCGGTAAAGCAGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>golS</i> silvestre o híbrido	(Checa y col., 2007)
GolS-ORF-Rv	ACCCAAGCTTACAGACGCTTTGCCAG	<i>Hind</i> III	Amplificación de <i>golS</i> silvestre o híbrido	(Checa y col., 2007)
CueR-N-Fw	GTTGCTGAAATCAGCGACTTACTGAATCTGTTTAAACGATCCG CG		Construcción de <i>cueR</i> -N <sub>S</sub>	Este trabajo
GolS-N-Rv	CGCGGATCGTTAAACAGATTCAGTAAGTCGCTGATTTTCAGC AAC		Construcción de <i>cueR</i> -N <sub>S</sub>	Este trabajo
CueR-HTH1+L-Fw	GGCAAGTCGGACGGATTCCGGCTATCGCACCTACACGCAGA AGC		Construcción de <i>cueR</i> -(HTH1+L) <sub>S</sub>	Este trabajo
GolS-HTH1+L-Rv	GCTTCTGCGTGAGGTGCGATAGCCGGAATCCGTCCGACTTG CC		Construcción de <i>cueR</i> -(HTH1+L) <sub>S</sub>	Este trabajo
CueR-HTH1-Fw	CGCTACTATGAACAGATTGGGCTGGTGACGCCATTACG		Construcción de <i>cueR</i> -HTH1 <sub>S</sub>	Este trabajo
GolS-HTH1-Rv	CGTAATGGCGGCGTCACCAGCCAATCTGTTCATAGTAGCG		Construcción de <i>cueR</i> -HTH1 <sub>S</sub>	Este trabajo
GolS-Loop-Fw	AAGAGAAAGGGCTGGTGACGATTGGTCTGA		Construcción de <i>cueR</i> -(L+HTH2) <sub>S</sub>	Este trabajo
GolS-HTH2-Fw	ACACGCAGAAGCATTTAAACCAGGCTGATG		Construcción de <i>cueR</i> -HTH2 <sub>S</sub>	Este trabajo
GolS-HTH2-Rv	ACATCTGCGCTATGGCGTCGATTACAGTAAG		Construcción de <i>cueR</i> -(L+HTH2) <sub>S</sub> y <i>cueR</i> -HTH2 <sub>S</sub>	Este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio Restr. 5'	Función	Referencia
CueR- $\alpha 2$ -Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCGATGTGGCGAAAAAACCG GTTTATCGGCCAAAATGATTCGCTACTATGAACAGATTGGGC TGGTGACGCCGCCATTACG	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR-<math>\alpha 2_S</math></i>	Este trabajo
GolS-N-Fw	GGGGTTTAATCTGGAAGAGTGTGGCGAACTGGTCAATCTTT GGAATAACCCAGTCGCGGC		Construcción de <i>golS-N<sub>R</sub></i>	Este trabajo
CueR-N-Rv	GCCGCGACTGGTTATTCCAAAGATTGACCAGTTCGCCACACT CTTCCAGATTAACCC		Construcción de <i>golS-N<sub>R</sub></i> y <i>cueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub></i>	Este trabajo
GolS- $\alpha 2$ -Fw	GAGGATCCATATGAACATCGGTAAAGCAGCTAAAGCATCGA AAGTCTCGTTTTATGAAGAGAAAGGGCTGGTGACGATTGGT CTGATTCGCCGCGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>golS-<math>\alpha 2_R</math></i>	Este trabajo
CueR(A14)-Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCGATGTGGCGAAAAAACCG GTTTAAACCGCCAAAGCCATTCGGTTTTATGAAGAGAAAGGG CTGGTGACGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR<sub>S14A</sub></i>	Este trabajo
CueR(M16)-Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCGATGTGGCGAAAAAACCG GTTTAAACCGCCAAAATGATTCGGTTTTATGAAGAGAAAGGG CTGGTGACGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR<sub>A16M</sub></i>	Este trabajo
CueR(T16)-Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCGATGTGGCGAAAAAACCG GTTTAAACCGCCAAAACGATTCGGTTTTATGAAGAGAAAGGG CTGGTGACGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR<sub>A16T</sub></i>	Este trabajo
CueR(Y19)-Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCGATGTGGCGAAAAAACCG GTTTAAACCGCAAAGCCATTCGGTACTATGAAGAGAAAGGG CTGGTGACGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR<sub>F19Y</sub></i>	Este trabajo
CueR(Q22)-Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCGATGTGGCGAAAAAACCG GTTTAAACCGCAAAGCCATTCGGTTTTATGAACAGAAAGGG CTGGTGACGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR<sub>E22Q</sub></i>	Este trabajo
CueR(M16-Y19)-Fw	GAGGATCCATATGAATATTAGCGATGTGGCGAAAAAACCG GTTTAAACCGCAAATGATTCGGTACTATGAAGAGAAAGGG CTGGTGACGC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>cueR<sub>A16M-F19Y</sub></i>	Este trabajo
GolS(S14)-Fw	GAGGATCCATATGAACATCGGTAAAGCAGCTAAAGCATCGA AAGTCTCGAGCAAATGATTCGCTACTATGAACAGATTGGT CTGATTCCC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>golS<sub>A14S</sub></i>	Este trabajo
GolS(A16)-Fw	GAGGATCCATATGAACATCGGTAAAGCAGCTAAAGCATCGA AAGTCTCGGCCAAAAGCCATTCGCTACTATGAACAGATTGGT CTGATTCCC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>golS<sub>M16A</sub></i>	Este trabajo
GolS(F19)-Fw	GAGGATCCATATGAACATCGGTAAAGCAGCTAAAGCATCGA AAGTCTCGGCCAAAATGATTCGCTTTTATGAACAGATTGGTC TGATTCCC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>golS<sub>Y19F</sub></i>	Este trabajo
GolS(E22)-Fw	GAGGATCCATATGAACATCGGTAAAGCAGCTAAAGCATCGA AAGTCTCGGCCAAAATGATTCGCTACTATGAAGAGATTGGT CTGATTCCC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>golS<sub>Q22E</sub></i>	Este trabajo
GolS(A16-F19)-Fw	GAGGATCCATATGAACATCGGTAAAGCAGCTAAAGCATCGA AAGTCTCGGCCAAAAGCCATTCGCTTTTATGAACAGATTGGTC TGATTCCC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>golS<sub>M16AY19F</sub></i>	Este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio Restr. 5'	Función	Referencia
CueR <sub>EC</sub> -N-Rv	CGTCGCGGATCGTTAAACAGATTCACCAGCTCGCCGCTCTCT TCCAGGTT		Construcción de <i>cueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub></i>	Este trabajo
CueR-C-Fw	AGAGCGGCGAGCTGGTGAATCTGTTTAAACGATCCGCGACGC CATAGCGCA		Construcción de <i>cueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub></i>	Este trabajo
CueR <sub>EC</sub> -C-Fw	AGTGTGGCGAACTGGTCAATCTGTTTAAACGACCCGCGAGCGG CACAGCGCC		Construcción de <i>cueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub></i>	Este trabajo
STM1265-ORF-Fw	GAGGATCCATATGACTGGTCCGCATCATC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>STM1265</i>	Este trabajo
STM1265-ORF-Rv	CGCAAGCTTGATTATTAAGCAATGACCTTAC	<i>Hind</i> III	Amplificación de <i>STM1265</i>	Este trabajo
STM1266-ORF-Fw	GAGGATCCATATGGCTACTTTTAG	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>STM1266</i>	Este trabajo
STM1266-ORF-Rv	ACCCAAGCTTCAACGTGCGGTGCGCTG	<i>Hind</i> III	Amplificación de <i>STM1266</i>	Este trabajo
STM1265-P1	GATATCCCACATGGCTCTCGTTTTGTTGAGGTGGATATGGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG		Delección del gen <i>STM1265</i>	Este trabajo
STM1265(WT)-P1	TGTAATTTCCCGTGTAAATAGTAAGGTCATTGCTTAATAAGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG		Construcción de <i>STM1265::lacZ-cm</i>	Este trabajo
STM1265-P2	AGAAAGCATAGTGAACCTAAACGCCATCAGAAGCAAATCAC ATATGAATATCCTCCTTA		Delección del gen <i>STM1265</i> y construcción de <i>STM1265::lacZ-cm</i>	Este trabajo
STM1266-P1	ACTATGCTTTCTTACATCATCATGAGGCCAGACAGGCATGGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG		Delección del gen <i>STM1266</i>	Este trabajo
STM1266(WT)-P1	CCATGCAAACGGCTACGAAAAATCAGGCACCGCACGTTGAG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG		Construcción de <i>STM1266::lacZ-cm</i>	Este trabajo
STM1266-P2	GGGGTTTACTCCTCCCTGTTTCGTTAATAATGCAGATGCCCA TATGAATATCCTCCTTA		Delección del gen <i>STM1266</i> y construcción de <i>STM1266::lacZ-cm</i>	Este trabajo
STM1265(int)-P2	AACAAGCATCGCCAAAACATTTCTTTTCATTCGCCGTTAATCA TATGAATATCCTCCTTA		Construcción de $\Delta$ <i>STM1265<sub>5</sub>::km</i>	Este trabajo
STM1264-P1	AATCAATATAAAAAATACCTGCGCCCCGGAGCGATGATGG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG		Delección del gen <i>STM1264</i>	Este trabajo
STM1264-P2	GAACGCCGTTTGCGCAACCTGACAGACGTCTGGGGCATCC ATATGAATATCCTCCTTA		Delección del gen <i>STM1264</i>	Este trabajo
<i>csgD</i> -P1	CAGCTGTCAGATGTGCGATTAAAAAAAGTGGAGTTTCATCG TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG		Construcción de <i>PcsgD::lacZ-cm</i>	Este trabajo
<i>csgD</i> -P2	CTCTGCTGCTACAATCCAGGTCAGATAGCGTTTCATGGCCCA TATGAATATCCTCCTTAG		Construcción de <i>PcsgD::lacZ-cm</i>	Este trabajo
<i>mlrA</i> -P1	CGTCTAAAGTTAAACCGGGACCTCGCGAGCAAGGGTGA AAC GCTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG		Construcción de <i>PmlrA::lacZ-cm</i>	Este trabajo
<i>mlrA</i> -P2	GTTAATAAAAAGGAGTATACATTAAGCGAATTTGTTAGCTTC CATATGAATATCCTCCTTA		Construcción de <i>PmlrA::lacZ-cm</i>	Este trabajo
MlrA-ORF-Fw	GAGGATCCATATGGCGCTTTACAC	<i>Bam</i> HI	Amplificación de <i>mlrA</i>	Este trabajo
MlrA-ORF-Rv	ACCCAAGCTTAAACGCCAAGGGGATG	<i>Hind</i> III	Amplificación de <i>mlrA</i>	Este trabajo
<i>PcopA</i> -Fw	TTTCCCCTTGACCTTAACCTTGCTGGAAGGTTAACCTTT		Anisotropía de fluorescencia	Este trabajo

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio Restr. 5'	Función	Referencia
<i>PcopA</i> -Rv-F	Fluoresceína - AAAGGTAAACCTTCCAGCAAGGTAA GGTCAAGGGGAAA		Anisotropía de fluorescencia	Este trabajo
<i>PgolB</i> -Fw	AAAGGTAAACCTTCCAGCAAGGTAAAGGTCAAGGGGAAA		Anisotropía de fluorescencia	Este trabajo
<i>PgolB</i> -Rv-F	Fluoresceína - GCCAGTCTGGACCTTGCCAGTGTTGGAA GGTCAAGCGTAAT		Anisotropía de fluorescencia	Este trabajo
<i>PcopA/cueR</i> -Fw	GACCCGGGCAAACCGTCCAGGGTCAGG	<i>Xma</i> I	EMSA	(Pérez Audero y col., 2010)
<i>PcopA/cueR</i> -Rv	CTCCCGGTAAACCGTTTTTTTCGC	<i>Xma</i> I	EMSA	(Pérez Audero y col., 2010)
<i>PgolB</i> -Fw	GACCCGGGACGTATCCAGAACATGC	<i>Xma</i> I	EMSA	(Pérez Audero y col., 2010)
<i>PgolB</i> -Rv	TCCCCGGGGCAGCCGCCGAGGTC	<i>Xma</i> I	EMSA	(Pérez Audero y col., 2010)



### 3. EXTRACCIÓN DE ADN

#### 3.1 Extracción de ADN cromosomal

El ADN cromosomal se preparó a partir de células de *S. Typhimurium* 14028s y *E. coli* DH5 $\alpha$ . Se centrifugaron 10 ml de un cultivo saturado de células crecidas en medio LB a 37 °C con agitación constante. Se resuspendieron en 5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA y 150 mM NaCl y se repitió la centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en 5 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 y 25 mM EDTA, se agregaron 550  $\mu$ l de 2 mg/ml lisozima (Sigma), y se incubó 20 minutos a 37 °C. Se agregaron 600  $\mu$ l de una solución de 10 % (p/v) Sarkosyl y 100  $\mu$ g/ml proteasa K (Gibco, Life Technologies) y se incubó a 55 °C durante 1 hora. Luego se agregaron 5 ml de fenol equilibrado con 10 mM Tris-HCl pH 8,0, se mezcló varias veces por inversión, y se centrifugó 5 minutos a 8.000 rpm. Se repitió la extracción con fenol 2 veces más. Se trasvasó la fase acuosa, y se agregaron 5 ml de una mezcla 24:1 (v/v) de cloroformo:alcohol isoamílico. Se centrifugó, se recuperó la fase acuosa y se agregaron 1/9 partes en volumen de 3 M acetato de amonio y 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó a 13.500 rpm durante 10 minutos. Se lavó el precipitado obtenido con 1 ml de 70 % (v/v) etanol, se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en 1 ml de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 y 1 mM EDTA. Se determinó la concentración de ADN midiendo la absorbancia de una alícuota a 260 nm ( $Abs_{260nm}$ ), según la fórmula:

$$1 \text{ unidad de } Abs_{260nm} = 50 \mu\text{g de ADN / ml de solución}$$

(Sambrook y col., 1989).

La calidad de la preparación se evaluó a través del cociente ( $Abs_{260nm}/Abs_{280nm}$ ) (Sambrook y col., 1989).

#### 3.2 Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se preparó a partir de células de *E. coli* XL1-Blue o DH5 $\alpha$  previamente transformadas. Las células fueron crecidas a 37 °C con agitación constante

hasta la saturación del cultivo en 3 ml de medio LB con el agregado del antibiótico adecuado. Se centrifugaron, y se resuspendió el sedimento celular en 350 µl de una solución de 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), y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, y 1 minuto a 100 °C. Posteriormente, el lisado se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico se sometió a extracciones sucesivas con volúmenes iguales de fenol/cloroformo, conservándose la fase acuosa. Dicha solución acuosa se trató con 5 M acetato de amonio (10% del volumen final) e isopropanol (1 volumen), se incubó durante 1 h a -20 °C y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó con 200 µl de una solución de 80 % (v/v) etanol. Se volvió a centrifugar, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se secó a 37 °C. Finalmente el precipitado se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril. La calidad de la preparación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. La solución de ADN obtenida se mantuvo a -20 °C hasta su utilización.

Alternativamente, para obtener ADN plasmídico de mejor calidad, se utilizó un kit comercial (Gen Elute™ HP Plasmid Miniprep Kit - Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Para la amplificación de fragmentos se siguió un protocolo básico consistente de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por una desnaturalización a 94 °C, un anillado entre 50 y 60 °C (dependiendo de las características de los oligonucleótidos) y una elongación a 72 °C o a 68 °C (en reacciones de amplificación con las polimerasas Taq o Pfx, respectivamente). Los tiempos de desnaturalización y anillado fueron de 30 segundos cada uno, y los de elongación dependieron de la longitud de los productos a amplificar (1 minuto por cada 1 kb). Por último, se incluyó una etapa de extensión final a 72 °C (o a 68 °C en el caso de las amplificaciones con Pfx) durante 5 minutos. La reacción se concretó en un termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient).

La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 o 50  $\mu\text{l}$  conteniendo solución tampón de amplificación comercial suplementada con 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  (sólo en el caso de las reacciones de amplificación con Taq) y 0,2 mM de cada uno de los desoxinucleótidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 10 pmoles de cebador directo y reverso, y 1 U de polimerasa Taq (Invitrogen) o Pfx (Invitrogen), dependiendo de la fidelidad necesaria. Los oligonucleótidos cebadores se describen en la **Tabla 3**. Como molde se utilizó 0,025  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico, 0,125  $\mu\text{g}$  de ADN cromosomal o 3  $\mu\text{l}$  provenientes de la suspensión de 1 colonia en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril, previamente hervida durante 5 min (PCR de colonia).

Los productos fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, como se indica en la sección 5.

## 5. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA

El ADN plasmídico, los fragmentos obtenidos por la restricción del mismo y por la reacción en cadena de la polimerasa fueron resueltos mediante electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración, dependiendo del tamaño de los mismos (0,5 % (p/v) de agarosa para fragmentos de mayor tamaño y 1 % (p/v) o 2 % (p/v) de agarosa en el caso de fragmentos más pequeños). Se utilizó el sistema de tipo submarino (Sambrook y col., 1989). La solución tampón TBE 0,5 X (45 mM Tris base, 45 mM ácido bórico y 1 mM EDTA) se utilizó para la preparación de geles y como solución de electroforesis. A estos últimos se les agregó bromuro de etidio en una concentración final de 0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  antes de su gelificación. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,025 % (p/v) azul de bromofenol, 0,025 % (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 (Gibco, Life Technologies). La corrida electroforética se realizó a una intensidad de corriente constante de 50 mA y, una vez finalizada, los fragmentos de ADN se detectaron iluminando el gel con un transiluminador de luz UV (BioRad ChemiDoc<sup>TM</sup> XRS+).

## **6. PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA**

La purificación de fragmentos de ADN obtenidos por PCR o luego de la digestión con enzimas de restricción a partir de geles de agarosa al 0,5-2 % (dependiendo del tamaño del fragmento a purificar) se realizó por adsorción a partículas de sílica-gel (PureLink™ Quick Gel Extraction & PCR Purification COMBO Kit - Invitrogen), según las especificaciones del proveedor. El resultado de la purificación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa de una alícuota de la elución obtenida.

## **7. DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Las condiciones de corte empleadas fueron las recomendadas por los proveedores de las distintas endonucleasas de restricción. Los volúmenes de reacción variaron entre 20  $\mu$ l y 50  $\mu$ l, y los tiempos de incubación para las digestiones plasmídicas fueron de 2-3 hs. Se utilizó aproximadamente 1 U de enzima por  $\mu$ g de ADN. Los resultados de los cortes con enzimas de restricción se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa como se describe en el punto 5, estimando el tamaño de los fragmentos generados con marcadores de peso molecular adecuados.

## **8. TRATAMIENTO DEL VECTOR DIGERIDO CON FOSFATASA ALCALINA**

Para disminuir la cantidad de vector religado en el caso de digestiones plasmídicas con una única enzima de restricción, el vector digerido se incubó con 0,2 U de Fosfatasa Alcalina (Promega) (en la solución tampón 1X correspondiente a la enzima de digestión utilizada) a 37 °C durante 1 hora. Seguidamente, se inactivó la enzima por incubación a 65 °C durante 10 min y se procedió luego a purificar el vector por precipitación con acetato de amonio e isopropanol como se indica en el punto 3.2.

## **9. REACCIÓN DE LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN**

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10-20  $\mu$ l, conteniendo 1 U de ADN ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen), solución tampón de

ligación comercial 1X, y el vector e inserto en una proporción 1:7, respectivamente. Las reacciones se incubaron 12 horas a 16 °C. Luego se inactivó la ADN ligasa por calentamiento a 65 °C durante 10 minutos y se dializó la mezcla de ligación en discos de nitrocelulosa MILLIPORE (tamaño de poro de 0,025 µm) durante 1 h. Finalmente, 5 a 10 µl de mezcla fueron utilizados para transformar células de *E. coli* XL1-Blue o DH5α, o células de *S. Typhimurium* 14028s electro-competentes como se describe en el punto siguiente.

## **10. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* y *S. Typhimurium* CON ADN PLASMÍDICO (ELECTROPORACIÓN)**

### **10.1 Preparación de células competentes**

Se crecieron células en medio LB con agitación permanente a 37 °C hasta saturación del cultivo. Se diluyeron 1,5 ml de cultivo saturado en 150 ml de LB fresco y se crecieron en un erlenmeyer de 500 ml con agitación y a la misma temperatura hasta una DO<sub>630nm</sub> de 0,6-0,7. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 6.500 rpm a 4 °C. El sedimento celular obtenido se lavó 2 veces con 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada estéril fría y 1 vez con 10 ml de 10 % (v/v) glicerol estéril frío. Finalmente, se resuspendió en 300 µl de 10 % (v/v) glicerol estéril frío, y se fraccionaron (40 µl) en tubos estériles, que se guardaron a -80 °C hasta el momento de su utilización.

### **10.2 Transformación física: electroporación. Selección de células transformantes**

A 40 µl de la suspensión de células competentes se les agregó 0,5-1 µl de plásmido o 5-10 µl de mezcla de ligación dializada, y se las colocó en una celda de electroporación previamente enfriada. La mezcla se electroporó empleando un voltaje de 2,5 kV, para lo cual se utilizó un electroporador Bio-Rad. Luego se agregaron 800 µl de medio LB estéril, se transfirió el cultivo a un tubo de ensayo estéril, y se incubó 1 hora a 37 °C (o a 30 °C en el caso de vectores termosensibles) con agitación. Finalmente, se trasvasó todo el cultivo a un tubo eppendorf estéril y se colectaron las

células por centrifugación a 6.500 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en aproximadamente 50 µl de medio LB, los que luego se sembraron con espátula de Drigalsky en una placa de Petri conteniendo LB-agar [1,5 % agar (p/v)] suplementado con el antibiótico adecuado y se incubó a 37 °C (o 30 °C, dependiendo de la termosensibilidad del plásmido) durante toda la noche, para seleccionar las bacterias transformantes.

### 10.3 Verificación del clonado

Los clonados se verificaron mediante PCR de colonia (sección 4) utilizando un oligonucleótido Fw complementario a la región promotora del vector y el oligonucleótido Rv empleado para amplificar el fragmento. En el caso de clonados con una única enzima de restricción, la orientación del inserto se verificó utilizando una combinación de cada uno de los oligonucleótidos empleados en la amplificación del fragmento (Fw o Rv) con el oligonucleótido complementario al vector. Además, se verificó la presencia del inserto mediante preparación de ADN plasmídico (como se indica en el apartado 3.2), digestión del plásmido con la misma endonucleasa empleada para clonar el inserto (sección 7) y posterior resolución de los fragmentos escindidos mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 5).

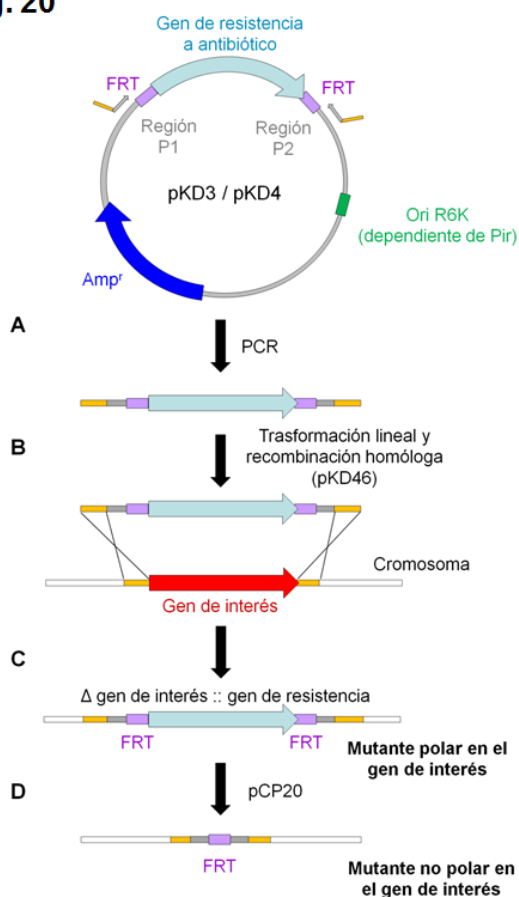
## 11. TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* y *S. Typhimurium* CON ADN LINEAL (ELECTROPORACIÓN). CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES CROMOSOMALES

En la **Figura 20** se esquematiza el método empleado para la obtención de mutantes polares y no polares de *E. coli* y *S. Typhimurium* desarrollado por Datsenko y colaboradores (Datsenko y Wanner, 2000). Este método se basa en la recombinación de fragmentos pequeños de ADN mediado por el sistema red del fago  $\lambda$ , luego de la transformación de las células con ADN lineal. Los fragmentos de ADN lineal se obtuvieron por amplificación por PCR de un cassette de resistencia a Cm o a Km flanqueado por los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica FLP (FRT), utilizando oligonucleótidos con extremos 5' homólogos al gen a mutar y extremos 3' que hibridan con los sitios FRT de los plásmidos molde pKD3 (Cm<sup>r</sup>) o

pKD4 (Km<sup>r</sup>) (Datsenko y Wanner, 2000) (**Fig. 20**). Con estos fragmentos se transformaron células de *Salmonella* 7065/pKD46 electrocompetentes. El plásmido pKD46 (Datsenko y Wanner, 2000) es termosensible, y presenta los genes *gam*, *bet* y *exo* del fago  $\lambda$  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. La preparación de células 7065/pKD46 competentes se llevó a cabo de acuerdo al punto 10, excepto que los cultivos fueron crecidos a 30 °C y con el agregado de 20 mM arabinosa (concentración final). La electroporación se realizó con 7  $\mu$ l de producto de PCR purificado y concentrado por precipitación con acetato de amonio e isopropanol (como se detalla en el punto 3.2). Previo a la selección, se incubó 1 hora a 30 °C con agitación en 800  $\mu$ l de LB (para contribuir a la inserción lineal del fragmento al cromosoma) y luego 3 horas a 37 °C con agitación (para curar las células del plásmido termosensible pKD46). La selección de las células transformantes se realizó plaqueando las mismas en medio LB-agar suplementado con la mitad de la concentración convencional de antibiótico, y posterior réplica de las colonias resistentes en placas LB-agar en presencia del antibiótico en la concentración final correspondiente. La presencia de la mutación deseada en las células transformantes fue confirmada por PCR a partir de colonia (punto 4). Finalmente, la mutación obtenida fue transferida a la cepa silvestre 14028s mediante transducción con el bacteriófago P22 HT, o a la cepa de *E. coli* correspondiente por transducción con el bacteriófago P1 (secciones 13 y 14, respectivamente).

La inserción en un operón del cassette de Cm<sup>r</sup> en orientación contraria a la del gen mutado provocó en todos los casos estudiados un efecto polar sobre los genes corriente abajo. Para obtener mutaciones no polares, se delecionó el cassette de resistencia al antibiótico mediante la acción de la recombinasa específica FLP sobre sus sitios blanco FRT. Para ello se transformó la cepa 14028s conteniendo la mutación polar Cm<sup>r</sup> con el plásmido termosensible pCP20 (Amp<sup>r</sup>) (sección 10), que presenta el gen que codifica para FLP inducible por un aumento en la temperatura (Datsenko y Wanner, 2000). Se seleccionaron colonias Amp<sup>r</sup> a 30 °C, y luego se repicaron en LB-agar a 42 °C para inducir la expresión de la recombinasa y evitar la replicación del plásmido que, de esta manera, se pierde. Se seleccionaron las mutantes deseadas por contraselección en placas conteniendo Cm o Amp como células sensibles dichos antibióticos (**Fig. 20**).

Fig. 20



**Fig. 20: Obtención de mutantes cromosomales en *S. Typhimurium* y *E. coli*.** En la figura se esquematiza el método descrito por Datsenko para la obtención de mutantes cromosomales polares y no polares (Datsenko y Wanner, 2000). **A.** Se genera por PCR un fragmento de ADN lineal que contiene el gen de resistencia a Cm o Km (celeste), utilizando como molde al plásmido pKD3 o pKD4, respectivamente. Los cebadores utilizados hibridan con regiones P1 y P2 idénticas entre estos vectores (gris) que flanquean al gen de resistencia y a los sitios FRT (violeta). Además, estos cebadores presentan secuencias homólogas a las regiones 5' o 3' del gen que se quiere deletar (naranja). **B.** Se transforma con el fragmento de ADN obtenido una cepa de *Salmonella* o *E. coli* que expresa los genes del sistema de recombinación  $\lambda$  Red codificados en el plásmido pKD46. **C.** Se seleccionan aquellas cepas que han intercambiado el gen a deletar por el gen de resistencia a antibiótico (mutante polar en el gen de interés). **D.** Este último puede ser a su vez escindido mediante acción de la recombinasa FLP que actúa específicamente sobre las secuencias FRT. Para ello se transforma a las mutantes obtenidas en (C) con el plásmido pCP20, que expresa el gen de la recombinasa FLP. Finalmente, se verifica la pérdida de la resistencia (mutante no polar en el gen de interés).

## 12. CONSTRUCCIÓN DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES CROMOSOMALES A *lacZY*

Para la obtención de mutantes cromosomales por inserción del gen reportero *lacZ* corriente abajo de la secuencia promotora de interés (fusión transcripcional), se empleó el método de transformación lineal descrito para la construcción de mutantes cromosomales (Datsenko y Wanner, 2000 – sección 11), sólo que, en este caso, los fragmentos de ADN lineales se obtuvieron por reacción de PCR empleando como molde el vector pJB20, que codifica para los genes *lacZY* (carente de secuencias regulatorias propias) y el cassette de Cm, flanqueado por los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica FLP (FRT) (Fig. 21). Para la construcción de cepas reporteras en las cuales la inserción del gen reportero reemplazó el marco de lectura abierto situado corriente debajo de la secuencia promotora de interés, se utilizaron los mismos oligonucleótidos que los diseñados para deletar dicho gen (sección 11). En el caso de inserciones transcripcionales corriente abajo del gen de



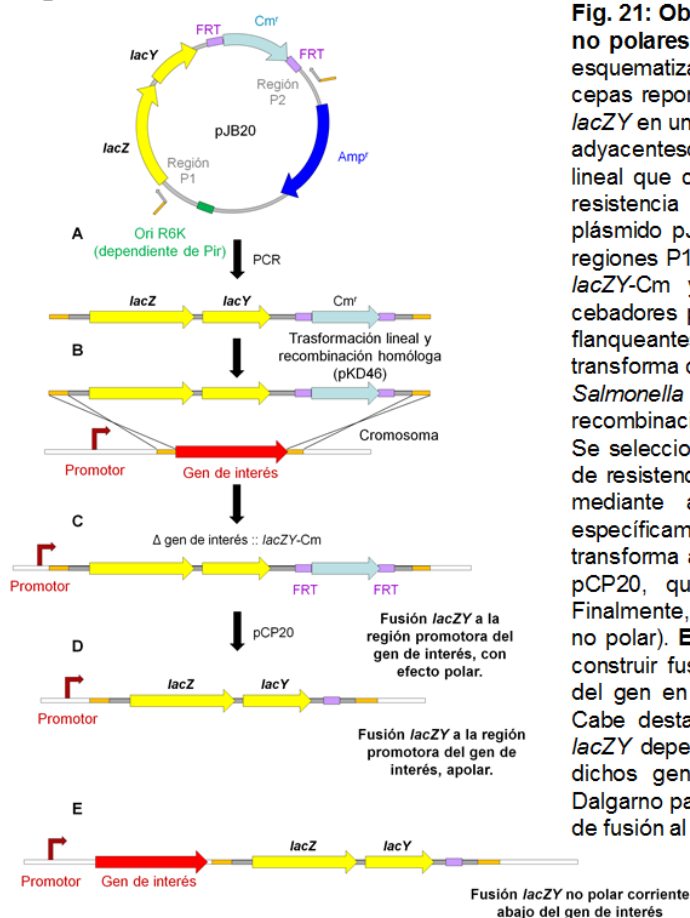
interés, manteniendo la integridad del mismo, se empleó un oligonucleótido Fw con extremo 5' homólogo a la región 3' del gen y extremo 3' que hibrida con el primer sitio FRT del plásmido. El oligonucleótido Rv fue el mismo que el utilizado para delecionar el gen (sección 11).

En el caso de la construcción de mutantes reporteras apolares, el cassette de Cm fue escindido por la acción de FLP presente en el vector pCP20 de manera similar a lo descrito en el punto 11. De esta manera, se pueden generar fusiones transcripcionales que no afectan a los genes corriente abajo al gen en estudio.

La selección de las células transformantes se llevó a cabo como se describe en la sección 11, pero en este caso las placas de Petri se suplementaron, además, con el cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal), sustrato de la actividad  $\beta$ -galactosidasa codificada por el gen *lacZ*, a una concentración final de 0,12 mg/ml. Una reacción positiva de actividad  $\beta$ -galactosidasa genera colonias de color azul en el medio sólido.

La inserción del cassette *lacZY*-Cm en las células transformantes fue confirmada por PCR a partir de colonia (punto 4), con un oligonucleótido Fw complementario a la región promotora de interés y otro Rv que hibrida al inicio del gen *lacZ*. Finalmente, la mutación obtenida fue transferida a la cepa salvaje 14028s mediante transducción con el bacteriófago P22 HT (sección 13).

Fig. 21



**Fig. 21: Obtención de fusiones transcripcionales a *lacZY* no polares en *S. Typhimurium* y *E. coli*.** En la figura se esquematiza el método utilizado para la construcción de cepas reporteras portadoras de una fusión transcripcional a *lacZY* en un gen de interés sin afectar la expresión de genes adyacentes. **A.** Se genera por PCR un fragmento de ADN lineal que contiene los genes *lacZY* (amarillo) y el gen de resistencia a Cm (celeste), utilizando como molde al plásmido pJB20. Los cebadores utilizados hibridan con las regiones P1 y P2 del vector (gris) que flanquean a los genes *lacZY*-Cm y a los sitios FRT (violeta). Además, estos cebadores presentan secuencias homólogas a las regiones flanqueantes 5' o 3' del gen en estudio (naranja). **B.** Se transforma con el fragmento de ADN obtenido a una cepa de *Salmonella* o *E. coli* que expresa los genes del sistema de recombinación  $\lambda$  Red codificados en el plásmido pKD46. **C.** Se seleccionan aquellas cepas que han incorporado el gen de resistencia. **D.** Este último puede ser a su vez escindido mediante acción de la recombinasa FLP que actúa específicamente sobre las secuencias FRT. Para ello se transforma a las mutantes obtenidas en (C) con el plásmido pCP20, que expresa el gen de la recombinasa FLP. Finalmente, se verifica la pérdida de la resistencia (mutante no polar). **E.** Este método también puede ser utilizado para construir fusiones transcripcionales a *lacZY* corriente abajo del gen en estudio, manteniendo la integridad del mismo. Cabe destacar que si bien la transcripción de los genes *lacZY* depende de la región promotora del gen de interés, dichos genes conservan su propia secuencia de Shine Dalgarno para la traducción, por lo que no generan proteínas de fusión al gen en estudio.

### 13. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON BACTERIÓFAGO P22

#### 13.1 Obtención de lisados de la cepa dadora en medio semisólido

Para transferir plásmidos e inserciones o deleciones cromosomales de la cepa de *Salmonella* 7065 a la cepa silvestre 14028s, a cepas de *Salmonella* mutantes, o entre mutantes (para combinar mutaciones en una única cepa), se obtuvieron en primer lugar los lisados de las cepas dadoras correspondientes. Para ello se tomaron 100  $\mu$ l de un cultivo saturado de la cepa dadora y se lo incubó con 100  $\mu$ l de una dilución  $10^{-3}$  de la suspensión de fagos P22 HT crecidos en la cepa salvaje 14028s. Luego se agregaron 3 ml de medio LB semisólido [0,6 % (p/v) agar] fundido a 42  $^{\circ}$ C, se agitó vigorosamente y se distribuyó la mezcla sobre placas de Petri con medio de cultivo LB sólido. Las placas fueron incubadas 3-5 horas a 37  $^{\circ}$ C hasta observar placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro. Para recoger el lisado se agregó a la placa 5 ml de medio LB líquido y, con ayuda de una espátula de Drigalsky, se recogió la mezcla de LB semisólido, bacterias y fagos. A esta mezcla se la trató con 200  $\mu$ l de cloroformo

para completar la lisis celular y se la centrifugó 5 min a 8.000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4 °C hasta el momento de su uso (Davis y col., 1980).

### 13.2 Obtención de lisados de la cepa dadora en medio líquido

Alternativamente a la obtención de lisados en medio semisólido, la aplicación de esta técnica en medio líquido también permitió la transferencia por transducción de plásmidos y mutaciones cromosomales entre cepas de *Salmonella*, pero con un mayor título final de fagos que el obtenido a través de la técnica descrita en el punto 13.1. Para ello se centrifugó 1 ml de cultivo ON (crecido durante toda la noche) de la cepa dadora correspondiente durante 5 minutos a 5.000 rpm y se resuspendió el pellet en 5 ml de medio Nutrient Broth (NB) (sección 2) suplementado con 0,05 ml de Sales E 50 X (10 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 100 g/l Ácido cítrico. $\text{H}_2\text{O}$ ; 655 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 175 g/l  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 3 mg/l  $\text{CHCl}_3$ ), 0,05 ml de glucosa 20 % (p/v) y  $5 \cdot 10^7$  ufp/ml de fago P22 HT. Tras una incubación de 6 hs a 37 °C sin agitación, se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se centrifugó durante 10 min a 8.000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4 °C hasta el momento de su uso.

### 13.3 Transducción generalizada

Una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de un cultivo saturado de la cepa receptora se incubó durante 1 hora a 37 °C sin agitación con igual volumen de un lisado de P22 HT proveniente de la cepa dadora (Davis y col., 1980 - ver apartados 13.1-2). La mezcla se suplementó con 0,05 ml de Sales E 50 X (10 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 g/l ácido cítrico. $\text{H}_2\text{O}$ , 655 g/l  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 175 g/l  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 3 ml/l  $\text{CHCl}_3$ ). Se utilizaron como controles mezclas en las cuales se reemplazaron bacterias o fagos por LB estéril. 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. En el caso de transducciones de cassettes de resistencia cromosomales, el plaqueo de las transductantes se realizó en placas LB-agar con 1 mM EGTA, suplementadas con

la mitad de la concentración convencional del antibiótico adecuado, y posterior repicado de las mismas en placas LB-agar con 1 mM EGTA y el antibiótico en la concentración final correspondiente. Para transducciones del gen reportero *lacZY-Cm*, las placas se suplementaron, además, con 0,12 mg/ml X-Gal.

## 14. TRANSDUCCIÓN GENERALIZADA CON BACTERIÓFAGO P1

### 14.1 Obtención de lisados de la cepa dadora en medio semisólido

Para transferir por transducción generalizada mutaciones cromosomales entre diferentes cepas de *E. coli*, se obtuvieron los lisados de las correspondientes cepas dadoras en medio semisólido. Para ello, se inocularon 100  $\mu$ l de un cultivo saturado en medio LB en 900  $\mu$ l de medio LB fresco ( $V_f = 1$  ml) y se lo incubó 1 hora a 37 °C con agitación. Transcurrido ese tiempo de incubación, se le agregó 2,5  $\mu$ l  $\text{CaCl}_2$  2M ( $C_f = 5$  mM) y 100  $\mu$ l de una dilución  $10^{-3}$  de la suspensión de fagos P1 crecidos en la cepa salvaje de *E. coli* W3110. La mezcla se incubó sin agitación durante 20 min. Se le agregó luego 4 ml de LB semisólido [0,6 % (p/v) agar] fundido a 42 °C, suplementado con 10  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  2M y se lo vertió sobre una placa de Petri con LB-agar. Las placas fueron incubadas 5-8 horas a 37 °C hasta observar placas de lisis de aproximadamente 1 mm de diámetro. Para recoger el lisado se agregó a la placa 5 ml de medio LB líquido y, con ayuda de una espátula de Drigalsky, se recogió la mezcla de LB semisólido, bacterias y fagos. A esta mezcla se la trató con 200  $\mu$ l de cloroformo para completar la lisis celular y se la centrifugó 5 min a 8.000 rpm. El sobrenadante obtenido, que contiene la suspensión de fagos, se conservó con cloroformo a 4 °C hasta el momento de su uso.

### 14.2 Transducción generalizada

Para transducir la mutación cromosomal de una cepa dadora de *E. coli* a otra receptora, 1 ml de cultivo saturado de la cepa receptora crecida en medio LB se centrifugó a 7.500 rpm durante 5 min, y el sedimento celular se resuspendió en igual volumen de una solución MC (100 mM  $\text{MgSO}_4$  y 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ). 100  $\mu$ l de estas células se mezclaron con 100  $\mu$ l de lisado P1 (apartado 14.1) y se incubó la mezcla durante 20

min a 30 °C (sin agitación). Se utilizaron como controles mezclas en las cuales se reemplazaron bacterias o fagos por LB estéril, según corresponda. Transcurrido dicho período de incubación, se suplementó la mezcla con 20 µl de citrato de sodio 1 M y 1 ml de medio LB fresco. Se incubó por 3 horas a 30 °C con agitación y se colectaron luego las células por centrifugación a 7.500 rpm durante 5 min. Todo el sedimento celular se resuspendió en aproximadamente 50 µl de LB y se seleccionaron las células transductantes como se indica en el apartado 13.3.

## 15. ENSAYOS DE ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA

### 15.1 En medio sólido: análisis cualitativo

Para una primera determinación de la actividad β-galactosidasa de fusiones transcripcionales a *lacZY* se crecieron las distintas cepas a analizar en placas con medio LB sólido suplementado con el antibiótico correspondiente y X-Gal en una concentración final de 0,12 mg/ml. El indicador X-Gal (sustrato de la actividad β-galactosidasa) se preparó a una concentración de 20 mg/ml en N-N-dimetilformamida. Ante la presencia de actividad se observaron colonias de color azul.

### 15.2 En medio líquido: análisis cuantitativo

Las medidas de actividad β-galactosidasa de cepas portadoras de distintas fusiones transcripcionales a los genes *lacZY* se realizaron siguiendo una modificación del protocolo propuesto por Miller (Miller, 1972).

Se creció un cultivo de la cepa a analizar en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, según la cepa, hasta fase estacionaria en presencia de 10 µM AuHCl<sub>4</sub>, 1 mM CuSO<sub>4</sub> (o 100 µM CuSO<sub>4</sub> en el caso de mutantes  $\Delta copA$ ) o en ausencia de metal, se tomó una alícuota de 200 µl del cultivo y se le determinó la densidad celular por medidas de absorbancia a 630 nm. Para el ensayo de actividad, se agregaron 30 µl del cultivo (30 µl de una dilución 1/100 de cultivo para el caso de las fusiones transcripcionales plasmídicas) al medio de reacción, que contenía 275 µl de una solución reguladora Z (16,1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 5,5 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O; 0,75 g/l KCl; 0,246 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,27 % (v/v) β-mercaptoetanol), 24 µl de cloroformo, y

14  $\mu\text{l}$  de SDS 0,1 % (p/v). La mezcla se agitó vigorosamente por 10 segundos. La reacción se llevó a cabo a 30 °C y se inició con el agregado de 60  $\mu\text{l}$  del reactivo o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml a cada tubo, se mezclaron los reactivos y se incubó en un baño a 30 °C hasta observar coloración amarilla. La reacción colorimétrica se detuvo con el agregado de 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. Se registró el tiempo de reacción, y se determinó la absorbancia de las muestras a 405 nm utilizando un lector de microplacas BioTek EL $\chi$ 808. Cada reacción se procesó por duplicado y como blanco de reacción se utilizó un tubo al que se le agregó 30  $\mu\text{l}$  de LB en lugar de cultivo. La actividad enzimática se calculó según la fórmula que se describe a continuación, donde  $\text{DO}_{405\text{nm}1}$  y  $\text{DO}_{405\text{nm}2}$  corresponden a la absorbancia registrada para cada reacción y su duplicado, a la longitud de onda 405 nm, proporcional a la concentración del producto formado. El valor de actividad  $\beta$ -galactosidasa calculado se multiplicó por el factor de dilución, según corresponda.

$$\text{Act (Unidades Miller)} = \frac{(\text{DO}_{405\text{nm}1} + \text{DO}_{405\text{nm}2})}{2 \times \text{DO}_{630\text{nm}} \times \Delta t} \times 10000$$

## 16. CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN pCueR, pGolS y sus respectivas mutantes quimeras y puntuales

### 16.1 Construcción de los alelos silvestres *cueR* y *golS*

Inicialmente, se amplificaron por PCR los marcos de lectura abiertos (ORFs) para los reguladores silvestres CueR (Espariz y col., 2007) y GolS (Checa y col., 2007) a partir de ADN cromosomal de *Salmonella* 14028s y los oligonucleótidos CueR-ORF-Fw / CueR-ORF-Rv o GolS-ORF-Fw / GolS-ORF-Rv, respectivamente. Estos oligonucleótidos contienen los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI (oligonucleótidos Fw) o *Hind*III (oligonucleótidos Rv), necesarios para el clonado de estos productos de PCR en un vector de expresión adecuado.

### 16.2 Construcción de alelos híbridos *cueR-N<sub>S</sub>*, *cueR-HTH1<sub>S</sub>*, *cueR-(HTH1+L)<sub>S</sub>* y *golS-N<sub>R</sub>*

La construcción de los alelos quiméricos *cueR-N<sub>S</sub>*, *golS-N<sub>R</sub>*, *cueR-HTH1<sub>S</sub>* y *cueR-(HTH1+L)<sub>S</sub>* se llevó a cabo mediante la técnica de mutagénesis por SOE-PCR (Aiyar y col., 1996; Heckman y Pease, 2007). Brevemente, para cada construcción se realizaron dos reacciones de PCR independientes usando los cebadores complementarios a la región híbrida de interés y los cebadores homólogos a los extremos 5' y 3' de los genes *cueR* o *golS* silvestres. Estos últimos contienen los sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI (oligonucleótidos Fw) o *Hind*III (oligonucleótidos Rv). En todos los casos, se utilizó ADN genómico de *Salmonella* 14028s como molde. Los productos de las dos reacciones de PCR se purificaron para ser luego combinados y empleados como molde en una tercera reacción de PCR con los cebadores Fw y Rv apropiados para generar el producto final (**Fig. 22 A-E**).

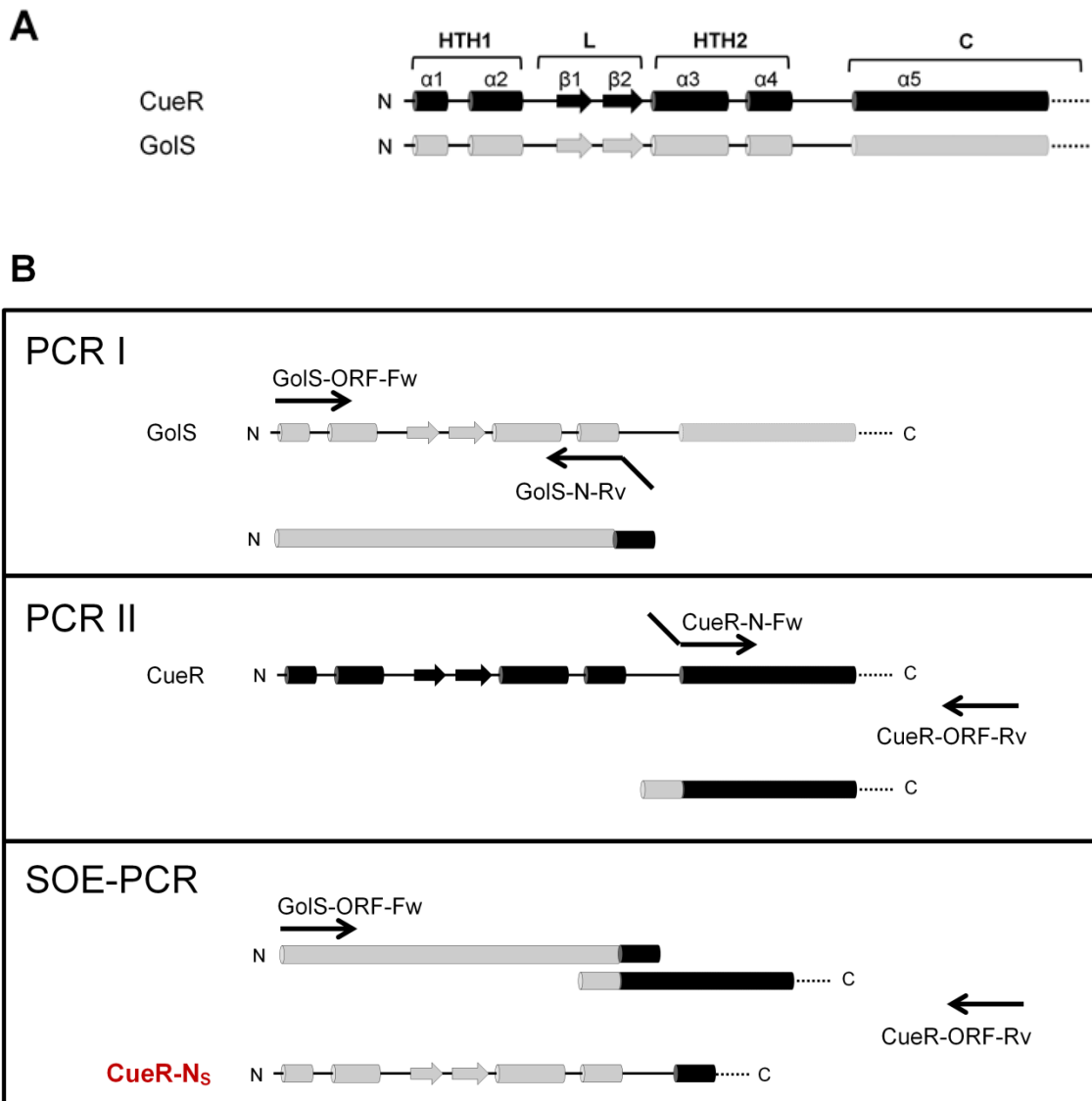
### 16.3 Construcción de alelos híbridos *cueR-(L+HTH2)<sub>S</sub>* y *cueR-HTH2<sub>S</sub>*

Para construir los alelos quiméricos *cueR-(L+HTH2)<sub>S</sub>* y *cueR-HTH2<sub>S</sub>*, se amplificó inicialmente de ADN genómico de *Salmonella* 14028s un primer producto de PCR utilizando los pares de cebadores *GolS-Loop-Fw* / *GolS-HTH2-Rv* o *GolS-HTH2-Fw* / *GolS-HTH2-Rv*, respectivamente. Cada producto fue purificado y empleado como cebador (megaprimer) en dos reacciones de PCR independientes, junto con los oligonucleótidos *CueR-ORF-Fw* o *CueR-ORF-Rv* para generar los fragmentos solapantes que, finalmente, fueron purificados, combinados y empleados como molde en una reacción final de SOE-PCR, como se describe en la sección 16.2 (**Fig. 22 F-G**).

### 16.4 Construcción de alelos híbridos *cueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub>*, *golS- $\alpha$ 2<sub>R</sub>* y mutantes puntuales

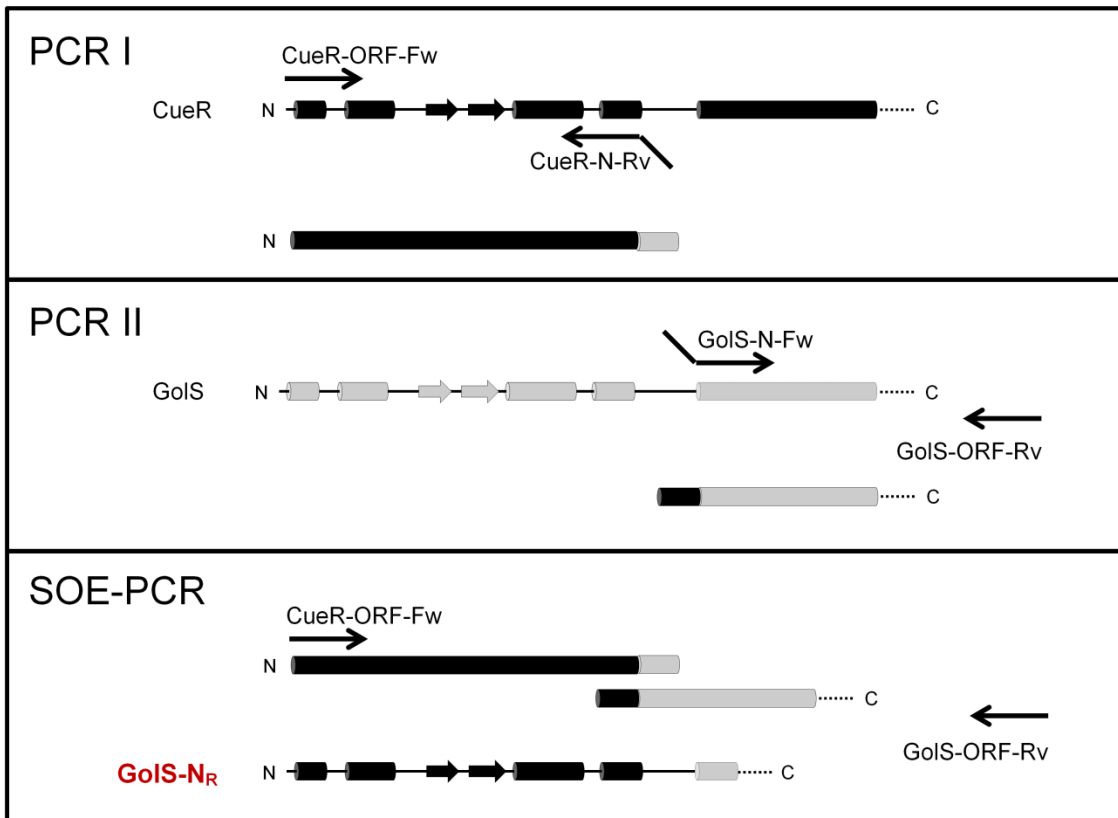
Los alelos híbridos *cueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub>* (**Fig. 22-H**) y *golS- $\alpha$ 2<sub>R</sub>* (**Fig. 22-I**), así como también los alelos mutantes puntuales en los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 14, 16, 19 y 22, todos situados en la región de la hélice- $\alpha$ 2 del regulador (**Fig. 22 J**), fueron amplificados en una única reacción de PCR utilizando los cebadores Fw con la correspondiente modificación y el sitio de restricción *Bam*HI, junto con el oligonucleótido Rv apropiado (**Fig. 22-J** - se muestran a modo de ejemplo sólo las mutantes puntuales en los residuos de aminoácidos 16 y/o 19).

Fig. 22

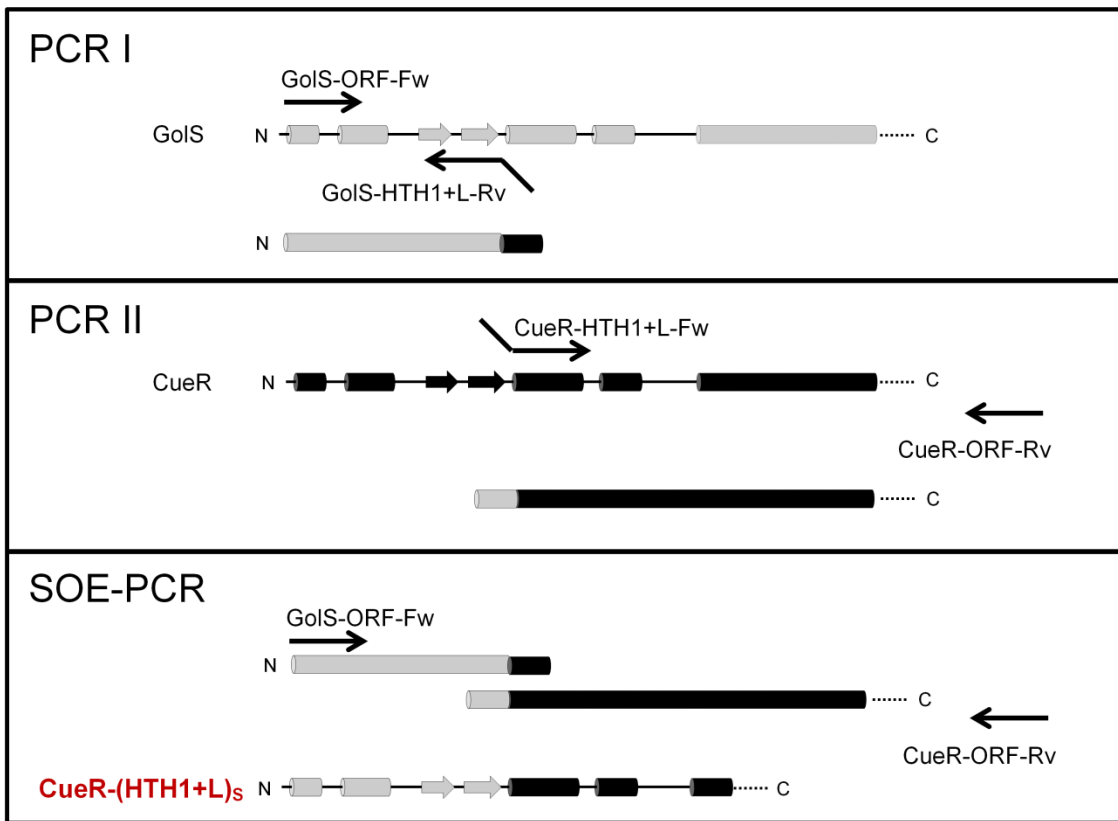




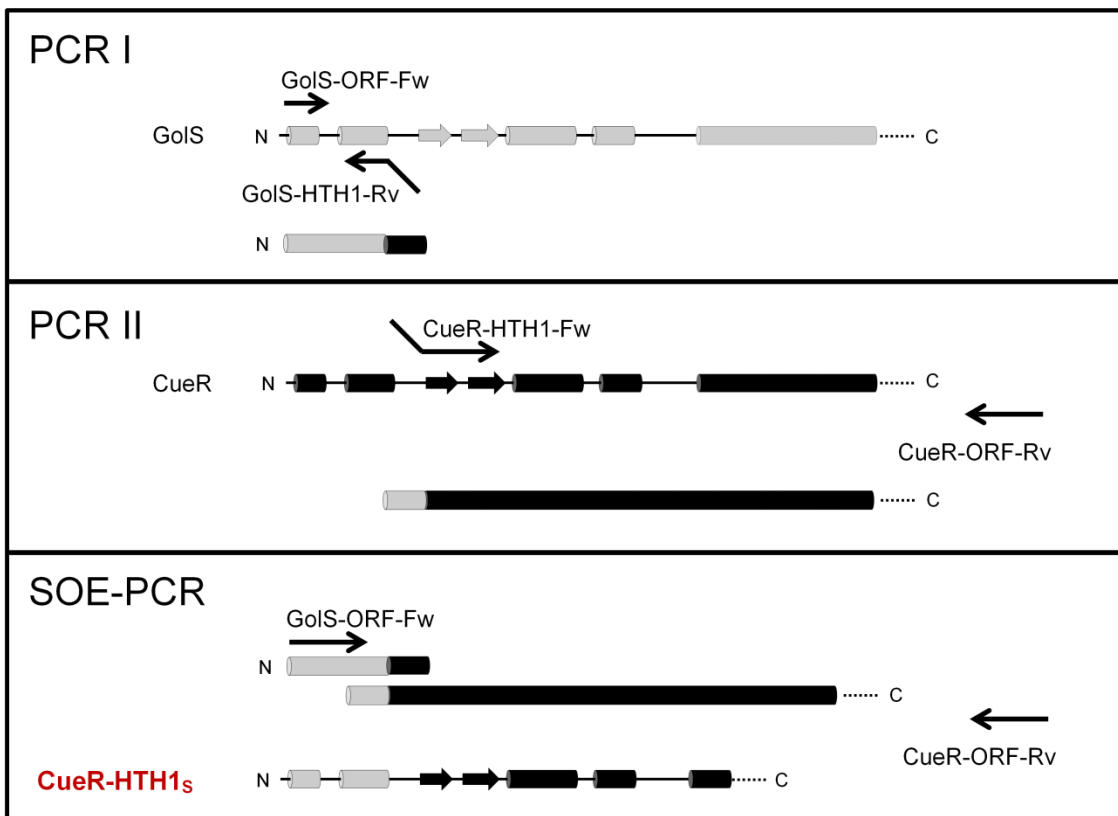
C



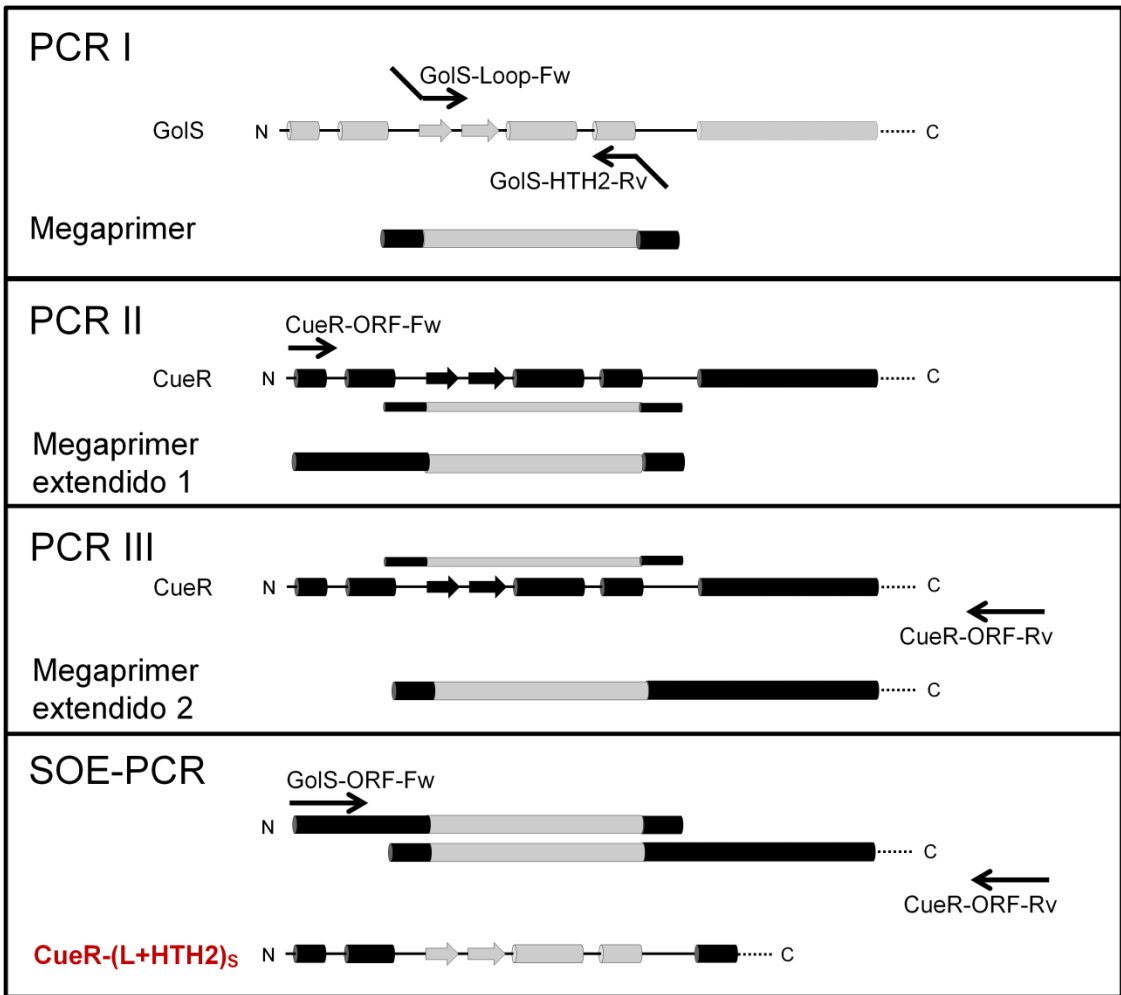
D



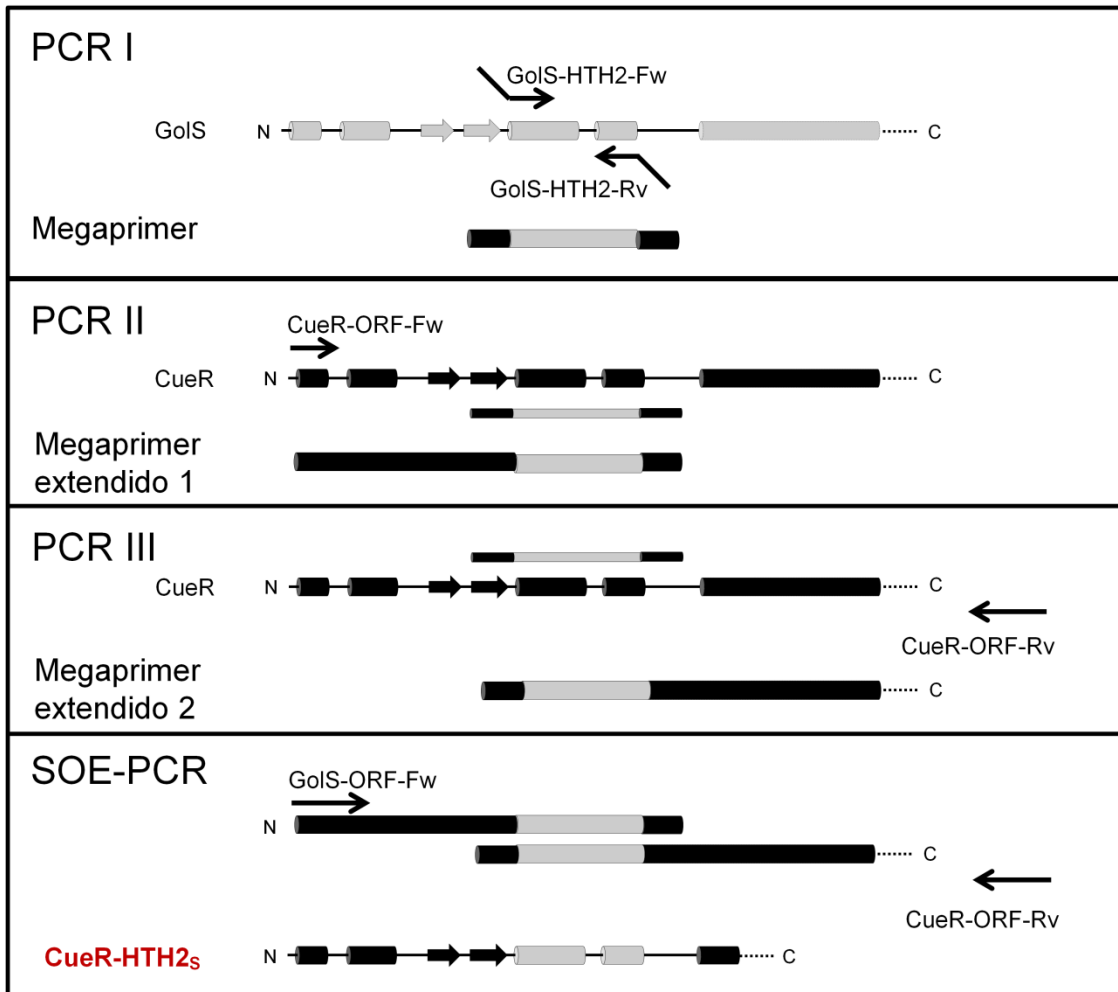
E



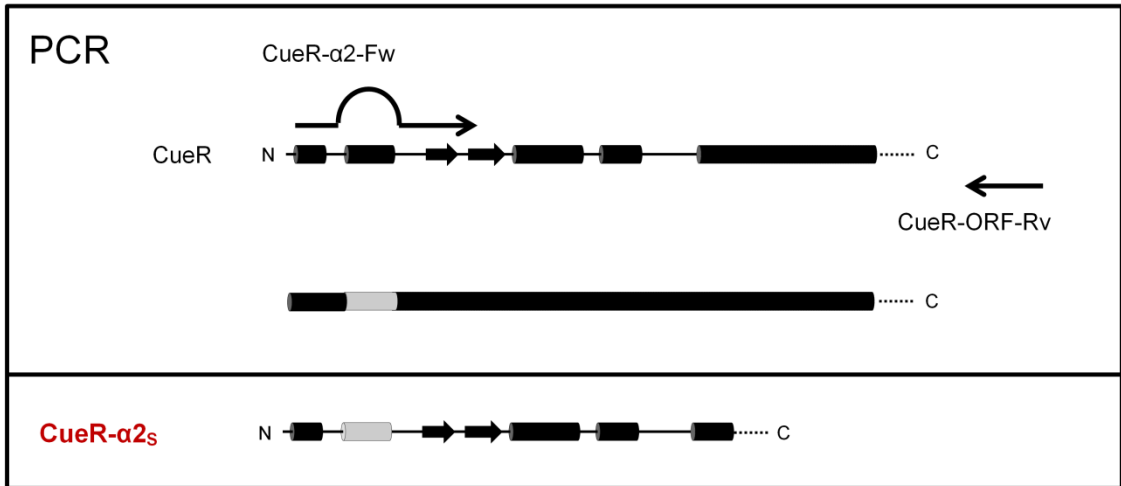
**F**



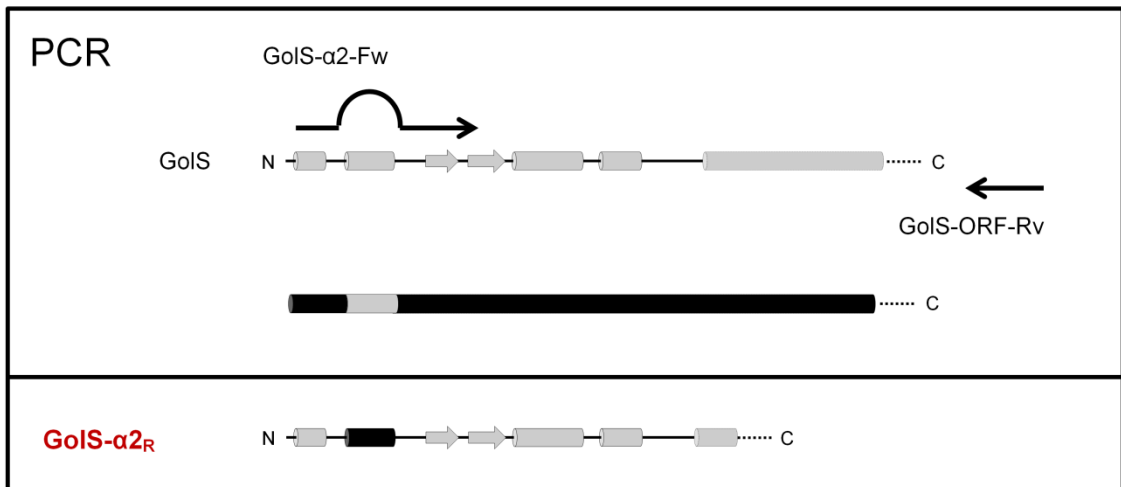
**G**



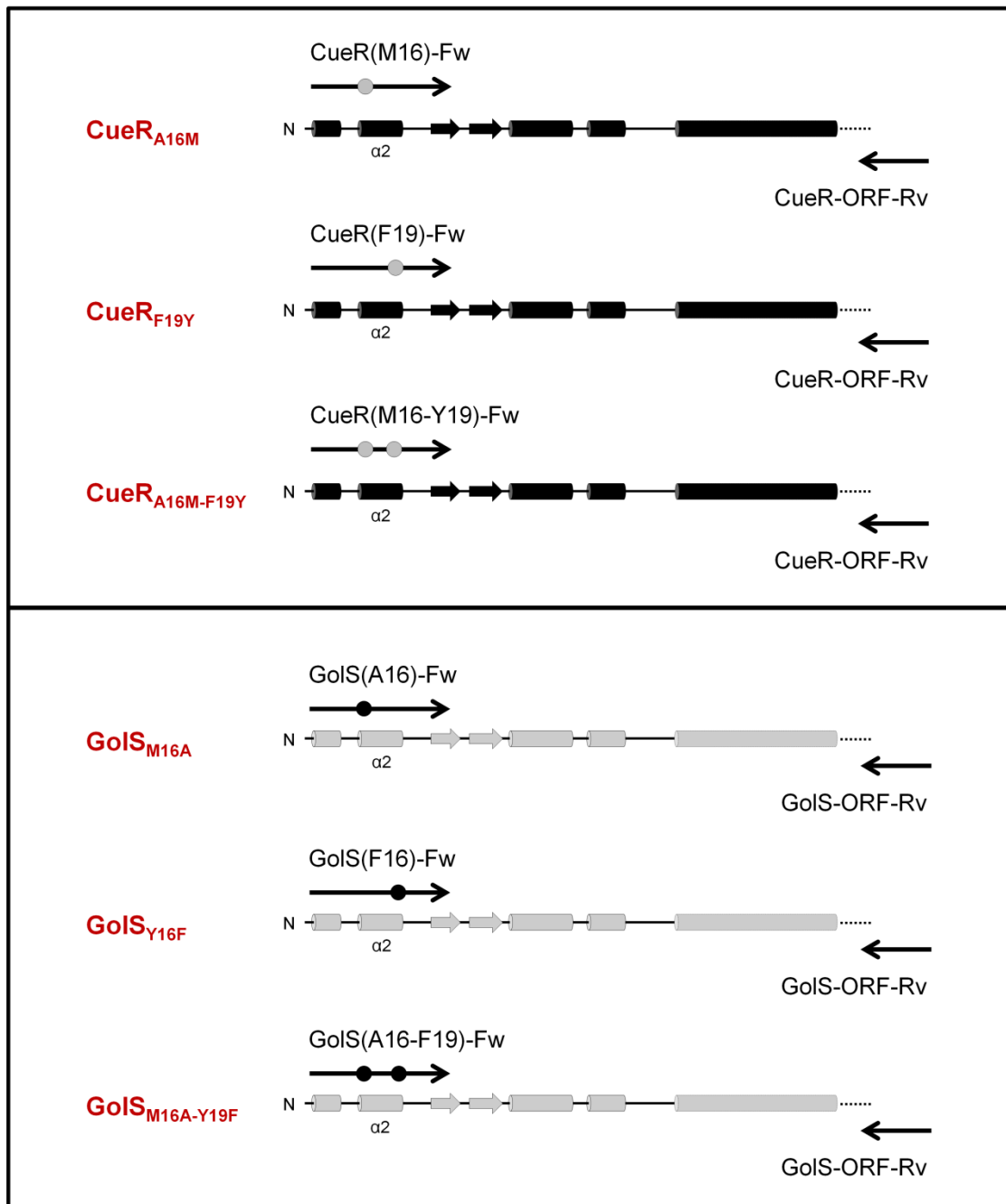
H



I



J



**Fig. 22: Estrategias utilizadas para generar los reguladores quiméricos y mutantes puntuales de *S. Typhimurium*.** En la figura A se esquematiza la estructura secundaria de los reguladores silvestres CueR y GolS. En las figuras B-E se esquematizan los pasos a seguir para la amplificación por SOE-PCR de los reguladores quiméricos CueR-N<sub>S</sub> (B), GolS-N<sub>R</sub> (C), CueR-(HTH1+L)<sub>S</sub> (D) y CueR-HTH1<sub>S</sub> (E). La estrategia implica dos rondas de PCR (PCR I y PCR II), cuyos productos de amplificación se purifican y combinan luego para ser empleados como molde en una tercera reacción de amplificación (SOE-PCR). En las figuras F y G se esquematizan las estrategias utilizadas para la construcción de los reguladores quiméricos CueR-(L+HTH2)<sub>S</sub> y CueR-HTH2<sub>S</sub>, respectivamente, por combinación de las técnicas de extensión del megaprimer y SOE-PCR. La estrategia consiste en una primera reacción de PCR para generar un megaprimer que es luego extendido hacia los extremos 5' y 3' del regulador, como se detalla en las figuras indicadas. Finalmente, estos dos productos extendidos se combinan y utilizan como molde en una última reacción de SOE-PCR. Los reguladores mutantes CueR-α2<sub>S</sub> (H) y GolS-α2<sub>R</sub> (I) se construyeron mediante una única reacción de PCR empleando un oligonucleótido Fw codificante para la región de la hélice-α2 correspondiente en cada caso. Los reguladores mutantes puntuales simples y múltiples (J) también se generaron como producto de una única reacción de amplificación de PCR, para la cual se utilizaron oligonucleótidos Fw portadores de la/s mutación/es puntuales. En todos los casos, los oligonucleótidos Fw y Rv complementarios a los extremos 5' y 3' de los genes silvestres contienen los sitios de restricción *Bam*HI y *Hind*III, respectivamente, que se utilizaron luego para el clonado de los diferentes reguladores mutantes en los vectores de expresión pUH21-2/aq<sup>19</sup> o pSU36.

### 16.5 Construcción de alelos híbridos *cueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub>* y *cueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub>*

La construcción de los alelos quiméricos *cueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub>* y *cueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub>* se llevó a cabo mediante la técnica de mutagénesis por SOE-PCR (Aiyar y col., 1996; Heckman y Pease, 2007), como fue anteriormente descrito para *cueR-N<sub>S</sub>* y *golS-N<sub>R</sub>* (sección 16.2), pero empleando como molde los genes *cueR<sub>EC</sub>* y *cueR<sub>STM</sub>* silvestres como molde.

### 16.6 Clonado de los alelos silvestres, híbridos y mutantes puntuales en vectores de expresión

Los fragmentos finales de PCR (secciones 16.1-5) fueron purificados, digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (sección 7), e individualmente clonados (sección 9) en los vectores de expresión pUH21-2*laqI*<sup>q</sup> o pSU36, previamente linealizados con el mismo par de enzimas de restricción. Con la mezcla de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* XL1-Blue (sección 10) y se seleccionaron las transformantes en placas de LB-agar [1,5 % agar (p/v)] suplementadas con el antibiótico correspondiente. La presencia del inserto se verificó por PCR a partir de colonias (sección 4) y análisis por restricción (sección 7) utilizando las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Se realizaron luego extracciones plasmídicas (sección 3) de cada una de las mutantes para transformar células competentes de *E. coli* W3110  $\Delta$ *lacZ*  $\Delta$ *copA* *cueR::cm* (secciones 10 y 11) portadoras de los vectores reporteros pMC1871::*PcopA* o pMC1871::*PgolB*, o a células competentes de *Salmonella* 14028s. A partir de esta última, se hicieron lisados con fago P22 (sección 13) y transdujeron a una cepa mutante de *Salmonella*  $\Delta$ *gol*  $\Delta$ *gesABC*  $\Delta$ *cueP*  $\Delta$ *copA* *cueR::cm* (sección 11), la que fue previamente transformada con los vectores reporteros pMC1871::*PcopA* o pMC1871::*PgolB*.

Los vectores reporteros pMC1871::*PcopA* y pMC1871::*PgolB* presentan fusiones transcripcionales a *lacZY* a las regiones promotoras *PcopA* y *PgolB*, reguladas por CueR o GolS, respectivamente (Pérez Audero y col., 2010).

## 17. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CueR, CueR- $\alpha_2$ S, GolS y GolS- $\alpha_2$ R NATIVAS

Las cepas de *E. coli* XL1-blue pGolS (PB3623) y pGolS- $\alpha_2$ R (PB8805) fueron crecidas en LB suplementado con Amp, con agitación constante a 37 °C hasta saturación del cultivo. Luego se diluyeron 1/50 en 300 ml de medio fresco. Se incubaron a 37 °C hasta  $DO_{630}$  de 0,6, momento en que se adicionó IPTG hasta una concentración final de 500  $\mu$ M. Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 6.000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Luego se resuspendieron en 30 ml de solución de sonicación (50 mM Tris pH 7, 2 mM EDTA y 5 mM DTT), y se sometieron a 6 pulsos de sonicación de 30 segundos cada uno al 35 % de amplitud empleando un procesador ultrasónico modelo GEX 600 (Sonics and materials). El procedimiento se llevó a cabo a 4 °C. Las suspensiones obtenidas se centrifugaron durante 20 minutos a 13.000 rpm. Se realizó un corte con sulfato de amonio al 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<sup>TM</sup> Desalting, Amersham Pharmacia Biotech) empleando para la corrida la misma solución. Posteriormente, se sembró en una columna de Heparina (HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP 5 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de composición: 20 mM Tris-HCl pH 7 y 5 mM DTT. Se eluyó con la misma solución empleada para equilibrar la columna con un gradiente creciente de NaCl (0-1,5 M). La fracción de interés fue colectada, en todos los casos, a la mitad del gradiente de elución de NaCl (0,7-0,8 M).

En el caso de las cepas de *E. coli* XL1-blue pCueR (PB8340), y pCueR- $\alpha_2$ S (PB8374) el protocolo de purificación fue el mismo que el anteriormente descrito para GolS y su mutante, pero con las siguientes modificaciones: los cultivos se indujeron con 150  $\mu$ M IPTG a 30 °C, todas las soluciones de purificación se ajustaron a pH 8, y el gradiente de elución se realizó con NaCl 0-1 M (las fracciones de interés se colectaron siempre a 0,5 M NaCl).

En todos los casos las corridas cromatográficas fueron realizadas en el equipo ÄKTA purifier (Amersham Pharmacia Biotech).

Las fracciones eluidas de la columna que presentaban la proteína silvestre o mutante de interés se identificaron por análisis en geles de poliacrilamida teñidos con



azul de Coomasie y por inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales anti GolS o anti CueR, según corresponda, como se describe en las secciones 18 y 19.

## **18. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

Los lisados celulares de las distintas cepas de *Salmonella* o *E. coli* crecidas en presencia o ausencia de metales, así como las fracciones eluídas durante la purificación de GolS o CueR nativas y las mutantes GolS- $\alpha_{2R}$  y CueR- $\alpha_{2S}$  se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida (Yanisch-Perron y col., 1985). Antes de la siembra, las muestras se calentaron 5 minutos a 100 °C en solución de siembra de proteínas, compuesta por 120 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,5 % (v/v)  $\beta$ -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 20 mA por gel. La concentración de acrilamida utilizada en los geles de separación fue de 18 % (p/v) de una solución de acrilamida/bis-acrilamida preparada en una relación 30:0,8. Luego de la corrida, los geles se tiñeron en una solución de 0,25 % (p/v) azul brillante de Coomasie R 250, 30 % (v/v) isopropanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 2 horas, y se destiñeron en una solución de 25 % (v/v) etanol y 10 % (v/v) ácido acético durante 1 hora (o mediante hervor del gel sumergido en agua con 10 % (v/v) ácido acético durante 10 min).

## **19. TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA (“WESTERN BLOT”)**

Las proteínas separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida como se describe en el punto 18 fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) 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 y 137 mM NaCl) conteniendo 5 % (p/v) de leche en polvo

descremada, durante 60 minutos con agitación. Luego se incubó la membrana con una dilución 1/100 de anticuerpos de conejo policlonales anti-GolS o anti-CueR, según corresponda, en la solución TBS. Una vez finalizada la incubación, se realizaron 4 lavados de 15 minutos con TBS. Posteriormente, la membrana se incubó durante una hora con anticuerpos policlonales anti-conejo (Sigma) conjugados con la enzima fosfatasa alcalina, diluidos 1/2000 en la misma solución TBS. A continuación, se realizó un lavado de 10 minutos con TBS y un lavado con una solución conteniendo 100 mM Tris-HCl pH 9, 100 mM NaCl y 5 mM MgCl<sub>2</sub>. 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.

## 20. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de las proteínas silvestres GolS y CueR, y mutantes GolS- $\alpha$ 2<sub>R</sub> y CueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub>, purificadas según el procedimiento descrito en la sección 17, 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:

$$C = A / b \cdot \epsilon$$

donde  $b = 1$  cm (tamaño de la cubeta),  $\epsilon_{\text{GolS}} = 11835 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{CueR}} = 4970 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{GolS-}\alpha 2\text{R}} = 10345 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{\text{CueR-}\alpha 2\text{S}} = 6585 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

El coeficiente de extinción molar de una proteína está relacionado con la composición aminoacídica de la misma, particularmente con la cantidad de residuos de cisteína (C), triptofano (W) y tirosina (Y). Los coeficientes de extinción molar para GolS, CueR, GolS- $\alpha$ 2<sub>R</sub> y CueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub> fueron calculados según la siguiente fórmula:

$$\epsilon = (nW \times 5500) + (nY \times 1490) + (nC \times 125)$$

donde n es el número de cada residuo W, Y y C, y los valores establecidos para las absorptividades molares ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) a la longitud de onda de 280 nm del triptofano, tirosina y cisteína, respectivamente.

## 21. ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE PROTEÍNAS POR DICROÍSMO CIRCULAR

Para verificar el estado nativo de todas las proteínas purificadas, cada una de ellas fue diluída en solución tampón 20 mM Tris-HCl pH 7 y 5 mM DTT hasta una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Luego, 300  $\mu\text{l}$  de muestra fueron adicionados a una cubeta (1 mm de longitud de paso óptico) y el espectro de polarización entre 190 y 260 nm fue determinado en un espectropolarímetro JASCO J-800 a temperatura ambiente. Las determinaciones fueron realizadas por sextuplicado a una resolución de 0,2 nm, un ancho de bando de 0,2 nm y a una velocidad de escaneado de 50 nm/min. Los espectros obtenidos fueron promediados y convertidos en archivos de texto para regraficarlos utilizando el programa Excel. La relación señal-ruido de todos los espectros fue satisfactoria en el rango de longitudes de onda escaneado.

## 22. FOSFORILACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

La reacción de fosforilación de los oligonucleótidos se llevó a cabo en un volumen de 10  $\mu\text{l}$ , conteniendo solución de fosforilación comercial suplementada con 30  $\mu\text{Ci}$  de [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (3.000 mCi/ $\mu\text{mol}$ , 10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , New England Nuclear), 10 pmoles del oligonucleótido, y 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Invitrogen). 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.

### 23. CUANTIFICACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS MARCADOS RADIATIVAMENTE

Para cuantificar los fragmentos de ADN utilizados en los ensayos de retardo de la movilidad electroforética, cada fragmento que incluye el promotor en estudio fue amplificado con los oligonucleótidos radiactivos (sección 22) y, a su vez se realizó la misma reacción de PCR no radiactiva, de manera de obtener los mismos fragmentos no marcados radiativamente. Estos fragmentos no radiactivos fueron cuantificados midiendo absorbancia a 260 nm, teniendo en cuenta la relación:  $1 \text{ UAbs}_{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Luego, se sembraron en un gel de agarosa (sección 5) cantidades conocidas del fragmento no radiactivo cuantificado y distintos volúmenes de la sonda a cuantificar. A partir de estos geles se determinó la concentración de la sonda de interés utilizando el análisis de regresión lineal.

### 24. ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (EMSA)

Se utilizó la técnica de retardo de la movilidad electroforética de Lane y colaboradores (Lane y col., 1992) para analizar la interacción de GolS, CueR, GolS- $\alpha_{2R}$  y CueR- $\alpha_{2S}$  con las distintas regiones promotoras (*PcopA* y *PgolB*).

Los fragmentos nucleotídicos conteniendo las secuencias de las regiones promotoras del gen *golB* o *copA*, se sintetizaron por PCR utilizando ADN cromosomal de *S. Typhimurium* 14028s como molde de reacción, y los pares de oligonucleótidos *PcopA/cueR-Fw* y *PcopA/cueR-Rv* o *PgolB-Fw* y *PgolB-Rv* (**Tabla 3**). Los cebadores reversos de cada una de las reacciones fueron previamente marcados en su extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  por medio de la oligonucleótido quinasa T4 (Invitrogen), como se describió en el punto 22.

Aproximadamente 6 fmol (15 ng) (sección 23) de cada fragmento de ADN marcado fueron incubados con diferentes cantidades (indicadas en la leyenda de las figuras correspondientes) de GolS, CueR, GolS- $\alpha_{2R}$  o CueR- $\alpha_{2S}$  purificadas (sección 17), según corresponda, por 25 min a temperatura ambiente. Esta mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , conteniendo además solución tampón comercial React3 (Invitrogen), 5 mM DTT, Glicerol 10%, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  ADN de Salmón (DNA from

salmon testes Sigma) y Albúmina Sérica Bovina (BSA) 25 µg/ml. Luego se agregó solución de siembra (sección 18) en una proporción 20:1 de muestra:solución (en volumen) y se sembró en geles de poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 no desnaturalizantes de concentración final 8 % (p/v). 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. La corrida electroforética se llevó a cabo a 4 °C a una intensidad de corriente de 10 mA por gel. Los geles fueron secados a 65 °C durante 30 min en un secador de geles con bomba de vacío (SGD 2000, SAVANT), y sometidos a autoradiografía en placas Storage Phosphor Screens (Amersham Biosciences) durante 12-24 hs.

Se realizaron seis experimentos individuales para cada interacción ADN-proteína.

## 25. ANISOTROPÍA DE FLUORESCENCIA

Para determinar las constantes de afinidad para las interacciones de GolS, CueR, GolS- $\alpha_{2R}$  y CueR- $\alpha_{2S}$  con las distintas regiones promotoras (*PcopA* y *PgolB*), se empleó la técnica de anisotropía de fluorescencia (Lundblad y col., 1996; Andoy y col., 2009). Los fragmentos de ADN doble hebra correspondientes a las regiones promotoras de *copA* y *golB* fueron generadas mediante la incubación de cantidades equimolares de los correspondientes pares de oligonucleótidos simple hebra conjugados a fluoresceína (Sigma) (**Tabla 3**) a 85 °C durante 10 min y dejando luego que la mezcla se enfríe lentamente hasta llegar a T ambiente. El correcto anillado de los oligonucleótidos para generar los correspondientes fragmentos doble hebra fue verificado por medio de electroforesis de los mismos en geles de Tris-Glicina (sección 26), empleando como control negativo de reacción el mismo volumen de oligonucleótidos sin hibridar (simple hebra). La concentración de oligonucleótido doble hebra fue estimada en función de las concentraciones reportadas para cada uno de los oligos simple hebra (Sigma) en el volumen de reacción de hibridación. La unión de los reguladores transcripcionales nativos y mutantes a los promotores *PcopA* y *PgolB* fue medida en un espectrofluorómetro (Varian Cary Eclipse – Agilent Technologies). Todas las titulaciones fueron realizadas en una solución tampón 10 mM Tris pH 7,3, suplementada con 10 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> y 5 mM DTT. La fluorescencia fue excitada a 495 nm y la anisotropía (*r*) fue calculada en función de la siguiente ecuación:

$$r = (I_{\parallel} - G \times I_{\perp}) / (I_{\parallel} + 2 \times G \times I_{\perp})$$

donde  $I_{\parallel}$  y  $I_{\perp}$  son las intensidades de fluorescencia paralela y perpendicular a la excitación de polarización, respectivamente, y  $G$  es el factor de corrección a las diferentes respuestas del espectrofluorómetro a la luz de polarización paralela y vertical.

Las isotermas de unión proteína-ADN fueron ajustadas por regresión no lineal (Sigma Plot software) de la siguiente ecuación:

$$r = r_f + (r_b - r_f) \times (k_A \times x / (1 + k_A \times x))$$

donde  $r_f$  y  $r_b$  corresponden a los valores de anisotropía en ausencia de proteína y en concentración saturante de la misma, respectivamente,  $x$  es la concentración total de proteína, y  $k_A$  es la constante de asociación del complejo proteína-ADN.

Las constantes de disociación ( $k_D$ ) fueron estimadas con la siguiente ecuación:

$$r = r_f + a \times x / (b + x)$$

siendo  $a = (r_f - r) \times (k_A \times x) / (1 + k_A \times x)$  y  $b = k_D$ .

## 26. ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE TRIS-GLICINA

La correcta hibridización de los oligos empleados luego en ensayos de anisotropía de la fluorescencia fue verificada por medio de electroforesis en geles de Tris-Glicina (TG), compuestos por TG 0,5 X (solución de TG 10 X = 250 mM Tris pH 8 y 2 M glicina) y 15 % acrilamida 29:1 (acrilamida:bis-acrilamida). Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por 0,025 % (p/v) azul de bromofenol, 0,025 % (p/v) xilencianol y 30 % (v/v) glicerol, en una

proporción 5:1 en volumen de muestra:solución de siembra. Como control de peso molecular se utilizó un marcador de ADN de 100 pb (Invitrogen). La corrida electroforética se realizó en solución TG 0,5 % a 100 voltios durante 3-4 hs. Una vez finalizada, el gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio diluída durante 30 min y los fragmentos de ADN se detectaron iluminando el gel con un transiluminador de luz UV.

Esta técnica permitió mejor resolución que una electroforesis en gel de agarosa (sección 5), incluso al 3 % de agarosa.

## **27. MODELADO *in silico* DE LOS REGULADORES TRANSCRIPCIONALES**

El modelado estructural por homología de CueR, CueR- $\alpha_2$ s y GolS fue generado usando el software Rosetta versión 3.1. La estructura del factor de transcripción BmrR unido a su secuencia operadora (código del Protein Data Bank: 3Q5R) fue empleado como molde. Inicialmente, se generaron 100 estructuras utilizando un algoritmo descendiente coordinado cíclico combinado con el ensamblaje de fragmentos para modelar la secuencia de CueR con gaps. Las 10 estructuras de menor energía fueron subsiguientemente refinadas, y la estructura de menor score fue empleada como modelo. Las estructuras modelo fueron luego superpuestas a la estructura del complejo proteína-ADN utilizada como molde de manera tal de determinar la posición de los residuos de interés (Ala-16 y Phe-19) con respecto a la secuencia promotora y comparar sus conformaciones relativas en las diferentes proteínas.

## **28. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)**

Se realizó una dilución  $5 \times 10^{-7}$  en PBS (150 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7,2) del cultivo de la cepa analizada crecida durante 16 horas a 37 °C en medio LB, con agitación. Se aplicó una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  en placas de LB conteniendo concentraciones crecientes de Espectinomicina o Estreptomomicina. Las placas fueron incubadas de 16-40 hs en aerobiosis a 28 °C o 37 °C. Luego de la incubación, se calcularon las unidades

formadoras de colonias (UFC) para cada cepa lo que permitió estimar el porcentaje de supervivencia en función del recuento de la cepa en ausencia de antibiótico. La CIM corresponde a la menor concentración de antibiótico en la que no se observa formación de colonias.

## **29. ANTIBIOGRAMA. HALOS DE INHIBICIÓN**

### **29.1 Técnica con espátula de Drigalsky**

Se sembraron con espátula de Drigalsky en una placa de Petri conteniendo 20 ml LB-agar [1,5 % agar (p/v)] suplementado con el antibiótico adecuado y 100  $\mu$ M IPTG, 100  $\mu$ l de un cultivo saturado, también crecido en LB en presencia del antibiótico correspondiente e inductor en igual concentración final. Luego, discos de papel Whatman estériles, de 5 mm de diámetro, fueron embebidos con 5  $\mu$ l de cada dilución del antibiótico ensayado (10-50  $\mu$ g/ml espectinomicina o 10-30  $\mu$ g/ml estreptomycin) y colocados sobre la placa. Las placas se incubaron 16 hs a 28 °C o 37 °C.

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

### **29.2 Técnica con LB-agar**

100  $\mu$ l de un cultivo saturado se mezclaron con 3 ml de LB-agar [0,7 % agar (p/v)] fundido a 42 °C, el que luego se esparció homogéneamente sobre una placa de Petri con 20 ml LB-agar [1,5 % agar (p/v)]. Una vez solidificado, se colocaron los discos de papel Whatman como se describe en la sección 29.1.



## **30. ENSAYO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA EN CONDICIÓN DE CRECIMIENTO ESTÁTICO**

### **30.1 Formación de biopelícula**

Para analizar la capacidad de formar biopelícula en condiciones de crecimiento estático, 2 ml de LB (suplementado con antibiótico y 100  $\mu$ M IPTG en caso necesario) fueron inoculados con 2  $\mu$ l de un cultivo crecido durante toda la noche en agitación constante a 37 °C. Los ensayos se llevaron a cabo en tubos de ensayo de borosilicato, o en vasos de precipitado de vidrio para una mejor visualización de las diferencias fenotípicas. Los cultivos se dejaron incubando en condición estática durante 6-12 días a 28 °C.

### **30.2 Tinción con cristal violeta**

La biopelícula formada en la superficie interna del recipiente de vidrio, a nivel de la interfase líquido-aire del cultivo, fue teñida con una solución de cristal-violeta. Para ello, se descartó el SN de los cultivos y el anillo de biopelícula adherido al vidrio se lavó 3-4 veces con PBS (150 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, pH 7,2). Posteriormente, las biopelículas se tiñeron por incubación durante 20 min con una solución de 1 % (p/v) cristal-violeta, y se lavaron luego con abundante agua destilada para remover el exceso de colorante adherido a las paredes internas del recipiente.

En algunos casos, se observó la formación de una biopelícula (membrana) en la superficie del cultivo. Ésta resultó indefectiblemente removida al eliminar el SN, por lo que sólo se visualiza el anillo teñido adherido al vidrio luego de la tinción con cristal-violeta.

## **31. ENSAYOS DE MOTILIDAD EN PLACA**

### **31.1 Motilidad tipo swarming**

La cepa a ensayar se creció durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes y 100  $\mu$ M IPTG en los casos en que la cepa fuese portadora de un vector de expresión inducible, con agitación constante a 37 °C. 5  $\mu$ l de

dicho cultivo se inocularon en placas de 20 ml NB (sección 2) 0,5 % agar, suplementadas con 0,5 % (p/v) glucosa (Toguchi y col., 2000), antibióticos y 100  $\mu$ M IPTG, en caso necesario. Las placas se realizaron el mismo día del ensayo, y se secaron en la estufa a 37 °C durante 30 min antes de ser inoculadas. Una vez absorbida la gota de 5  $\mu$ l de cultivo, las placas se incubaron a 28 °C o 37 °C durante 5-20 hs. En todos los casos, cada cepa se inoculó por duplicado en cada condición, y las fotos de las placas se tomaron periódicamente a partir de las 4-5 hs de incubación.

### **31.2 Motilidad tipo swimming**

Los cultivos se crecieron de la misma manera como se describe en la sección 30.1. Un volumen de 5  $\mu$ l de cultivo saturado se inocularon en placas de 20 ml NB (sección 2) 0,3 % agar, suplementadas con antibióticos y 100  $\mu$ M IPTG, en caso necesario. El procedimiento para el armado, secado, inoculación e incubación de las placas se describe detalladamente en la sección 30.1.

## **32. PLACAS DE CALCOFLÚOR**

Para evaluar la producción y secreción de celulosa y otros exopolisacáridos, 20  $\mu$ l de un cultivo saturado se inocularon en forma de gota sobre una placa de Petri con 20 ml SLB-agar [1 g % peptona de carne (p/v), 0,5 % extracto de levadura (p/v) y 1,5 % agar (p/v)], suplementada con 50  $\mu$ g/ml de Calcoflúor (Fluorescent Brightener 28). La incubación se realizó a 28 °C o 37 °C durante 12-48 hs.

Alternativamente, 10  $\mu$ l del cultivo saturado se estriaron con ansa (de manera tal de obtener colonias aisladas) sobre una placa de Petri constituida como se describe anteriormente. La incubación se realizó en las mismas condiciones que el ensayo de gota.

En ambos casos, la fluorescencia de las diferentes cepas se detectó por exposición de las placas en un transiluminador de luz UV. Una mayor intensidad de fluorescencia implica mayor producción y secreción de celulosa y posiblemente también de otros exopolisacáridos.

### 33. FENOTIPO RDAR. PLACAS DE ROJO CONGO

20 µl de un cultivo en fase estacionaria se inocularon sobre una placa de Petri de SLB-agar [1 g % peptona de carne (p/v), 0,5 % extracto de levadura (p/v) y 1,5 % agar (p/v)], suplementada con 40 µg/ml de Rojo Congo y 20 µg/ml de Azul Brillante Coomassie G-250. La incubación se llevó a cabo a 28 °C o 37 °C durante 7 días.

Una mayor coloración de la cepa, y una mayor rugosidad de la misma, implica mayor producción de curli en las condiciones ensayadas.

### 34. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Las secuencias de aminoácidos de los reguladores transcripcionales de la familia MerR fueron obtenidas de la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el alineamiento (algoritmo Clustal W) y el análisis filogenético (método de máxima similitud) se empleó el programa MEGA versión 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>). En la **Tabla 4** se detallan las secuencias proteicas de los reguladores MerR empleados en la construcción del árbol filogenético (**Fig. 8 – Introducción**). Para cada regulador se detallan además la especie y el número de acceso al GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

Las regiones promotoras de los genes *cueR<sub>STM</sub>* y *cueR<sub>EC</sub>* (**Fig. 32 – Capítulo I**) fueron predichas mediante el programa Neural Network Promoter Prediction para procariontes ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)).

Para la predicción de las regiones regulatorias (promotor y terminador transcripcional) de *STM1266* (**Fig. 40 – Capítulo II**) se emplearon los programas PePPER (Prediction of Prokaryote Promoter Elements and Regulons) (<http://pepper.molgenrug.nl/index.php/pepper-tools/promoter-predictie-tool>) y Neuronal Network Promoter Prediction para procariontes ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)).

**Tabla 4: Reguladores transcripcionales de la familia MerR utilizados para la construcción del árbol filogenético de la Fig. 8 - Introducción**

Especie	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Escherichia coli</i>	gi 289065343 gb ADC80844.1	MerR	MENNLENLTIIGVFAKAAGVNVETIRFYQRKGLLREPDKPYGSIRRYGEADVVR VKFVKSAQRLGFSLEIAELLRLDDGTHCEEASSLAEHKLDVREKMDLARM ETVLSSELVCAACHARKGNVSCPLIASLQGEAGLARSAMP
<i>Salmonella enterica</i>	gi 229561733 gb ACQ77935.1		MEKNLENLTIIGVFAKAAGVNVETIRFYQRKGLLPEPDKPYGSIRRYGEADVTR VRFVKSAQRLGFSLEIAELLRLDDGTHCEEASSLAEHKLDVREKMTDLARM ETVLSSELVFACHARQGNVSCPLIASLQGEKEPRGADAV
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	gi 359760676 gb AEV62755.1		MFIGRLAELTGCTPKAIRLYEQMGLISEPEREGRYRLYNAHHLEIVHLIRKAQ TAGFKLAEMNPLIAAKNKLKSFPLELANQAVDDKRQQVRDRIAELQALDLHLI ELKSEMNSMFAPRPVAGLHKVDAPACTDKQTLASRPLQAAEG
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	gi 251783995 ref YP_002998299.1	CueR	MNISDVAKITGLTSKAIRFYEEKGLVTPPMRSENGYRITYTQQHLNELTLLRQA RQVGFNLEESGELVNLFNDPQRHSADVKKRRTLEKVAEIERHIEELQSMRDQLL ALANACPGDSDADCPIDNLGSCCHHRAG
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2	gi 16763879 ref NP_459494.1		MNISDVAKKTGLTSKAIRFYEEKGLVTPPLRSENGYRITYTQKHLNELTLLRQA RQVGFNLEECGELVNLFNDRHSADVKKRRTLEKVAEIERHISELQSMRDQLL ALAESCPGDSDADCPIDNLGSCCHHKAQKPR
<i>Pseudomonas fluorescens</i> R124	gi 404302408 gb EJZ56370.1		MNIGQAARHSGLSAKMIRYYESIGLLKAAHRTDSGYRVYSDDDLHTLAFIKRS RDLGFSLEEVGKLLTLWHDRQRASADVKALARQHI DELNRKIRELGELRDTLQ DLVEHCNGDHRPDCPIKELASGCCAHPARA
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. W3110	gi 388479946 ref YP_492140.1	ZntR	MYRIGELAKMAEVTPTDIRYYEKQQMMEHEVRTEGGFRLYTESDLQRLKFI RH ARQLGFSLESIRELLSIRIDPEHHTCQESKGIVQERLQVEVEARIAELQSMQRS LQRLNDACCGTAHSSVYCSILEALEQGASGVKSGC
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2	gi 16766701 ref NP_462316.1		MYRIGELAKLADVTPTDIRYYEKQQMDHEVRTEGGFRLYTENDLQRLKFI RY ARQLGFTLDSIRELLSIRIDPEHHTCQESKSIVQERLQVEVEARIAELQTMQRS LQRLNDACCGTAHSSVYCSILEALEQGASGAKSGC
<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0	gi 501683253 ref YP_008003079.1		MKIGELAKLTDQVETIRYYEREGLLPEPARSEGNRYRLYTQAHTERLTFIRNC RSLDMTLEEIRSLNLNRDSDPQDQCASVNALIDEHIHVVKARIDGLLALQEQLL DLRQRCSEGPDLHCGILQRLEVSGSVAPNESEPSHVGRSHGH
<i>Micromonospora</i> sp. ML1	gi 81681114 emb CAJ34361.1	TioE	MYFRPADLAHEHGLSPQSVRNYERDGLIPARRTESGYRRYTEKHAAALRAYR ALIPAHGYAESGAIMRDI TAGRLNEALTTIDRSHAELLRDRGTLDAVAEVLTH LTGRSTGTWRAPKSIQPSYIGELAHRLGNNVATIRKWETSGVLAPVRRPETGH RMYDASDVRDAELAHFLRRGRYPLELIATVVQQVRAAGDTQALAAALADWRQR VTTTRGLAMLNAAQLASYLAMEEN

Especie	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Streptomyces triostinicus</i>	gi 219565278 dbj BAH04174.1	TioE	MDHLRPTDLAREHGI STQAVRNYERDGC I PLADRTASGYRVYTETHAAALRAY LALVPAHGAVSQQIMRALNTGELDAALTAVDRSHAQLLRDRGTLDAVGQAVA HLTTGPDAAAHTPVSSSETFSIGELAHRLGVTAATLRNWEAAGILAPDRAPVTG HRTYGAPPEVRDAELAHLLRRGGYQLDQIATVVQQIRTAGGTQALSAALDDWRQ RLAVRGVAMLNASVQLARYTALLGIAPPQPSHRR
<i>Rhodococcus</i> sp. EsD8	gi 494000777 ref WP_006943357.1		MRPIDLAREHGLSAQAIRNYDDAGILPPTERSETGYRRYTPLHAQALRAFLAL RGGHGRQATDIMRSVNRGDTE SAYRLIDAAHVALLAERGTREVTALGALS ATAPTAVRGGPLTVGELARRLGVHPATLRTWETQGILRPDRDRATGYREYGPD CVRDAE IARQLRQGGYPLSQVARFLESLRTAGGADALAAFLGSWQDRLTTRSR NLLAGAAQLD TYLTMLDD
<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	gi 359761802 gb AEV63881.1	LiuR	MSSQTY S I S D L A R E L D I T T R A I R F Y E E Q G L L S P E R R G Q E R I Y S P R D K V S L K L I L R G K R I G F S L A E C R E L I E L Y D P S S G N Q K L H S M L A K I T E R R E Q L E Q Q L L D I E Q M K L E L D T A E E R C I Q A L E Q T I K G E E I V Q
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	gi 489316338 ref WP_003223708.1		MSSQTY S I S D L A R E L D I T T R A I R F Y E E Q G L L S P E R R G Q E R I Y S P R D K V S L K L I L R G K R I G F S L A E C R E L I E L Y D P S S G N T K Q L N S M L A K I S E R R E Q L E Q Q L L D I E Q M K L E L D T A E E R C V Q A L E Q T L K S Q Q I A Q
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gi 497562143 ref WP_009876327.1		MSTTYT I S D L A R E L D I T T R A I R F Y E E Q G L L S P E R R G Q E R I Y S P R D K V S L K L I L R G K R I G F S L A E C R E L I E L Y D P D P S S G N Q K L N T M L E K I A E R R A Q L E Q Q L L D I E Q M Q L E L D T A E E R C R A A L I K S Y N K Q P V T T
<i>Escherichia coli</i>	gi 289065311 gb ADC80813.1	MerD	MSAYTVSRLALDAGVSVHIVRDYLLRGLLRPVAYTTGGYGLFDDTALQRLRFV RAAFEAGIGLDALARLCRALDAADGDGASAQLAVLRQLVERRRREALASLEMQL AAMPTEPAQHAESLP
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	gi 410652336 ref YP_006955478.1		MSAYTVSQLAHNAGVSVHIVRDYLRGLLRPVACTTGGYGVFDDAALQRLCFV RAAFEAGIGLDALARLCRALDAADGAQAAAQLAVLRQLVERRRAALAHLDAQL ASMPAERAHEEALP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gi 356609695 gb AET25343.1		MNAYTVSRLALEAGVSVHIVRDYLLRGLLRPVACTTGGYGLFDDAALQRLCFV RAAFEAGIGLDALARLCRALDAADCDATAAQLAVLSQFVERRRREALADLEVQL AAMP TAPAQQAESLP
<i>Campylobacter coli</i> 2553	gi 380523296 gb EIA48948.1	HspR	MEHHYNEPVYLI SVVAKVLSIHPQTLRQYEREGLIEPSRTDGKIRLYSQRDID RIKLILRLTRDMGVNLAGVDVILKLNQLHEFENLIDELRLELSKQONPNASS KAVVKHKNSFDLIFYEKK
<i>Mycobacterium avium</i> paratuberculosis K-10	gi 41409941 ref NP_962777.1		MAKNRKGHESRTFLISVAEELAGMHAQTLR TYDRLGLVSPQRTSGGGRWYSEH DVDLLREVQRLSQDEGVNLAGIKRI IELTNQVEALQARVKELTEELAQVRAGQ RRDLAVLPKSTALVVWQPRKGGTRT
<i>Bifidobacterium breve</i> UCC2003	gi 50952940 gb AAT90387.1		MARLANQMKQLYAMCATALVMGRADLDGADDVGFDIELPIFTVGQTAE LANIH PQTLRQYDRLGLVLPQRTDGGARRYCLRDIARLTRAQRLSQDEGINLSGIARI LVLEENRQLRREVKRMQTGDQESVFAAGRDGNI VEVQRSNRARLWRNAIRRE TREL PGRDTAADTAAGATGDSNSTPADFKSMVLWGW

Espece	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Mycobacterium liflandii</i> 128FXT	gi 443490958 ref YP_007369105.1	HspR_2	MADRPGHAGGPAPDVGVIYGISVTAELSGIAVQSLRLYERHGLVTPARSEGGTR RYSADDLVRLQRVSVLIEAGINLAGISRILNLEDDNAALAAANCDLLASNRSL RDAARAAVRLMNHGRSAENEGEGDTS
<i>Mycobacterium marinum</i> M	gi 183982992 ref YP_001851283.1		MADRPGHAGGPAPDVGVIYGISVTAELSGIAVQSLRLYERHGLVTPARSEGGTR RYSADDLVRLQRVSVLIEAGINLAGISRILNLEDDNAALAAANCDLLASNRSL RDAARAAVRLMNHGRSAENEGEGDTS
<i>Bacillus subtilis</i>	gi 1750110 gb AAB41079.1	GlnR	MSDNIRRSMPFLFPIGIVMQLTELSARQIRYYEENGLIFPARSEGNRRLFSFHD VDKLEIKHLIEQGVNMAGIKQILAKAEAEPEQKQNEKTKKPKMHDLSDELRL QLLKNELMQAGRFRQNTFRQGDMSRFFH
<i>Streptococcus salivarius</i>	gi 196968498 gb ACG80825.1		MIMAREKELRRSLAVFPIGTVMKLTDLTARQIRYYEDQGLIQPERTAGNRRMY SLNDMDRLLEIKDFLDDGYNIAAIKHEYEEREVRAQQKQATLTDADVRRILHD ELLQQGRFTTTPSQQFGNLR
<i>Listeria innocua</i> Clip11262	gi 16413809 emb CAC96567.1		MSEKEIRRSMPFLFPIGIVMQLTELSARQIRYYEDQGLIHPARNQGNHRLYSLQ DIDVLEIKDYLNLDGLNIAGIKKMYQMQQESKEPLTDDDVRKILRKEMQQAG RFVKQDATGKQQLPRF
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	gi 29604856 dbj BAC68924.1	LitR	MSESTRAEGRPGGLRPGTAAVDDTGLTTGALARRLGVSPTTLRSWDRRYGVGP QIRADGRHRRWSPQDVAMLETMCRLTSAGVPPAEAAARVAKEGGGSSSPTPAQP EAAGAPAVRVRSHAGGTLPLGDVQRCEGLARAARVLDAPAVEDQLTSVERH GLTVAWAEVMVPTLHAVGRKWESSGDYVEVEHLLSWHISTALRRVLAPVRPG DRDAAGPVVLAQARSTASLPLARHVAATQWGVKGARRHPLVMLGGQGWAGRSA QGMLRPPGLREALDALAATYEGAASGPRG
<i>Pseudonocardia dioxanivorans</i> CB1190	gi 331699105 ref YP_004335344.1		MYGDAGPASAHAPAGPSPGAATDELSLPVAAVARRLGVAPATLRTWARRYGLEP SGHVPGSHRRYTTTDLARLQVMHRALTHGSGPAEAARLALTTPEALPTVPAP RPAMAPRLDLAPDPHVPARSWPAATGLREDTVAEELDDDRPGPAAGRGRVLR LPGATPRARGLARAASAMDAEGIRAVLLDSVTADGLVSWDQVARPVLVAVAQ RWESTGRGVEIEHLVSDCVTAVFNARAVLAPARAGLRPVLLAGMPREQHVLPL TVLAAVLAERGI PCRPLGADLPADALADAVRRTAPAAVVLWSQVPETADADV TGLPRTRPRHRLLVGGVGDWETLLPPAITRLSTLVDAADLLTRVATS
<i>Micromonospora</i> sp. L5	gi 315501042 ref YP_004079929.1		MADEALSAGAVARRLGVAVTTLRTWHQRYGLGPSEHVPGHRRYTPADLARLE IMRRLTTEGVAPAEARWARQAPAVLPPERLGLKARASTVRDGGGTIPVGRAG PAARGLARAAMRLDSVTIGRTIADALAADGVVATWEGLLRPVLAGIGERHAAT SALIEVEHLMSRCVSEAFATVARTYPMTGPPRILLSCADEEQHSLPLEALAAA LAEVGVSYRMLGARVPVPALVEAVNRTGPAAVVLWSHIRATADPCQLTALLAV PRRPLLVLAAAGPGWRADSLPAGVVRPVDLAEALS LAVAVRDSL DQSTTS

Especie	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Myxococcus xanthus</i>	gi 499870290 ref WP_011551024.1	CarA	MTLRIRTIARMTGIREATLRAWERRYGFPRPLRSEGNNYRVYSREEVEAVRRV ARLIQEEGLSVSEAIQVKTEPPREQPEAERLRERFWSVSGALEGDEVTRVLD DAQTVMDVEAYCDGFLPLLLREMGRVRLDVAREHLASALIRQRLRQVVDALSPA PAGPRALLACPSGDHHEGGLLVGLIHLKRKGWRVTMLGADTPAAALQGACVQV RPDVVALSFVRRARAEPEFASVLEDALRACAPFPVVVGGGLGAREHLKAI FSLGA QYAESSEELVAIWNQVRNAQNRP
<i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	gi 309397369 gb ADO74828.1		MSLLRIRTIARLTGIREATLRAWERRHGFPRPHRSENNYRAYTREEVENIRRV AKLIEEGLSVSEAIQVKALPVGALPAGERLSERFWSAVMGMDTDEAQRVLDE GQASMDVDTYCDGFLPLLLREMGGRDLIAREHMASALIRQRLSALMAAEGTRQ EGPRVVLACPARDHHEGGLLALGLYLKRRGWRVTMLGADTPAEALRSACAQVR PDLVALSFVRHREPEEMA AVLRECQACSPVLVVVGGAAAREHLKAI F SAGA Q YAETASEMMAQWQQARGASNRT
<i>Dermacoccus</i> sp. Ellin185	gi 308434939 gb EFP58773.1		MSTHVEGLQIGELAERVGVSTHTLRAWERRYGILKPSRTTGGYRVYSEL DVRR VSAVLGLREQGVSIAEAARRVNANVVAQIPAGRRI DAAAIVYEMHRAVDRFDE FALSAALDRLLSSHRLEELRDGLMPFLVQLGGRWERGEVSAHEHFATQLIR RRLDSYSLMWADGDGPLVVLACPPGEQHDIPLLVLGVLLARSGWIRIYIGQET PVADLAQACSI LQPDLVVMAATRDTTFRSLDELRLARSYRLLIGGRGATDT ICADLGVEAMSQDVVAAASALIDESGRTGRSDSDAAAQLVG
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2	gi 16764617 ref NP_460232.1	STM1266	MATFSISAMAAQCGVTTANIRSWERYGLLQPTKDEAGNRFYCIEDAIRIQHII DALSKGFSLKEIKPALYGEETHCRSGWLFYQEEILAQCRKFEPAKLRKLLWRY GREIPPCIVIESILRPLRLWLSAGDDDDARRFEKALLDTAII EYATFQLSSVRK APAGTMLIAAFSLNDPIELWLETIKYCSEGMRVEVWPQAPMPDLLSTSFEHI VLWHDETTLTPAQENLIQALKESGKFSLVKNGSGLTLLPAVYRQHEMPESMQH VAPQIHANGYEKSGTAR
<i>Salmonella enterica</i> Schwarzengrund str. CVM19633	gi 194737264 ref YP_002114281.1		MATFSISAMAAQCGVTTANIRSWERYGLLQPTKDEVGNRFYCIEDAIRIQHII DALSKGFSLKEIKPALYGEETHCRSGWLFYQEEILAQCRKFEPAKLRKLLWRY GREIPPCIVIESILRPLRLWLSAGDDDDARRFEKALLDTAII EYATFQLSSVRK APAGTMLIAAFSLNDPIELWLETIKYCSEGMRVEVWPQAPMPDLLSTSFEHI VLWHDETTLTPAQENLIQALKESGKFSLVKNGSGLTLLPAVYRQHEMPESMQH VAPQIHANGYEKSGTAR
<i>Salmonella enterica</i> Agona str. SL483	gi 197250449 ref YP_002146775.1		MATFSISAMAAQCGVTTANIRSWERYGLLQPTKDEAGNRFYCIEDAIRIQHII DALSKGFSLKEIKPALYGEETHCRSGWLFYQEEILAQCRKFEPAKLRKLLWRY GREIPPCIVIESILRPLRLWLSAGDDDDARRFEKALLDTAII EYATFQLSSVRK APAGTMLIAAFSLNDPIELWLETIKYCSEGMRVEVWPQAPMPNLLSTSFEHI VLWHDETTLTPAQENLIQALKESGKFSLVKNGSGLTLLPAVYRQHEMPESMQH VAPQIHANGYEKSGTAR

Especie	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2	gi 16764740 ref NP_460355.1	STM1390	MSYSIGEFARLCGINAATLRAWQRRYGLLKPQRTDGGHRLYSDDDIRQALSIL DWVRKGVPI SQVKPLLSRPVIRLGDNWITIQETMLQHLHEGRIDALRQLIYDC GREYPRAELVTHLLRPLRSKVS AHLPAVMTLREILDGII IAYTSFCLEGDRKA PGNNAFISGWNLSDHCEIWLETLTRTGQELRLNVLPSPPVVLAPELFAQRKWF LVTTGKLTAGQKKQLAQWRNVVASLEVITL
<i>Salmonella enterica</i> Newport str. SL254	gi 194445173 ref YP_002040644.1		MSYSIGEFARLCGINAATLRAWQRRYGLLKPQRTDGGHRLYSDDDIRQALSIL DWVRKGVPI SQVKPLLSRPVIRLGDNWITIQETMLQHLHEGRIDALRQLIYDC GREYPRAELVTHLLRPLRSKVS AHLPAVMTLREILDGII IAYTSFCLEGDRKA PGNNAFISGWNLSDHCEIWLEALTRTGQELRLNVLPSPPVVLAPELFAQRKWF LVTTGKLTAGQKKQLAQWRNVVASLEVITL
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	gi 16130065 ref NP_416631.1	MlrA	MALYTI GEVALLCDINPVTLRAWQRRYGLLKPQRTDGGHRLFNDADIDRIREI KRWIDNGVQVSKVKMLLSNENV DVQNGWRDQOETLLTYLQSGNLHSLRTWIKE RGQDYPAQTLTTHLFIPLRRRLQCQPTLQALLAILDGVLINYIAICLASARK KQGKDALVVGWNIQDTRRLWLEGWIASQQGWRIDVLAHSLNQLRPELFEGRTL LVWCGENRTSAQQQQLTSWQEQGHDI FPLGI
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2	gi 16765490 ref NP_461105.1		MALYTI GEVALLCDINPVTLRAWQRRYGLLKPQRTDGGHRLFNDADIDRIREI KRWIDNGVQVSKVKVLLSSDSSEQPNGWREQQEILLHYLQSSNLHSLRLWVKE RGQDYPAQTLTTLNFVPLRRRLQCQPALQALLGILDGILINYIALCLASARK KQGKDALVIGWNIHDTTRRLWLEGWVASQQGWRIDVLAHSLSQFRPELFDGKTL LVWCGENQTLAQQQQLLAWRAQGRDIHPLGV
<i>Citrobacter</i>	gi 489117507 ref WP_003027351.1		MALYTI GEVALLCDINPVTLRAWQRRYGLLKPQRTDGGHRLFNDADIDRIREI KRWINNGVQVSKVKMLLSNESIDVHNGWREQQEITLLSYLQSNLHSLRLWIKE RGQDYPAQTLNTHLFIPLRRRLQCQPILQALLGILDGVLINYIAICLASARK KQGKDALVVGWNIQDTRRLWLEGWVASQQGWRIDVLAHSLNQLRPELFEGRTL LVWCGENQTPAQQQQLNEWRALGHDIYPLGI
<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	gi 1787409 gb AAC74246.1	BluR	MAYYSIGDVAERCGINPVTLRAWQRRYGLLKPQRSEGGHRLFDEEDIQRIEEI KRWISNGVPVGVKVKALLETTSQDTEDDWSRLQEEMMSILRMANPAKLRARIIS LGREYPVDQLINHVYLPVRQRLVLDHNTSRIMSSMFDGALIEYAATSLFEMRR KPGKEA ILMAWNVEERARLWLEAWRLSLSGWHISVLADPIESPRPELFPQTTL IVWTGMAPTRRQNELLQHWGEQGYKVI FHAP
<i>Shigella sonnei</i> Ss046	gi 74311698 ref YP_310117.1		MAYYSIGDVAERCGINPVTLRAWQRRYGLLKPQRSEGGHRLFDEEDIQRIEEI KRWISNGVPVGVKVKALLETTSQDTEDDWNRLQEEMMSILRMANPAKLRARIIS LGREYPVDQLINHVYLPVRQRLVLDHNTSRIMSSMFDGALIEYAAASLFEMRR KPGKEA ILMAWNVEERARLWLEAWRLSLSGWHISVLADPIESPHPELFPQTTL IVWTGMAPTRRQNELLQHWGEQGYKVI FHAP



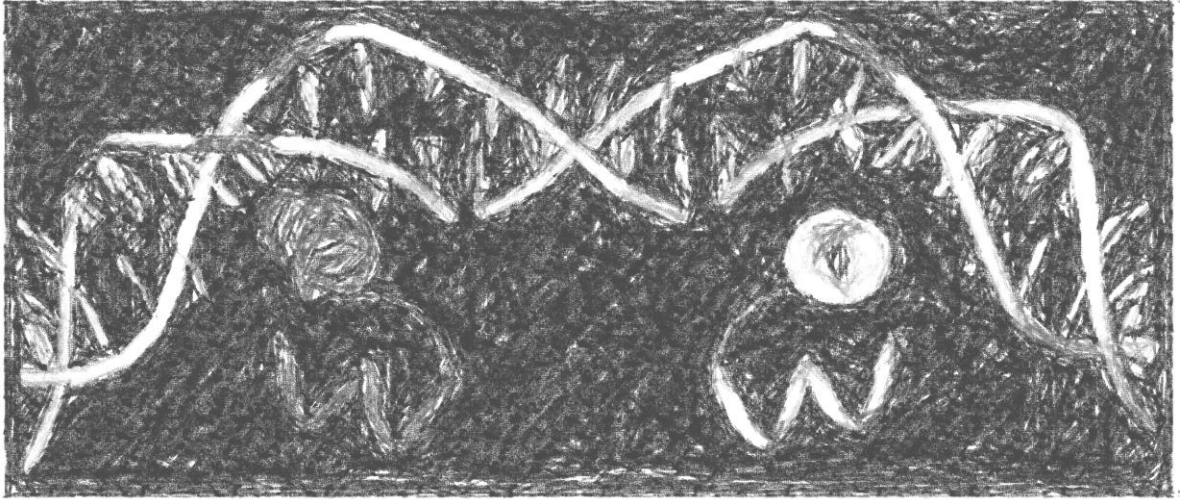
Espece	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Citrobacter</i> sp. KTE30	gi 507079609 ref WP_016150367.1	BluR	MSGGTMAYYSIGDVAERCINPVTLLRAWQRRYGLLKPQRSEGGHRLFDEEDIQ RIEEIKRWISNGIPVGVKVALLETSTRQADDDWNQLQEEMMSILRMAHPPKLR AKITALGRVHPVDALIDHVVLPVRQRLILDHNTSRIMNSMLDGalIEYVATLL SETRRKSGKDALLLAWDVEDRTRLWLEAWRLSQSGWHIAVLAEPSPRPELF PGQTLFVWTGIAPTRRQNELLQHWNEQGYKVI FHSF
<i>Bacillus subtilis</i>	gi 2627064 dbj BAA23495.1	BmrR	MKESYYSIGEVSKLANVSIKALRYDDKIDLFKPAYVDPDTSYRYTDSQLIHL DLIKSLKYIGTPEEMKKAQGLRDGRVCFLYRAGEANQGEIRLFISPGANHF IGEKADETADGISRRLGEVFLVDEEEIRIIQTEAEGIGPENVLNASYSKLLKF IESADGFTNNSYGATFSFQPYTSDIDEMTYRHIFTPVLTNKQISSITPDMEITT IPKGRYACIAYNFSPHYFLNLQKLIKIADRQL
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. BSP1	gi 430759133 ref YP_007209057.1		MKESYYSIGEVSKLANVSIKALRYDDKIDLFKPAYVDPDTSYRYTDSQLIHL DLIKSLKYIGTPEEMKKAQDLEMEELFAFYTEQERQIREKLDFLSALEQTIS LVKKRMKRQMEYPALGEVFLVDEEEIRIIQTEAEGIGPENVLNASYSKLLKFI ESADGFTNNSYGATFSFQPYTSDIDEMTYCHIFTPVLTNKQISSITPDMEITTI PKGRYACIAYNFSPHYFLNLQKLIKIADRQLTVVSDVYELIIPHYSPKKQ EYRVEMKIRIAE
<i>Bacillus</i> sp. JS	gi 386758994 ref YP_006232210.1		MKESYYSIGEVSKLANVSIKALRYDDKIDLFKPAYVDPDTSYRYTDSQLIHL DLIKSLKYIGTPEEMKKAQDLEMEELFAFYTEQERQIREKLDFLSALEQTIS LVKKRMKRQMEYPALGEVFLVDEEEIRIIQTEAEGIGPENVLNASYSKLLKFI ESADGFTNNSYGATFSFQPYTSDIDEMTYRHIFTPVLTNKQISAITPDMEITTI PKGRYVCIAYNFSPHYFLNLQKLIKIADRQLTVVSDVYELIIPVHYSPKKQ EYRVEMKIRIAE
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	gi 154685067 ref YP_001420228.1	BltR	MSEDVRKYFTTGEFAKLCHVKKQTLFHYDEIGLLSPEIKKANGYRYYSYHQFE LFQVIGLFKEVGVPLKQIKPLLDKTPEGIIITLLKESSIEISKIKKLEHLQR MIRTKVKLTEQALETDFSSVSLQRLDEETLMIGRPVHLPERQYTAASELIR YMRVHELQGHVPVGLFAREQILKKEFYNYTHFYMKTDEGIENRDLHIKPKGL YAVGYQIGDEAEAYRSIMQFIEEYGLEMGDYAYEYMLDEVVADGFDNQITR IQLQVRST
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> CAU B946	gi 375361212 ref YP_005129251.1		MSEDVRKYFTTGEFAKLCHVKKQTLFHYDEIGLLSPEIKKANGYRYYSYHQFE LFQVIGLFKEVGVPLKQIKPLLDKTPEGIIITLLKESSIEISKIKKLEHLQR MIQTKVKLTEQALETDFSSVSLQRLDEETLMIGRPVHLPERQYTAASELIR YMRVHELQGHVPVGLFAREQILKKEFYNYTHFYMKTEEGIENRDLHIKPKGL YAVGYQIGDEAEAYRSIMQFIEEYGLEMGDYAYEYMLDEVVADGFDNQITR IQLQVRNR

Espece	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Bacillus</i> sp. 916	gi 494651367 ref WP_007409311.1	BltR	MSEDVRKYFTTGEFAKLCHVKKQTLFHYDEIGLLSPEIKKANGYRYYSYHQFE LFQVIGLKFKEVGVPLKQIKPLLLDKTPEGIIALLKEKSSEIESKIKKLEHLQR MIRTKVKLLEQALETDFSSVSLQRLDEETLMIGRPVHLHLPERQYTAASELIR YMRVHELDDQGHFVGGFLFAREQILKKEFYNYTHFYMKTEEGIENRDLHIKPKGL YAVGYQIGDEAEAYRSIMQFTEEYGLEMGDYAYEYMLDEVVAGGVGNQITR IQLQVRNP
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	gi 410652310 ref YP_006955452.1	TipA	MAVVYVGVFLLGKALALPAEPFMTKLFADKSI PDVILTLTLLTIFILAPLNEETL FRGIMLNVFRSRYCWTMMLGALITSLLFVAHSAHQYQNLTLAELFLVGLITSV ARIRSGLLLLPVLLHMEATTLGLLFG
<i>Escherichia coli</i>	gi 446539462 ref WP_000616808.1		MIQTRNQYLQFMLVMLAAWGISWGSRFVMEQAVLLYGPKNYLLFFSHGAVLMY LLCVFLVYRRWIAPLPVVGQLRNVGVPWLVGAMAVVYIGVFLGKVLALPAEP FMTKLFADKSI PDVILTLTLLTIFILAPLNEETLFRGIMLNVFRSRYCWTMMLGA LITSLLFVAHSAHQYKNLTLAELFLVGLITSAARIRSGLLLLPVLLHMEATTL GLLFG
<i>Citrobacter rodentium</i> ICC168	gi 283777751 ref YP_003368449.1		MIQTRNQYLQFMLVMLAAWGISWGARFVMEQAVLLYGSGKNYLLFFSHGTVLMY LLCVFLVYRRWIAPLPVVGQLRNVGVPWLVGAMAVVYVGVFLLGKALALPAEP FMTKLFADKSI PDVILTLTLLAIFILAPLNEETLFRGIMLNVFRSRYCWTMMLGA LITSLLFVAHSAHQYQNLTLAELFLVGLITSATKIRSGLLLLPVLLHMEATTL GLLFC
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 (1)	gi 27377130 ref NP_768659.1	NolA	MRTLHHEHTGLLAATERTEGGHRMYDRESGQRVHQIRALRELGFSLVEIRKA MEGTTSLTDLLRKHLERIEVQVARTTLLRDLRNMTIDSEAQVSVDELPA TLN AMSRAETRSQTSRCTCNLAAEREDRWRRI RDDLRDCMDGGEHPCGERAKAVAV AARLLI SEIAGDSDSRVSMILKVLARLSAPRSLAGWDPCLMQYLDLALGGLEDQ PY
<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> USDA 110 (2)	gi 128502 sp P22537.1		MNRATPRRRRWIRIGELAEATGVTVRTLHHEHTGLLAATERTEGGHRMYDRES GQRVHQIRALRELGFSLVEIRKAMEGTTSLTDLLRKHLERIEVQVARTTLLRD RLRNMTIDSEAQVSVDELPA TLNAMSRAETRSQTSRCTCNLAAEREDRWRRI DDLDCMDGGEHPCGERAKAVAVAAARLLI SEIAGDSDSRVSMILKVLARLSAPR SLAGWDPCLMQYLDLALGGLEDQPY
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	gi 1709329 sp P50329.1		MSKATPRRRRWIRIGELAEATGVTVRTLHHEHTGLLAASERTDGGHRMYDRES VQRVHQIRALRELGFSLHEIRKAMEGTTSLIDLKHLERIEVQVARTTLLRD RLRDMTTGSEIQVSVDELPA TLNAMSRAETRSQTSRCTCKLAIEREERWRRI DELRDCMDRGEHPCGERAKAVAVAAARLLI SEIAGADSRVSTILKVLARLSAPR SLAGWDP

Espece	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 str. EDL933	gi 15804655 ref NP_290696.1	SoxR	MEKKLPRIKALLTPGEVAKRSGVAVSALHFYESKGLITSIRNSGNQRRYKRDV LRYVAIIKIAQRIGIPLATIGEAFGLVPEGHTLSAKEWKQLSSQWREELDRRI HTLVALRDELDCIGCGCLSRSDCPLRNPGRDLGEEGTGARLLEDEQN
<i>Salmonella bongori</i> NCTC 12419	gi 340001621 ref YP_004732505.1		MEKKSRLKALLTPGEVAKRSGVAVSALHFYESKGLITSIRNSGNQRRYKRDV LRYVAIIKIAQRIGIPLATIGEAFGLVPEGHTLSAKEWKQLSSQWREELDRRI HTLVALRDELDCIGCGCLSRSDCPLRNPGRDLGEEGTGARLLEDD
<i>Shigella</i>	gi 446334579 ref WP_000412434.1		MEKKLPRIKALLTPGEVAKRSGVAVSALHFYESKGLITSIRNSGNQRRYRRDV LRYVAIIKIAQRIGIPLATIGEAFGLVPEGHTLSAKEWKQLSSQWREELDRRI HTLVALRDELDCIGCGCLSRSDCPLRNPGRDLGEEGTGARLLEDEQN
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2	gi 16767570 ref NP_463185.1	STM4320	MQIGKLAALTGVSI RMLRYYESAGLLHPSRTDTGYRSFSSDVEDIVRRILILN GAGFTLPVVC SLLNCVHAGTSPCEELKAKVREQLAQIDRQFDALSESRLNLNK FLND
<i>Salmonella enterica</i> (1)	gi 447088216 ref WP_001165472.1		MQIGKLAALTGVSI RMLRYYESAGLLHPSRTDTGYRSFSSDVEDIVRRILILN GAGFTLPVVR SLLNCVHAGTSPCEELKAKVREQLAQIDRQFDALSESRLNLNK FLND
<i>Salmonella enterica</i> (2)	gi 555234083 ref WP_023220848.1		MQIGKLAALVTGVSI RMLRYYESAGLLHPSRTDAGYRSFSSDVEDIVRRILILN GAGFTLPVVRGLLNCVHAGTEPCEELKAKVREQLTQIDRQFEALSESRLNLNK FLID
<i>Clostridium difficile</i> P53	gi 548677355 gb ERM46587.1	AdhR	MTISEVSKKYELSDTLRYYERIGLI PPVNRNKS GIRSFTTEEDCEWVNF IKCM RGAGLSIETLIEYVAMFQQGSSTIKARKELLIEQRNQLAKRIEEMQKTLERLN FKIDRYEEGII EKEKVLKSSRNKKMEAVSYE
<i>Clostridium difficile</i> 630	gi 126700809 ref YP_001089706.1		MTISEVSKKYELSDTLRYYERIGLI PPVNRNKS GIRSFTTEEDCEWVNF IKCM RGAGLSIETLIEYVAMFQQGSSTIKARKELLIEQRNQLAKRIEEMQKTLERLN FKIDRYEEGII EKEKVLKSSRNKKMEAVSYE
<i>Clostridium difficile</i>	gi 545005435 ref WP_021397403.1		MTISEVSKKYELSDTLRYYERIGLI PHVNRNKS GIRSFTTEEDCDWVNF IKCM RGAGLSIETLIEYVAMFQQGSSTIKARKELLIEQRNQLAKRIEEMQKTLERLN FKIDRYEEGIVEKEKVLKSSRNKKMEAVSYE
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium str. LT2	gi 16763734 ref NP_459349.1	GoIS	MNIGKAAKASKVSAKMIRYYEQIGLI PAASRTDSGYRAYTQADVNLHFIRRA RDLGFSVAEISDLLNLWNNQSRQSADVKRLAQTHIDELDRRIQNMQHMAQTLK ALIHCCAGDALPDCPILHTLGQPDDSEPEARTGAVLRRPRRHGLAKRL
<i>Salmonella enterica</i>	gi 554959932 ref WP_023204766.1		MNIGKAAKASKVSAKMIRYYEQIGLI PAASRTDSGYRAYTQADVNLHFIRRA RDLGFSVAEISDLLNLWNNQSRQSADVKRLAQTHIDELDRRIQNMQHMAQTLK ALHCCAGDALPDCPILHTLGQPDDSEPEARTGAVLRRPRRHGLAKRL
<i>Salmonella enterica</i> Minnesota str. A4-603	gi 353625269 gb EHC74121.1		MCXXARDLGFSAEISDLLNLWNNQSRQSADVKRLAQTHIDELDRRIQNMQHMAQTLK ALHCCAGDALPDCPILHTLGQPDDSEPEARTGAVLRRPRRHGLAKRL

Espece	Número de acceso al GenBank	Regulador	Secuencia proteica
<i>Pseudomonas putida</i> ND6	gi 38638567 ref NP_943153.1	PbrR	MRIGQLAQLVGVETQTIRFYEQQGLLPPPPDRQDNGYRVYTEKHGEGGLAFIRRC RILGLSLAEIHELQSYEDDPHQCTAVNALLDDHISHVRSQITALQALEKQLV SLRASCNDDREVEACGVLAGISEGNMHQQ
<i>Pseudomonas</i> sp. TJI-51	gi 497371961 ref WP_009686174.1		MRIGQLAQLVGVETQTIRFYEQQGLLPPPPDRQDNGYRVYTEKHGEGGLAFIRRC RILGLSLAEIHELQSYEDDPHQCTAVNALLDDHISHVRSQITALQALEKQLV SLRASCNDDREVEACGVLAGISEGNMHQQ
<i>Acinetobacter baumannii</i> AYE	gi 169797521 ref YP_001715314.1		MRRNPMRIGQLAQLVGVETQTIRFYERQGLLPPPPGRQENGYRVYTEKHVERLA FIRRCRILDLSLAEIHELKRYQDDPHQCTAVNALLDDHISHVRSQITALQAL EKQLVSLRARCNDREVEACGVLAGISEGSMHQQ
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. subtilis str. 168	gi 16080713 ref NP_391541.1	Mta	MKYQVKQVAEISGVSIRTLHHYDNIPELLNPSALTDAGYRLYSDADLERLQQIL FFKEIGFRLDEIKEMLDHPNFDRAALQSQKEILMKKKQRMDEMIQTIDRTLL SVDGGETMNKRDLFAGLSMKDIEEHQQTAYAEVRKLYGKEIAEETEKRTSAYS ADDWRTIMAEFDSIYRRIAARMKHGPDDAEIQAAVGAFRDHICQYHYDCTLDI FRGLGEVYITDERFTDSINQYGEGLAAFLREAI I IYCDHQENPRP
<i>Bacillus subtilis</i>	gi 516292719 ref WP_017696026.1		MKYQVKQVAEISGVSIRTLHHYDNIPELLNPSALTDAGYRLYSDADLERLQQIL FFKEIGFRLDEIKEMLDHPNFDRAALQSQKEILMKKKQRMDEMIQTIDRTLL SVDGGETMNKRDLFAGLSMKDIEEHQQTAYAEVRKLYGKEIAEETEKRTSAYS ADDWSTIMAEFDSIYRRIAARMKHGPDAAEVQAAVGAFRDHICQYHYDCTLDI FRGLGEVYITDERFTDSINQYGEGLAAFLREAI I IYCDHQENPRP
<i>Bacillus subtilis</i> BSn5	gi 321313208 ref YP_004205495.1		MKYQVKQVAEISGVSIRTLHHYDNIPELLNPSALTDAGYRLYSDADLERLQQIL FFKEIGFRLDEIKEMLDHPNFDRAALQSQKEILMKKKQRMDEMIQTIDRTLL SVDGGETMNKRDLFAGLSMKDIEEHQQTAYAEVRKLYGKEIAEETEKRTSAYS ADDWSSIMAEFDSIYRRIAARMKHGPDAAEIQAAVGAFRDHICQYHYDCTLDI FRGLGEVYITDERFTDSINQYGEGLAAFLGDAI I IYCDHQENPRP

# Resultados



# Capítulo I

*Co-evolución de selectividad sensor/operador en metaloreguladores transcripcionales de la familia MerR*

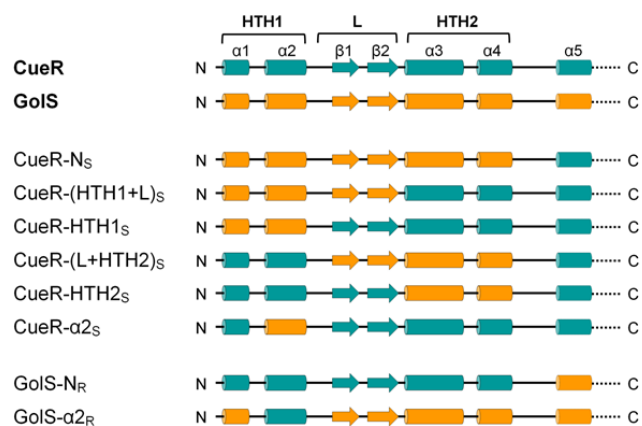
## Resultados

### 1. El reconocimiento selectivo sensor/operador está dirigido por residuos de aminoácidos en la hélice- $\alpha 2$ de la proteína sensora

En *Salmonella* Typhimurium, los metalo-reguladores transcripcionales CueR y GolS, ambos pertenecientes a la familia MerR, son capaces de distinguir sus operadores blanco de aquellos del regulador parólogo mediante el reconocimiento selectivo de dos bases nucleotídicas correspondientes a las posiciones 3' y 3 respecto del centro de la secuencia operadora (Pérez Audero y col., 2010). Para identificar la región responsable de la selectividad sensor/operador diseñamos mutantes quimeras de CueR y GolS en las que se reemplazaron diferentes dominios de un regulador por los respectivos fragmentos del regulador parólogo. Haciendo uso de la técnica de megaprimer, combinada con la técnica de SOE-PCR, se sustituyeron la secuencia N-terminal completa, dos fragmentos de la región HTH1, dos fragmentos de la región HTH2 y la hélice- $\alpha 2$  de CueR por los respectivos motivos conservados en GolS. De manera similar, se reemplazaron el dominio N-terminal completo y la hélice- $\alpha 2$  de GolS por los de CueR (Fig. 23).

Todas estas quimeras se clonaron en el vector de expresión pSU36, bajo el control un promotor inducible por IPTG. El nivel de actividad transcripcional se determinó por medio de ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en una cepa de *S. Typhimurium*  $\Delta gol \Delta gesABC \Delta cueP \Delta copA cueR::cm$  o en una cepa de *E. coli* (W3110)  $\Delta lacZ \Delta copA cueR::cm$ , ambas transformadas con plásmidos reporteros derivados del vector pMC1871 que expresan el gen *lacZ* bajo el control de los promotores de *copA* y *golB*, y los vectores que llevan las diferentes versiones de los reguladores quimeras. (El uso de cepas

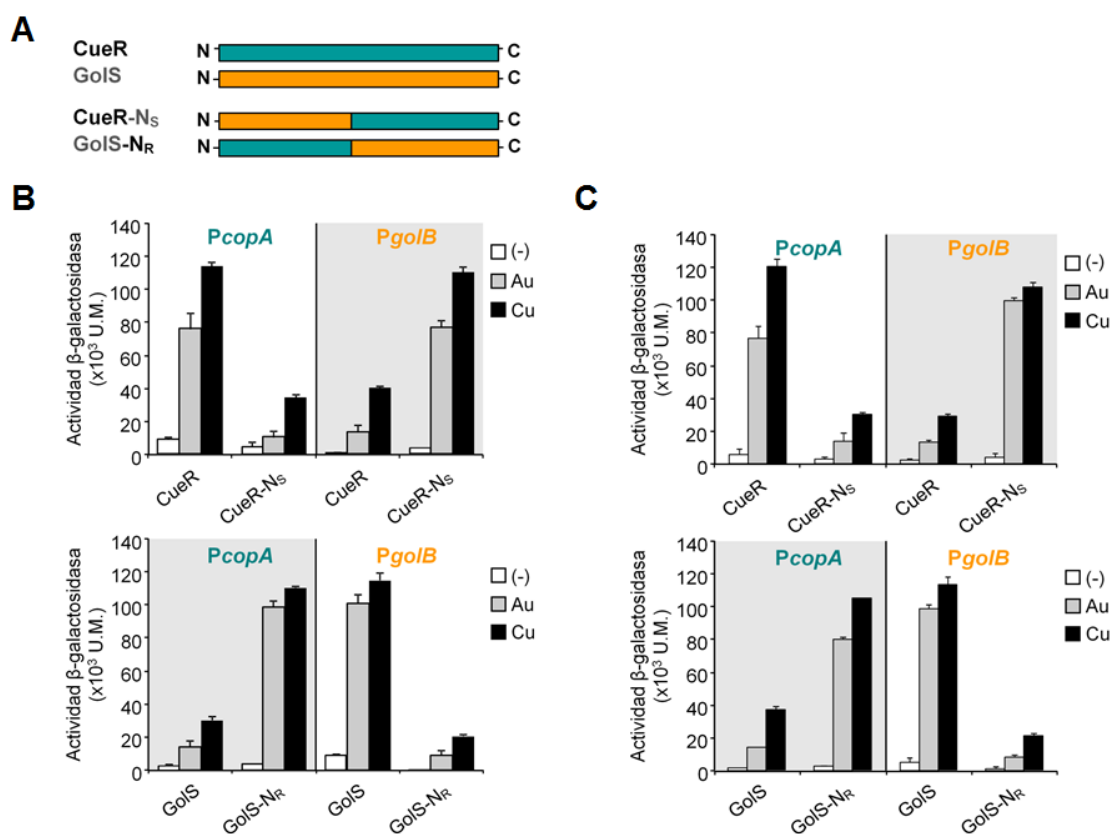
**Fig. 23**



**Fig. 23: Representación esquemática de los reguladores quiméricos.** Sustitución de distintos fragmentos del N-terminal de un regulador por los respectivos fragmentos del regulador parólogo. En verde se indican los dominios de CueR y en naranja, los de GolS.

mutantes delecionadas en el gen *copA* contribuyó a minimizar diferencias en los niveles intracelulares de cobre como consecuencia de la activación parcial del transportador de este metal por los distintos reguladores quiméricos). Los reguladores quimeras CueR-N<sub>S</sub> (**CueR** con el dominio **N**-terminal de **GolS**) y GolS-N<sub>R</sub> (**GolS** con el dominio **N**-terminal de **CueR**), que poseen la sustitución completa de sus dominios N-terminal desde Met-1 a Asn-68, manifestaron un patrón de inducción similar al del regulador parálogo silvestre (**Fig. 24**). Es decir, CueR-N<sub>S</sub> fue capaz de activar eficientemente la expresión del gen reportero bajo el control del promotor *PgolB*, en tanto que perdió capacidad de activar su promotor nativo *PcopA*, adoptando un perfil de inducción similar al de GolS silvestre. GolS-N<sub>R</sub> también mostró un cambio de selectividad en el

**Fig. 24**



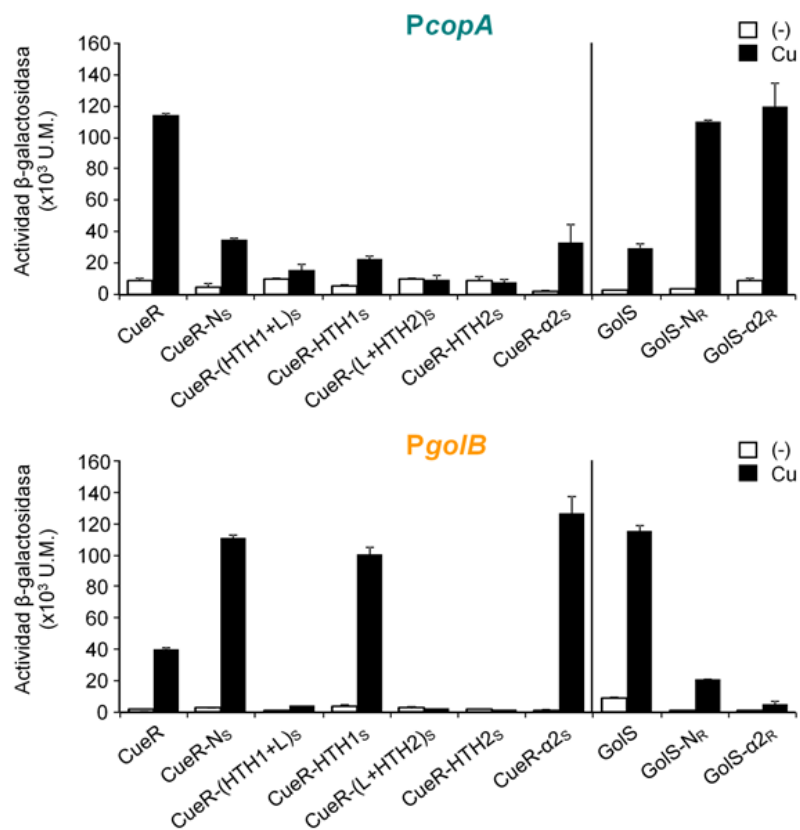
**Fig. 24: El dominio N-terminal es responsable del reconocimiento selectivo sensor/operador.**

**A.** Representación esquemática de los reguladores CueR y GolS, y de las proteínas quiméricas CueR-N<sub>S</sub> y GolS-N<sub>R</sub>. En verde se indican los dominios de CueR y en naranja, los de GolS. **B-C.** Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller) de fusiones reporteras con el promotor regulado por CueR (*PcopA*) o por GolS (*PgolB*). Las células, todas derivadas de W3110  $\Delta lacZ \Delta copA cueR::cm$  (**B**) o de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028  $\Delta gol \Delta gesABC \Delta cueP \Delta copA cueR::cm$  (**C**), transformadas con el regulador silvestre o quimera de CueR y GolS, se crecieron toda la noche en medio LB en ausencia (-) o en presencia de 10  $\mu M$  AuHCl<sub>4</sub> (Au) o 100  $\mu M$  CuSO<sub>4</sub> (Cu). Los valores corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.



reconocimiento de operador, actuando como un mejor inductor del promotor nativo de CueR *PcopA*, que de su propio promotor *PgolB*. El mismo perfil de activación se observó en una cepa de *E. coli* W3110  $\Delta lacZ \Delta copA cueR::cm$  (Fig. 24-B) o de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028  $\Delta gol \Delta gesABC \Delta cueP \Delta copA cueR::cm$  (Fig. 24-C). Como se obtuvieron esencialmente los mismos resultados con los dos metales (Au y Cu) en ambas cepas y nuestro análisis se focaliza en el estudio de la interacción del regulador con el ADN, decidimos continuar la caracterización de estos reguladores transcripcionales sólo en presencia de Cu y empleando la cepa de *E. coli* W3110  $\Delta lacZ \Delta copA cueR::cm$  como modelo celular debido a que, al carecer ésta naturalmente del regulón *gol*, ofrece un entorno celular más simple que el de *Salmonella* que contiene dos sistemas de detoxificación similares (*cue* y *gol*). Estos resultados son

Fig. 25



**Fig. 25: La hélice-α2 es la mínima unidad estructural responsable de la especificidad en el reconocimiento sensor/operador.** Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller) de fusiones reporteras con el promotor regulado por CueR (*PcopA*) o por GolS (*PgolB*). Las células (todas derivadas de W3110  $\Delta lacZ \Delta copA cueR::cm$ ) transformadas con el regulador silvestre o quimera de CueR o GolS, se crecieron toda la noche en medio LB en ausencia (-) o en presencia de 100 μM  $CuSO_4$  (Cu). Los valores corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

indicativos que el dominio de selectividad al operador está ubicado en la región N-terminal del regulador y por lo tanto nos centramos en la disección de este dominio para acotar la región responsable de la selectividad.

Al igual que CueR-N<sub>S</sub>, los reguladores mutantes CueR-HTH1<sub>S</sub> y CueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub>, con el primer motivo HTH (desde Met-1 a Lys-23) o con la hélice- $\alpha$ 2 (desde Thr-13 a Lys-23) de GolS, manifestaron un patrón de inducción del gen reportero similar al de GolS silvestre (**Fig. 25**). Estas proteínas híbridas mostraron mejor activación del promotor *PgolB* y disminución en el nivel de activación a partir del operador nativo *PcopA* en comparación con el regulador CueR silvestre, sugiriendo que la selectividad de operador reside en la hélice- $\alpha$ 2 del dominio N-terminal. Además, el reemplazo equivalente de la hélice- $\alpha$ 2 de GolS por la de CueR resultó en un regulador transcripcional con un perfil de activación semejante al de CueR silvestre, capaz de inducir la expresión del gen reportero con mayor eficiencia desde el promotor *PcopA* que desde *PgolB* (**Fig. 25**). Las otras construcciones quiméricas de CueR con reemplazo del bucle  $\beta$ 1- $\beta$ 2 o del motivo HTH2 por los correspondientes motivos de GolS, CueR-HTH2<sub>S</sub>, CueR-(HTH1+L)<sub>S</sub>, o CueR-(L+HTH2)<sub>S</sub>, resultaron en reguladores poco activos o incapaces de activar la expresión reportera ya sea desde *PcopA* o *PgolB* (**Fig. 25**). La inactividad de estos constructos puede ser consecuencia de su incapacidad para transducir intramolecularmente la señal inductora desde el dominio sensor de un monómero al dominio de unión al ADN del otro monómero, ya que en todos los casos descartamos desnaturalización proteica mediante ensayos de dicroísmo circular. Decidimos no continuar profundizando en el estudio de estos mutantes debido a los resultados con los reguladores mutantes CueR-HTH1<sub>S</sub> y CueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub> (**Fig. 25**).

## 2. Caracterización *in vitro* de la interacción de cada regulador transcripcional con fragmentos de los promotores de genes de los regulones *gol* y *cue*

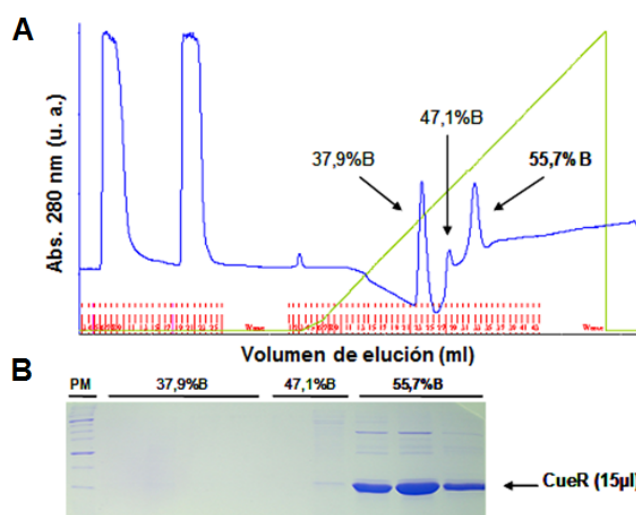
Para verificar la importancia de la hélice- $\alpha$ 2 en el reconocimiento selectivo de operador, llevamos a cabo ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) empleando sondas derivadas de las regiones promotoras de *copA* o *golB* a las que incubamos con las proteínas silvestres o quiméricas CueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub> o GolS- $\alpha$ 2<sub>R</sub> purificadas (**Figs. 26 y 27-A**). CueR- $\alpha$ 2<sub>S</sub> mostró una ganancia importante de afinidad por el fragmento de ADN que contiene la región promotora de *golB* y observamos, a su vez,

que fue necesaria una concentración siete veces mayor de este regulador quimera para lograr un retardo del fragmento de ADN que contiene al promotor *PcopA* comparable al obtenido con CueR silvestre. *GolS- $\alpha_2R$* , por el contrario, ganó afinidad por la región promotora *PcopA*, asemejando su comportamiento al de CueR silvestre, en tanto que mostró menor afinidad por el promotor *PgolB* que el regulador parental *GolS* (**Fig. 27-A**).

La afinidad de unión para cada par regulador/operador fue estimada por anisotropía de fluorescencia. Para este ensayo se emplearon sondas de ADN doble hebra de 41 pares de bases de longitud marcadas con fluoresceína, que abarcan las secuencias operadoras de *copA* y *golB* (**Tabla 3 - Materiales y Métodos**). Cada una de estas sondas fue titulada con concentraciones crecientes de CueR, o de *GolS*, o de las variantes mutantes CueR- $\alpha_2S$  o *GolS- $\alpha_2R$* . Las curvas de titulación para cada par sensor/operador se muestran en la **Fig. 27-B**. Las curvas para *GolS/PgolB* y *GolS- $\alpha_2R$ /PcopA*

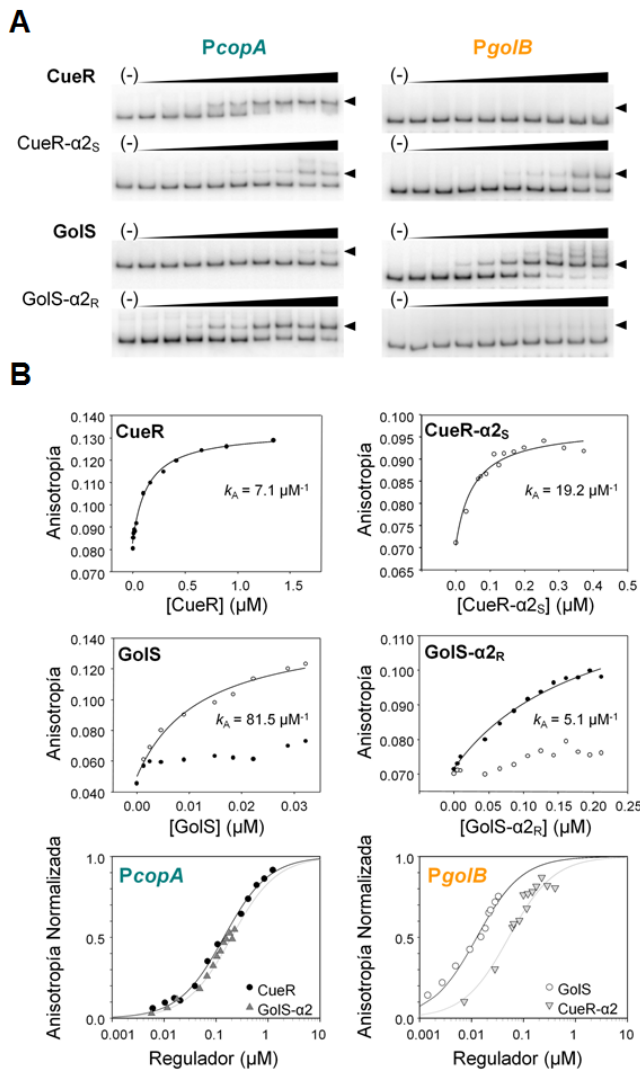
no llegan a saturación debido a que estas dos proteínas sufren agregación a altas concentraciones. Este comportamiento se evidencia con incrementos exacerbados en los valores de anisotropía provocados por la dispersión de la luz generada por partículas de alto peso molecular a concentraciones proteicas mayores que las consideradas para determinar afinidad y reportadas en la **Fig. 27-B**. Los valores de anisotropía observados a concentraciones saturantes de las dos variantes de CueR son 0,102 y 0,133. Los valores obtenidos del ajuste de las medidas para los complejos con las dos variantes de

**Fig. 26**



**Fig. 26: Perfil de purificación de CueR.** A. El regulador silvestre CueR, como así también el regulador parálogo *GolS* y los mutantes CueR- $\alpha_2S$  y *GolS- $\alpha_2R$*  fueron purificados por cromatografía de afinidad por medio de la unión de los mismos a una matriz de heparina y posterior elución con un gradiente de NaCl (solución B - verde). El protocolo de purificación fue puesto a punto para cada regulador ([IPTG] empleada en la inducción del cultivo, pH, [NaCl] y tiempo de elución, entre otros – ver sección 17 de *Materiales y Métodos*). A modo de ejemplo, sólo se muestra el perfil de purificación para CueR silvestre. B. Gel de poliacrilamida teñido con Azul Brillante de Coomassie R. Las bandas proteicas corresponden a 15  $\mu$ l del eluato, obtenido a una concentración aproximada de solución B del 56 % (equivalente a una concentración de NaCl de 0,5 M). Los picos de absorbancia a 280 nm observados a menores concentraciones de solución B (37,9 % y 47,1 %) podrían deberse a impurezas o a burbujas de aire.

Fig. 27



**Fig. 27: El reemplazo de la hélice- $\alpha 2$  cambia la selectividad de operador.** **A. Ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).** Se emplearon 6 fmoles de sonda amplificada por PCR y marcada con  $^{32}P$  en su extremo 3', correspondientes a las regiones promotoras de *copA* o *golB*, y las proteínas CueR, CueR- $\alpha_{2S}$ , GoIS o GoIS- $\alpha_{2R}$  purificadas, como se indica en cada caso. Los reguladores silvestres y mutantes se emplearon en concentraciones finales de 0, 0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.250, 0.500, 0.750 y 1.000  $\mu M$  con *PcopA*, y 0, 0.002, 0.004, 0.012, 0.025, 0.050, 0.100, 0.250, 0.500 y 1.000  $\mu M$  con *PgolB*. El complejo proteína-ADN se indica en cada caso (**▲**). **B. Anisotropía de fluorescencia.** Los valores de anisotropía se midieron en función de la cantidad de proteína agregada al sistema de reacción y las constantes de asociación ( $k_A$ ) se obtuvieron del ajuste por regresión no lineal de los mismos:  $f = r_f + (r_b - r_f) \cdot (k_A \cdot x) / (1 + k_A \cdot x)$ .  $r_f$  y  $r_b$  representan los valores de anisotropía en ausencia de regulador y a concentraciones saturantes del mismo, respectivamente.  $x$  simboliza la concentración de proteína agregada. En cada caso, el oligo doble hebra *PcopA* (**●**) o *PgolB* (**○**) se encuentra marcado con fluoresceína en el extremo 5' de la hebra complementaria. Las constantes de disociación ( $k_D = 1/k_A$ ) de los cuatro reguladores para cada una de las secuencias operadoras fueron determinadas expresando los valores de anisotropía normalizados  $[(k_A \cdot x) / (1 + k_A \cdot x)]$  en función de la concentración del regulador en escala logarítmica.

GoIS son 0,133 y 0,147, estos últimos cercanos a los valores obtenidos para CueR. Asumiendo la formación de complejos similares con ambas proteínas, podemos concluir que los valores de saturación extrapolados son coherentes para el sistema físico del ensayo. Con esta información, las constantes de equilibrio ( $k_D$ ) calculadas para las interacciones CueR/*PcopA* y GoIS- $\alpha_{2R}$ /*PcopA* fueron  $141 \pm 15$  nM y  $198 \pm 49$  nM, respectivamente. De manera similar, los valores de  $k_D$  estimados para las interacciones GoIS/*PgolB* y CueR- $\alpha_{2S}$ /*PgolB* fueron  $12 \pm 3$  nM y  $52 \pm 12$  nM, respectivamente. Las constantes de equilibrio para los complejos GoIS/*PcopA*, CueR- $\alpha_{2S}$ /*PcopA*, CueR/*PgolB* y GoIS- $\alpha_{2R}$ /*PgolB* no pudieron ser estimadas como consecuencia de la baja afinidad de estas interacciones, impidiendo la adquisición de datos a concentraciones saturantes de las proteínas, que por lo tanto imposibilitó el ajuste de los puntos experimentales en

cada caso. Sin embargo, las afinidades de unión para las interacciones heterólogas GolS/*PcopA* y CueR/*PgolB* previamente reportadas (Pérez Audero y col., 2010) fueron al menos de uno o dos órdenes de magnitud inferiores que las afinidades determinadas para las interacciones nativas CueR/*PcopA* y GolS/*PgolB*, respectivamente.

Esta información indica que las mutantes CueR- $\alpha 2_S$  y GolS- $\alpha 2_R$  exhiben una mayor afinidad de unión al promotor heterólogo en detrimento de sus secuencias operadoras nativas respecto de las proteínas parentales, simulando el comportamiento del regulador parálogo. En conclusión, estos resultados demuestran que la especificidad sensor/operador reside en la hélice- $\alpha 2$  de estos factores de transcripción.

### 3. Los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 16 y 19 del sensor determinan el reconocimiento de la secuencia blanco

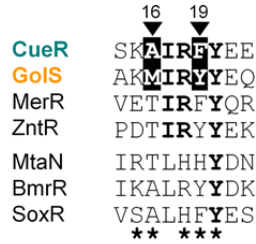
Decidimos llevar a cabo un análisis más detallado de la región de la hélice- $\alpha 2$  con el fin de identificar los residuos de aminoácidos que dirigen el reconocimiento específico del operador. Considerando que muchos de los miembros de la familia MerR emplean un mecanismo de distorsión del ADN similar para activar la transcripción (Brown y col., 2003; Ma y col., 2009; Summers, 2009 y Chen y col., 2010 – ver además sección 4.3.1 de *Introducción*), incluimos en el análisis la secuencia de la región  $\alpha 2$  predicha para los reguladores MtaN, BmrR y SoxR (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Newberry y Brennan, 2004; Watanabe y col., 2008). Estos últimos son reguladores de la familia MerR, pero no sensores de metales, de los que se dispone de información estructural del regulador unido a su secuencia nucleotídica blanco. Incluimos también la región  $\alpha 2$  predicha para los reguladores de respuesta a metal MerR y ZntR. Nos focalizamos en aquellos residuos de aminoácidos que, de acuerdo con los estudios cristalográficos realizados con MtaN, BmrR y SoxR, podrían establecer enlaces puente-hidrógeno o contactos del tipo van der Waals con el ADN; estos son los residuos correspondientes a las posiciones 15, 16, 18, 19 y 20 relativas a CueR (**Fig. 28-A**). De este alineamiento observamos que la Tyr-20 de CueR está conservada en todos los sensores analizados; los residuos Ile-17 y Arg-18 están presentes en los sensores de metal pero no en los sensores homólogos que responden a señales de otra naturaleza; mientras que el residuo de Lys en la posición 15 de CueR y GolS no está conservado en otros metalo-reguladores. Los residuos correspondientes a las posiciones 16 y 19

difieren entre GolS y CueR. Por lo tanto, procedimos a examinar la identidad de estos residuos en los diferentes homólogos de CueR y GolS que se caracterizaron previamente en el laboratorio para sus selectividades de operador (Pérez Audero y col., 2010). Como se muestra en la **Fig. 29**, todas las proteínas del tipo GolS para las cuales se demostró o propuso interacción con secuencias operadoras del tipo *gol* conservan un residuo de Met en la posición 16, en tanto que en los homólogos de CueR se observa la presencia de Ala, Ser o Thr, pero nunca Met, en esta posición. La identidad del residuo en la posición 19 está menos conservada, pero interesantemente, los reguladores homólogos a CueR más cercanos conservan una Phe en dicha posición, mientras que los xenólogos más cercanos a GolS presentan una Tyr.

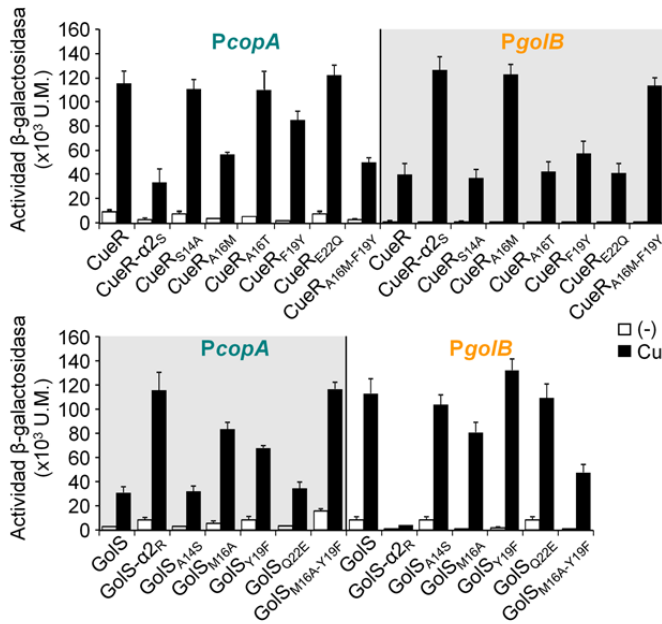
En vista a estas observaciones, construimos las versiones mutantes simples y dobles de CueR y GolS, reemplazando los residuos de GolS de las posiciones 16 y/o 19 por aquellos presentes en CueR y viceversa, y ensayamos su habilidad de activar la transcripción desde *PcopA* y *PgolB* en presencia de cobre. (Aunque no se predice interacción con el ADN para los residuos en las posiciones 14 y 22 (**Fig. 28-A**), también analizamos el rol de estos residuos en el reconocimiento selectivo de operador ya que difieren entre los conservados en CueR y GolS.). El perfil de activación inducido por CueR<sub>A16M-F19Y</sub> y por GolS<sub>M16A-Y19F</sub> se asemeja al observado con las mutantes  $\alpha 2$  de CueR y GolS, respectivamente. Ambas mutantes tienen una mejor capacidad de inducción de la transcripción a partir de los promotores heterólogos y una capacidad de inducción disminuida desde las secuencias promotoras innatas en comparación a los reguladores silvestres (**Fig. 28-B**). CueR<sub>A16M</sub> y GolS<sub>M16A</sub> manifestaron patrones de inducción transcripcional similar al de las proteínas mutantes dobles, mientras que el sólo reemplazo del residuo en la posición 19 (CueR<sub>F19Y</sub> y GolS<sub>Y19F</sub>) tuvo un efecto menor en el patrón de reconocimiento de operador (**Fig. 28-B**).

Fig. 28

A



B



C

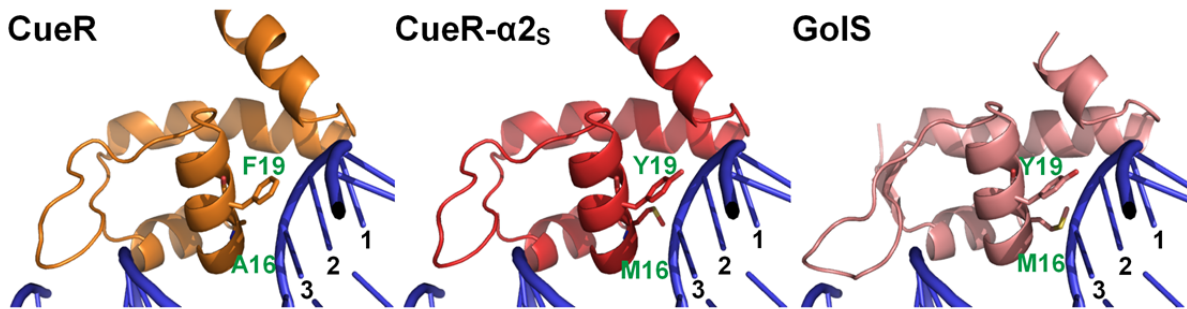


Fig. 28: Los residuos de aminoácidos en las posiciones 16 y 19 de la hélice-α<sub>2</sub> son esenciales para el reconocimiento selectivo de operador. **A.** Motivo consenso para la región de la hélice-α<sub>2</sub> de diferentes metalo-reguladores y otras proteínas MerR. Los residuos en las posiciones 16 y 19 de CueR y GoIS están sombreados en negro (▼), mientras que aquellos residuos conservados en la mayoría de las secuencias están resaltados en negrita. Los residuos que podrían establecer enlaces puente-hidrógeno o contactos del tipo van der Waals con el ADN (residuos correspondientes a las posiciones 15, 16, 18, 19 y 20 relativas a CueR) identificados en las estructuras cristalográficas de los complejos MtaN-ADN, BmrR-ADN y SoxR-ADN están indicados (\*). **B.** Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller) con las fusiones reporteras a *PcopA* o *PgoIB* expresadas en células W3110  $\Delta lacZ \Delta copA cueR::cm$  portadoras de los vectores de expresión con los reguladores silvestres o mutantes para CueR o GoIS, como se indica en cada caso. Las bacterias fueron crecidas toda la noche en medio LB en ausencia de metal (-) o suplementadas con 100 μM CuSO<sub>4</sub> (Cu). Los datos corresponden a los valores promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar. **C.** Modelo estructural para los complejos CueR/, CueR-α<sub>2s</sub>/ o GoIS/ADN. Los residuos de aminoácidos en las posiciones 16 y 19 (verde) se encuentran cercanos y direccionados a las bases nucleotídicas 2 y 3 de la secuencia operatoria. Se muestra la cadena lateral para los residuos 16 y 19 en cada caso.

Fig. 29

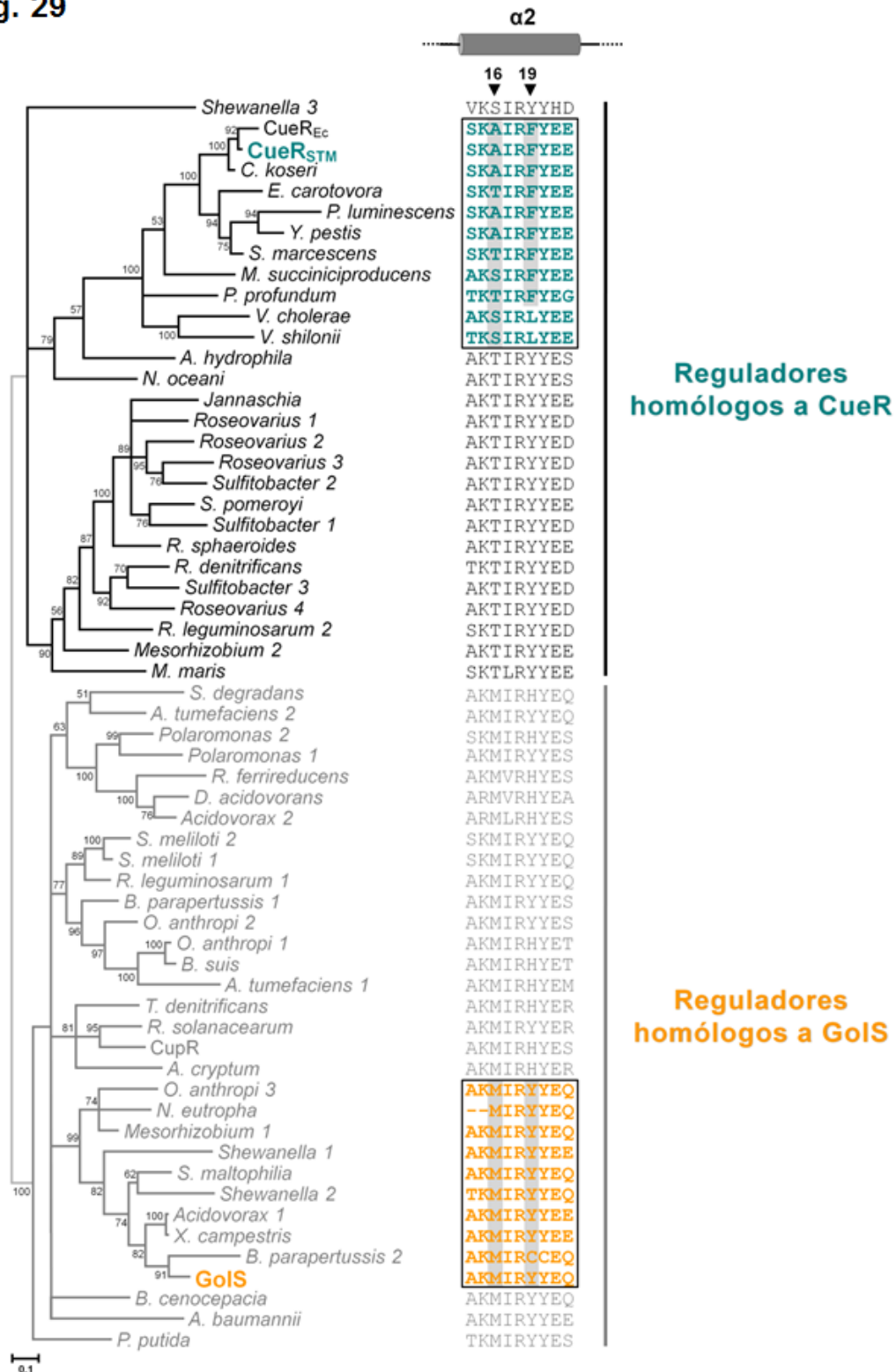


Fig. 29: La identidad de los residuos en las posiciones 16 y 19 está conservada entre proteínas homólogas a CueR y a GolS. Árbol filogenético obtenido por comparación de las secuencias completas de reguladores del tipo CueR (negro) y del tipo GolS (gris). El árbol fue construido por inferencia Bayesiana como fue descrito anteriormente (Pérez Audero y col., 2010). Se detallan las secuencias correspondientes a la hélice-α2 de cada homólogo a CueR y a GolS. Las secuencias de los homólogos más cercanos a CueR y a GolS se muestran recuadradas y resaltadas en color verde y naranja, respectivamente. Los residuos correspondientes a las posiciones 16 y 19 están indicados (▼).



Estos resultados claramente indican que la identidad del residuo en la posición 16 es la principal determinante de la selectividad sensor/operador entre los regulones *gol* y *cue*. Nuestras observaciones también resaltan que el residuo en la posición 19 ajusta de manera fina la selectividad ya que el reemplazo simultáneo de los residuos 16 y 19 manifiesta un mejor perfil de activación que el observado con el sólo reemplazo del residuo en la posición 16, asemejándose aún más al patrón de inducción obtenido con la sustitución de la hélice- $\alpha 2$  completa. Realizamos además la sustitución del residuo Ala-16 de CueR por Thr (conservado en muchos homólogos de este regulador pero ausente en GolS y sus homólogos – **Fig. 29**) y determinamos que no afecta la selectividad de operador (**Fig. 28-B**). Finalmente, y como era de esperar, los reguladores mutantes con sustituciones en los residuos de las posiciones 14 y 22 mostraron un perfil de inducción transcripcional semejante al silvestre (**Fig. 28-B**), indicando que estos residuos no están involucrados en la discriminación de operador.

#### 4. Los residuos en las posiciones 16 y 19 del regulador reconocen las bases selectivas del operador 3' y 3

Actualmente no se dispone de información estructural del reconocimiento de operadores por metalo-reguladores MerR. Por este motivo, y asumiendo que la mayoría de los homólogos MerR interactúan con el ADN de manera similar (Brown y col., 2003; Ma y col., 2009; Summers, 2009 y Chen y col., 2010 – ver además sección 4.3.1 de *Introducción*), utilizamos la estructura cristalográfica del regulador homólogo BmrR unido a su secuencia promotora blanco (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001) para simular la interacción de CueR o GolS con el ADN. El motivo por el cual seleccionamos a BmrR es que, al igual que CueR y GolS, reconoce operadores con un espaciamiento de 19 pb entre las cajas -35 y -10 e interactúa con secuencias diadas simétricas separadas por 1 pb (Watanabe y col., 2008; Pérez Audero y col., 2010). En los modelados estructurales sustituimos los residuos de aminoácidos presentes en la región N-terminal de BmrR (desde el residuo 1 al 88) por aquellos presentes en CueR, CueR- $\alpha 2_s$  o en GolS. Como se muestra en la **Fig. 28-C**, la cadena lateral del residuo 16 tanto en CueR como en GolS está cercana y direccionada hacia la base de la posición 3 desde el centro del operador (Pérez Audero y col., 2010). El reemplazo del grupo metilo de la cadena lateral de la Ala por uno más voluminoso como Met altera posiblemente la orientación del motivo HTH respecto del operador. La cadena lateral del residuo de

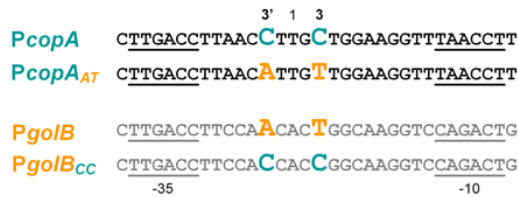
aminoácido en la posición 19 también se mostró orientada hacia una posición intermedia entre las bases nucleotídicas 3 y 4, lo cual refuerza la información experimental acerca del rol de este residuo en la determinación del reconocimiento selectivo de operador.

Para verificar la participación de los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 16 y 19 en la distinción de las bases nucleotídicas del operador situadas en posición 3' y 3, comparamos la capacidad de los reguladores silvestres y mutantes CueR<sub>A16M-F19Y</sub> y GolS<sub>M16A-Y19F</sub> de activar transcripción a partir de los promotores nativos *PcopA* y *PgolB* o de las versiones mutantes *PcopA<sub>AT</sub>* y *PgolB<sub>CC</sub>*. Las versiones mutantes *PcopA<sub>AT</sub>* y *PgolB<sub>CC</sub>* poseen las bases nucleotídicas de las posiciones 3' y 3 sustituidas por aquellas presentes en los operadores heterólogos (Pérez Audero y col., 2010) (**Fig. 30-A**).

La inducción de expresión a partir de los promotores *gol* y *cue* silvestres y mutantes por CueR<sub>A16M-F19Y</sub> es similar a aquella obtenida con GolS, mientras que el perfil de activación de los mismos promotores por GolS<sub>M16A-Y19F</sub> se asemeja al de CueR silvestre (**Fig. 30-B**). Es decir, CueR<sub>A16M-F19Y</sub> fue más eficiente en la activación de la expresión desde *PcopA<sub>AT</sub>* que desde el promotor silvestre *PcopA*. Además, reconoció mejor a la secuencia promotora *PgolB* silvestre, que presenta las bases A y T en las posiciones 3' y 3, respectivamente, que al promotor mutante *PgolB<sub>CC</sub>* con bases C en dichas posiciones, exhibiendo un patrón de inducción similar al de GolS. A su vez, GolS<sub>M16A-Y19F</sub>, al igual que CueR silvestre, reconoció mejor a los promotores que poseen C en las posiciones 3' y 3 de los operadores *gol/cue*, tales como *PcopA* o *PgolB<sub>CC</sub>*, que a *PgolB* y *PcopA<sub>AT</sub>*, ambos promotores con bases A y T en posiciones 3' y 3. En resumen, estos resultados demuestran la importancia del residuo en la posición 16, y la influencia positiva del residuo en posición 19, en la selección de operadores de los regulones *cue* y *gol* de *Salmonella*.

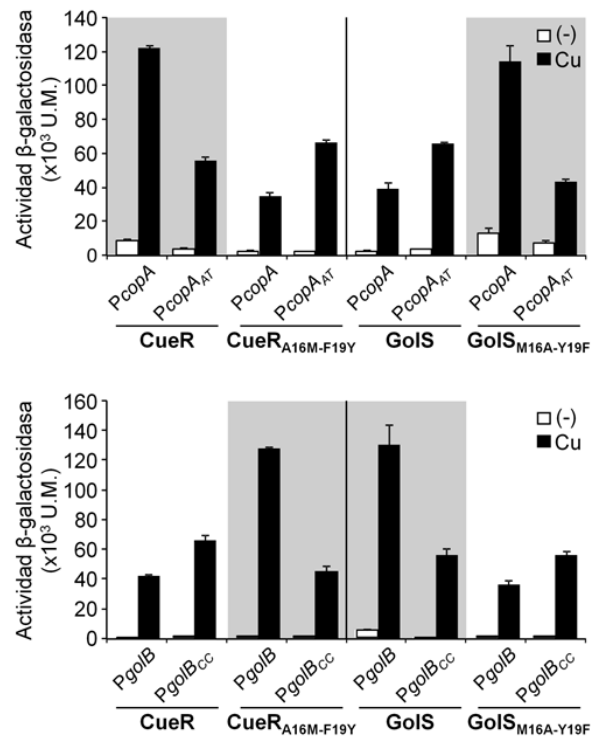
Fig. 30

A



**Fig. 30:** La discriminación de operador entre los promotores reconocidos por CueR y GoIS depende de residuos clave de la hélice- $\alpha 2$  y de bases nucleotídicas determinantes de especificidad de sensor. **A.** Secuencia de los promotores nativos y mutantes de *copA* (verde) y *golB* (naranja). Se indican las bases nucleotídicas que se modificaron en cada caso. **B.** Las actividades  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) fueron determinadas en cepas  $\Delta lacZ \Delta copA cueR::cm$  con las fusiones reporteras a los promotores silvestres (*PcopA* o *PgolB*) o mutantes (*PcopA<sub>AT</sub>* o *PgolB<sub>CC</sub>*), portadoras de los vectores de expresión con los reguladores parentales o mutantes para CueR o GoIS, como se indica en cada caso. Las bacterias fueron crecidas toda la noche en medio LB (-) o en LB suplementado con 100  $\mu$ M  $CuSO_4$  (Cu). Los datos corresponden a los valores promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

B

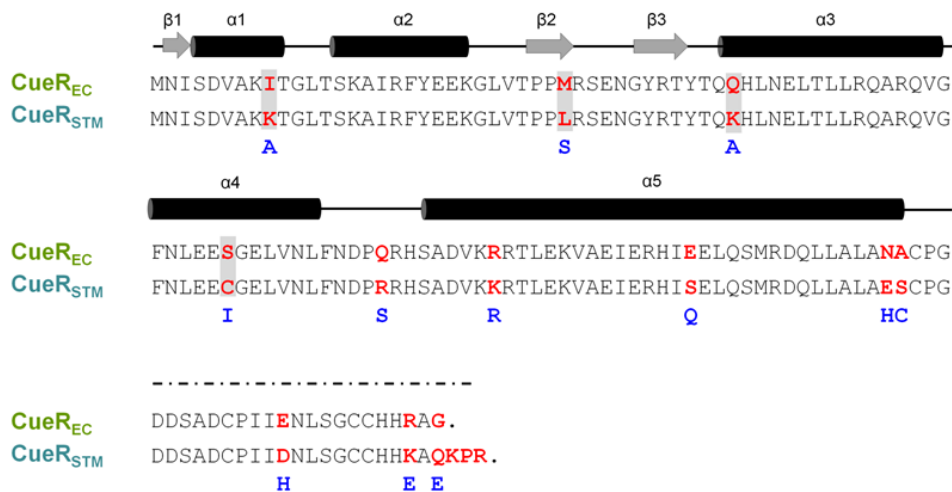


## 5. Diferencias en el dominio N-terminal de unión al ADN de los sensores ortólogos CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> afectan la inducción residual de los genes del regulón *gol*

Paralelamente a la identificación del dominio y los residuos de aminoácidos que dictan la selectividad de operador en los reguladores transcripcionales parálogos CueR y GoIS, se comparó la respuesta a metales y el reconocimiento del ADN de CueR de *S. Typhimurium* (CueR<sub>STM</sub>) con el de su ortólogo en *E. coli* (CueR<sub>EC</sub>). Si bien ambos reguladores poseen un 91% de identidad y desde la hélice- $\alpha 1$  a la hélice- $\alpha 4$  sólo 4 residuos varían en el dominio de unión al ADN (Figs. 17-A y 31), estas diferencias podrían definir afinidades diferentes para los mismos operadores, o influir en los cambios conformacionales requeridos para la activación de los promotores reconocidos por estos reguladores. Alternativamente, diferencias en la concentración intracelular de estos dos reguladores podría provocar variaciones en los niveles de inducción de sus

genes blanco, ya que el efecto regulatorio no sólo depende de la afinidad por el operador, sino también de la concentración intracelular del sensor (Alon, 2007; Balleza y col., 2009). Por lo tanto, estabildades proteicas diferentes o distintos niveles transcripcionales entre estos dos reguladores podría contribuir a la alteración del perfil de activación de los regulones.

**Fig. 31**



**Fig. 31: CueR de *E. coli* (CueR<sub>EC</sub>) y de *S. Typhimurium* (CueR<sub>STM</sub>) son 91% idénticos.** Alineamiento de las secuencias proteicas de CueR<sub>EC</sub> y CueR<sub>STM</sub>. En negro se muestran los residuos de aminoácidos idénticos y en rojo los diferentes entre ambos reguladores. Los residuos sombreados corresponden a aquellos aminoácidos no conservados, ubicados en el dominio N-terminal de unión al ADN (posiciones 9, 30, 42 y 63, respectivamente). Debajo del alineamiento se indican en azul los residuos conservados en GolS para aquellas posiciones donde difieren ambos reguladores CueR en su secuencia aminoacídica. Se muestra también un esquema de las estructuras secundarias correspondientes a cada región proteica.

Los promotores de *cueR<sub>STM</sub>* y *cueR<sub>EC</sub>* no han sido aún caracterizados y sólo se conoce el sitio de inicio de la transcripción para *cueR* de *Salmonella* (Kröger y col., 2012). Además, y a pesar del alto grado de homología entre las regiones codificantes para estos dos genes ortólogos, las regiones corriente arriba de los mismos no presentan conservación de secuencia (**Fig. 32**). Esta diferencia de secuencia entre las regiones promotoras de *cueR<sub>STM</sub>* y de *cueR<sub>EC</sub>* podría resultar en una disparidad en la transcripción de estos genes manifestándose en diferencias en la concentración efectiva de ambos reguladores.

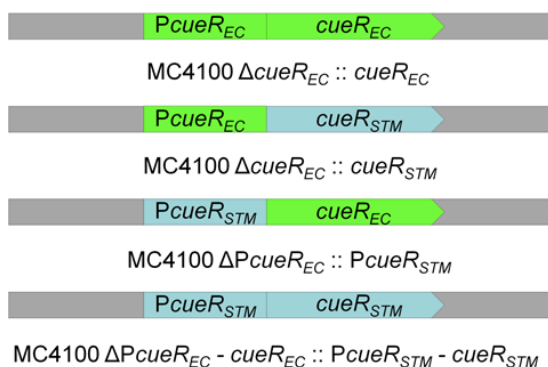
Fig. 32



**Fig. 32:** Comparación de las regiones promotoras de los genes *cueR* de *E. coli* y *Salmonella*. Se indican en rojo el sitio de inicio de la transcripción para *cueR<sub>STM</sub>* (Kröger y col., 2012) y un posible sitio +1 para *cueR<sub>EC</sub>*, determinado por análisis bioinformático. Los sitios de inicio de la traducción se muestran en verde y las regiones sombreadas en gris representan los promotores probables de ambos genes, predichos mediante el programa Neural Network Promoter Prediction para procariontes ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)).

Para analizar el comportamiento de CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> en la inducción de los genes del regulón *cue* y del regulón parálogo *gol*, en una cepa de *E. coli* MC4100 se sustituyó el promotor y/o la región codificante de *cueR<sub>EC</sub>* por la región equivalente de *cueR<sub>STM</sub>* de *Salmonella*, de manera tal de expresar el regulador nativo de *E. coli* CueR<sub>EC</sub> o su ortólogo CueR<sub>STM</sub> desde sus respectivas secuencias promotoras o desde el promotor del otro regulador, pero siempre en un mismo entorno celular (**Fig. 33**) (estos constructos se hicieron en colaboración con el Lic. Mauricio Grisolia). Estas cepas fueron transformadas con plásmidos derivados del vector pMC1871 que contienen al gen reportero *lacZ* bajo el control de los promotores de *copA* y *golB*, y crecidas toda la noche a 37 °C con agitación en medio LB sin metal o suplementado con 10 µM AuHCl<sub>4</sub> o 1 mM CuSO<sub>4</sub>. El nivel de activación de los genes reporteros se determinó mediante ensayos de actividad β-galactosidasa.

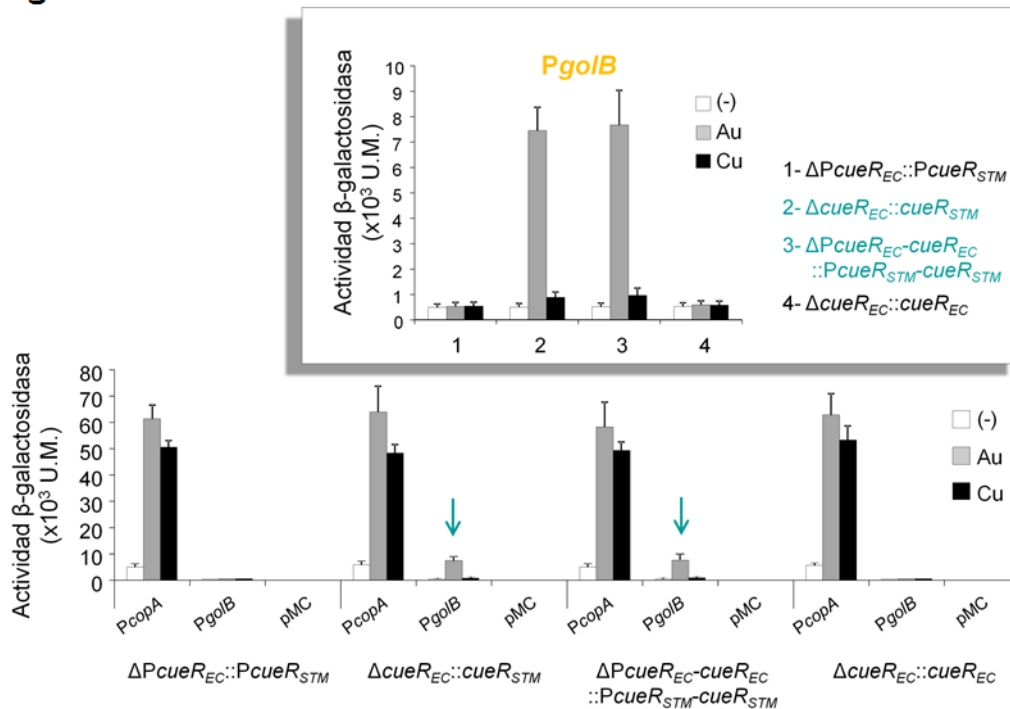
Fig. 33



**Fig. 33:** Esquema de las cuatro combinaciones cromosomales promotor – gen diseñadas para analizar el efecto de la fuerza promotora sobre la actividad transcripcional de los reguladores CueR<sub>EC</sub> y CueR<sub>STM</sub>. Las construcciones fueron realizadas en colaboración con el Lic. Mauricio Grisolia (según las instrucciones detalladas en el apartado 11 de *Materiales y Métodos* de su trabajo de Tesina, año 2009).

El comportamiento de CueR<sub>STM</sub> frente a *PcopA* resultó ser similar al de CueR<sub>EC</sub>, tanto en ausencia como presencia de ambos metales, independientemente del promotor bajo el cual se expresara (*PcueR<sub>STM</sub>* o *PcueR<sub>EC</sub>*). Sin embargo, a pesar del alto grado de identidad entre estos dos reguladores, sólo CueR<sub>STM</sub> fue capaz de reconocer el promotor *PgolB* (secuencia blanco de *GolS*), aunque con baja afinidad y sólo en presencia de AuHCl<sub>4</sub> (**Fig. 34**). Este mismo resultado se obtuvo sobre-expresando ambos reguladores bajo el control del promotor *Plac* inducible por IPTG, desde un plásmido de número de copias medio (*pSU36::cueR<sub>EC</sub>* y *pSU36::cueR<sub>STM</sub>*) en una cepa de *E. coli* W3110  $\Delta lacZ$   $\Delta cueR$  transformada con los mismos vectores reporteros que expresan *lacZ* bajo el control transcripcional de los promotores *PcopA* y *PgolB*. A bajas concentraciones de inductor se observó esencialmente el mismo comportamiento que cuando los reguladores están codificados en el cromosoma. Nuevamente, CueR<sub>EC</sub> fue incapaz de activar la transcripción del gen reportero *lacZ* a partir del promotor de *golB*, aún en altas concentraciones de inductor. Estos resultados descartan diferencias en los niveles transcripcionales del regulador. Las diferencias en la inducción de *PgolB* mediada por CueR<sub>EC</sub> o por CueR<sub>STM</sub> podrían explicarse, en parte, por variaciones en la estabilidad proteica y consecuente discrepancia en la concentración intracelular efectiva de regulador. Por el Principio de Le Châtelier, un aumento en la concentración del regulador libre desplaza al mismo hacia la formación del complejo regulador-promotor produciendo, en consecuencia, un aumento en la actividad transcripcional del promotor blanco. Alternativamente, la diferente capacidad de inducción de *PgolB* podría ser causada por las diferencias en la secuencia de aminoácidos de estos dos reguladores (**Fig. 31**), que podrían estar modificando o la afinidad por el ADN, o la capacidad de transducir intramolecularmente la señal inductora desde el dominio sensor al dominio de unión al ADN, o la capacidad para formar el complejo abierto.

Fig. 34

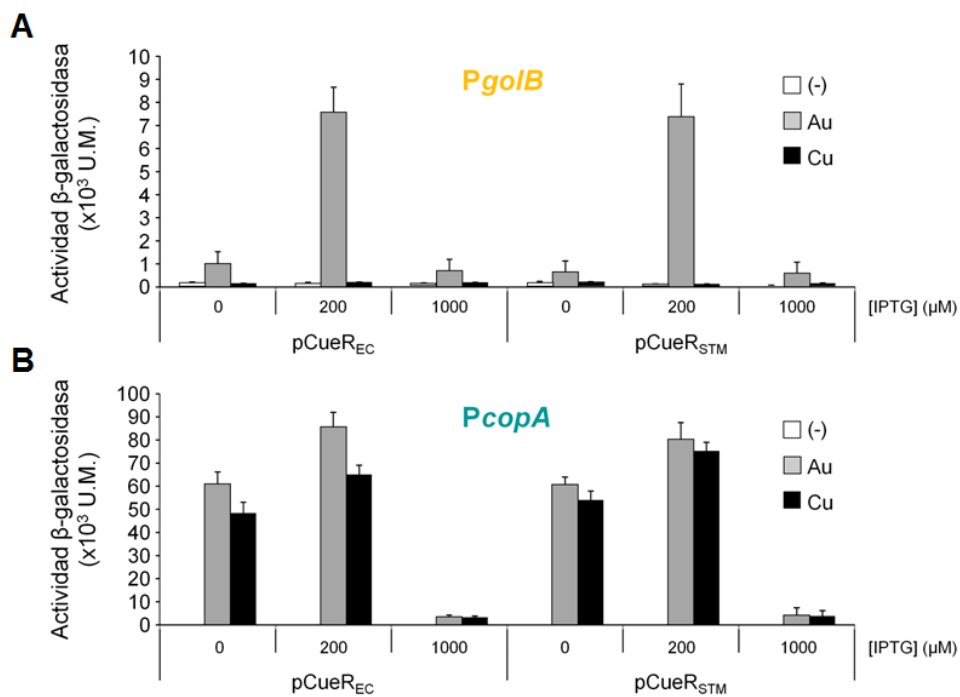


**Fig. 34:** En *E. coli*, los reguladores homólogos  $CueR_{EC}$  y  $CueR_{STM}$  no se comportan de manera idéntica en la inducción de los genes del regulón *gol*. Activación transcripcional (ensayo de actividad  $\beta$ -galactosidasa) de fusiones reporteras a los promotores *PcopA* o *PgolB* en una cepa de *E. coli* (MC4100), mediada por  $CueR_{EC}$  o  $CueR_{STM}$ , cada uno expresado desde el cromosoma bajo el control de su propio promotor o desde el promotor del regulador homólogo. En el recuadro superior derecho se muestran, en una escala adecuada, los valores de actividad transcripcional obtenidos para el promotor del gen *golB*. Las medidas se realizan a partir de las cepas en fase estacionaria cultivadas en medio LB con agitación durante toda la noche a 37 °C, sin el agregado de metal, con 10  $\mu$ M  $AuHCl_4$  (Au) o 1mM  $CuSO_4$  (Cu), según se indica. La actividad se expresa en unidades Miller. Los resultados muestran el promedio de 5 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Se exponen como control los mismos ensayos obtenidos con el vector pMC1871 vacío. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

Se analizó la capacidad de los reguladores  $CueR_{STM}$  y  $CueR_{EC}$  para activar la transcripción de reporteros bajo control de *PcopA* y de *PgolB*, en una cepa de *Salmonella* delecionada en *golS* y en *cueR\_{STM}*. A diferencia de lo observado en *E. coli*, la sobre-expresión plasmídica de  $CueR_{EC}$  activó la expresión del gen reportero desde el promotor heterólogo *PgolB* de manera similar a lo observado con  $CueR_{STM}$  en ambos entornos celulares, esto es en *E. coli* y en *Salmonella* (Fig. 35). En ambos casos, el agregado de altas concentraciones de inductor de expresión plasmídica (IPTG) afecta negativamente la expresión del gen reportero, posiblemente debido a una disminución de la concentración del metal inductor libre en el citoplasma, producto del secuestro por

parte del exceso del regulador que es a su vez proteína de unión al metal, o bien a un efecto tóxico provocado por el exceso de regulador.

**Fig. 35**



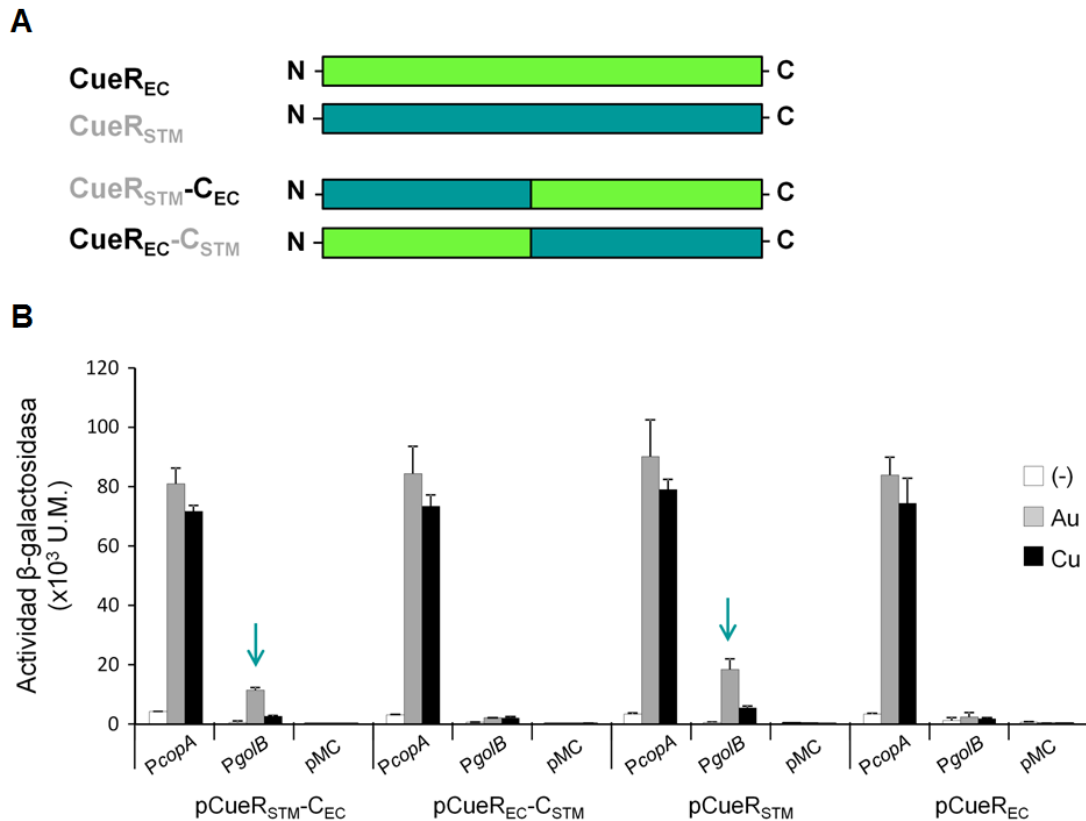
**Fig. 35:** En *Salmonella*, CueR<sub>EC</sub> y CueR<sub>STM</sub> manifiestan el mismo perfil de activación transcripcional. Actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) de fusiones reporteras a los promotores de los genes *golB* (A) y *copA* (B) en una cepa de *S. Typhimurium* (14028)  $\Delta$ *golS cueR::km*, mediada por CueR<sub>EC</sub> o CueR<sub>STM</sub>, cada uno sobre-expresado desde un promotor inducible por IPTG, desde un plásmido de número de copias medio (pSU36). Las medidas se realizaron a partir de las cepas en fase estacionaria cultivadas en medio LB con agitación durante toda la noche a 37 °C, sin el agregado de metal, con 10  $\mu$ M AuHCl<sub>4</sub> (Au) o 1mM CuSO<sub>4</sub> (Cu), y suplementadas con 0  $\mu$ M, 200  $\mu$ M o 1 mM IPTG, según se indica. Los resultados muestran el promedio de 4 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

Esta diferencia de actividad transcripcional entre CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> podría deberse a variaciones en la concentración intracelular de metal entre *E. coli* y *Salmonella*, y/o a factores estructurales intrínsecos a dichos reguladores, tales como la afinidad por la secuencia promotora blanco o por el ión metálico inductor. Para poder discernir entre estas dos posibilidades, se construyeron reguladores quimeras fusionando el dominio N-terminal de unión al ADN (desde Met-1 a Asn-68) de CueR<sub>STM</sub> al fragmento C-terminal (dominio de unión al efector metálico) de CueR<sub>EC</sub> y viceversa. Estas quimeras se clonaron en el vector de expresión pSU36, bajo el control



un promotor inducible por IPTG, como se describió anteriormente para los reguladores silvestres. El nivel de actividad transcripcional se determinó *in vivo* por medio de ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa en una cepa de *E. coli* (W3110)  $\Delta lacZ \Delta cueR$  transformada con los plásmidos reporteros derivados del vector pMC1871 que expresan el gen *lacZ* bajo el control de los promotores de *copA* y *golB*, y los vectores que expresan los reguladores silvestres CueR<sub>EC</sub> y CueR<sub>STM</sub> y quiméricos CueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub> y CueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub>. Como se muestra en la **Fig. 36**, el comportamiento de los reguladores quiméricos se asemeja al del regulador silvestre del cual proviene su dominio N-terminal. Es decir, CueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub> manifiesta un perfil de inducción similar al del regulador silvestre CueR<sub>EC</sub>, lo que indica que es el dominio N-terminal de unión al ADN y no el dominio sensor C-terminal el responsable de conferir la respuesta transcripcional característica de este regulador. Lo mismo se observó con los reguladores CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub>. Por lo tanto, las diferencias entre CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> podrían ser consecuencia, al menos en parte, de sutiles diferencias en sus afinidades por el ADN, o en la transducción intramolecular de la señal, y no parecieran ser debidas a la detección del metal inductor.

Fig. 36



**Fig. 36: El distinto comportamiento entre los reguladores homólogos CueR<sub>EC</sub> y CueR<sub>STM</sub> en la inducción de los genes del regulón *gol* se limita a sus diferencias a nivel del dominio N-terminal de unión al ADN.** **A.** Representación esquemática de los reguladores CueR<sub>EC</sub> y CueR<sub>STM</sub>, y de las proteínas quiméricas CueR<sub>STM-C<sub>EC</sub></sub> y CueR<sub>EC-C<sub>STM</sub></sub>. En verde claro se indican los dominios de CueR<sub>EC</sub> y en verde oscuro, los de CueR<sub>STM</sub>. **B.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa (Unidades Miller) de fusiones reporteras a los promotores P<sub>copA</sub> o P<sub>golB</sub> en una cepa de *E. coli* (W3110)  $\Delta lacZ \Delta cueR$ , mediada por los reguladores silvestres CueR<sub>EC</sub> o CueR<sub>STM</sub>, o los reguladores quiméricas CueR<sub>EC-C<sub>STM</sub></sub> o CueR<sub>STM-C<sub>EC</sub></sub>, cada uno sobre-expresado desde un promotor inducible por IPTG, desde un plásmido de número de copias medio (pSU36). El comportamiento de los reguladores quiméricas se asemeja al del regulador silvestre del cual proviene su dominio N-terminal. Las medidas se realizan a partir de las cepas en fase estacionaria cultivadas en medio LB con agitación durante toda la noche a 37 °C, sin el agregado de metal, con 10  $\mu$ M AuHCl<sub>4</sub> (Au) o 1mM CuSO<sub>4</sub> (Cu), y suplementadas con 200  $\mu$ M IPTG, según se indica. Se muestran como control los mismos ensayos obtenidos con el vector pMC1871 vacío. Los resultados muestran el promedio de 4 ensayos independientes realizados en idénticas condiciones. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

## Discusión

---

### 1. CueR y GolS: evolución selectiva

Los factores transcripcionales deben ser capaces de localizar sus operadores a lo largo de todo el cromosoma, impidiendo su unión improductiva o incluso dañina a sitios ectópicos. Esto resulta particularmente relevante cuando proteínas regulatorias similares que reconocen operadores casi idénticos coexisten en una misma célula. *Salmonella* posee dos metalo-reguladores estructuralmente relacionados pero funcionalmente diferentes, pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales MerR, y que modulan la respuesta celular a la presencia de cantidades tóxicas de iones metálicos monovalentes en el medio ambiente (Checa y Soncini, 2011). Por medio del reensamblaje de la detección de la señal y de las secuencias operadoras reconocidas, el sensor de oro GolS, adquirido probablemente por transferencia horizontal, es capaz de inducir la expresión de sus genes blanco sin interferir con la función de la homeostasis de cobre del regulón *cue*, controlado por el regulador ancestral enterobacteriano CueR. En el trabajo publicado por Pérez Audero y colaboradores (2010) se demostró que la selectividad en el reconocimiento de los operadores blanco de cada regulón por sus reguladores innatos se logra por medio de modificaciones sutiles de las secuencias operadoras (bases nucleotídicas determinantes de especificidad de sensor correspondientes a las posiciones 3' y 3 del operador). Esto también sugiere cambios sutiles en el motivo de unión al ADN en dichos reguladores transcripcionales, tal como se muestra en este Capítulo de Tesis.

Construimos proteínas híbridas entre GolS y CueR para identificar la región que dirige el reconocimiento de operador (**Fig. 23**). Estos estudios permitieron focalizarnos en la hélice- $\alpha 2$  (desde el residuo 14 al 22), que puede definirse como la mínima unidad estructural necesaria para la discriminación de operador entre los regulones *gol* y *cue*. Experimentos *in vitro* confirmaron estas observaciones mostrando que el sólo reemplazo de dicho motivo en cada regulador disminuye su afinidad por los operadores innatos e incrementa la afinidad por los operadores parálogos (**Fig. 27**).

No se dispone actualmente de información estructural de ningún sensor de metal del tipo MerR unido a su secuencia operadora, y en base a la información bioquímica y

genética disponible, se postuló que el mecanismo de distorsión del ADN para la activación transcripcional está conservado entre todos los miembros de la familia (Brown y col., 2003; Ma y col., 2009; Summers, 2009; Chen y col., 2010). Es por este motivo que asumimos que tanto CueR como GolS interaccionan con sus secuencias blanco de manera similar a como lo hacen homólogos MerR que no unen metal para los cuales se dispone de la estructura cristalográfica del complejo proteína-ADN (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Newberry y Brennan, 2004). Esto es, el eje de simetría del dímero de CueR y GolS se dispone enfrentado al surco menor en el centro del palíndromo (posición 1), mientras que la hélice- $\alpha 2$  se acerca al ADN en un segundo surco menor cercano a los surcos mayores adyacentes, en donde se localizan las bases nucleotídicas 3' y 3. Un modelado *in silico* realizado para ambos reguladores, CueR y GolS, destaca a los residuos 16 y 19 como posibles candidatos para dirigir selectividad de reconocimiento de operador (**Fig. 28-C**). El intercambio de estos residuos de aminoácidos demostró que el residuo 16 es clave para reconocimiento selectivo de la base operadora de la posición 3 (**Fig. 28**). En presencia de iones de cobre la mutante CueR<sub>A16M</sub> imitó a GolS en la inducción de la expresión de *PgolB::lacZ* y *PcopA::lacZ* (**Fig. 28-B**). El cambio inverso en el perfil de inducción se detectó con GolS<sub>M16A</sub>. *PcopA::lacZ* alcanzó mayores niveles de inducción con GolS<sub>M16A</sub> que con GolS, en tanto que se logró una menor inducción por cobre de *PgolB::lacZ* con GolS<sub>M16A</sub> que con el sensor nativo de oro.

La contribución del residuo en posición 19 fue auxiliar al cambio del residuo en la posición 16. Los reguladores CueR<sub>F19Y</sub> y GolS<sub>Y19F</sub> exhibieron un patrón de activación intermedio entre el regulador parental y el mutante con su hélice- $\alpha 2$  reemplazada. Sin embargo, su participación al ajuste fino en la interacción sensor/operador se corrobora por la observación de que los reguladores mutantes CueR<sub>A16M-F19Y</sub> y GolS<sub>M16A-Y19F</sub> fueron tan efectivos como los reguladores híbridos CueR- $\alpha 2_S$  y GolS- $\alpha 2_R$ , respectivamente, para activar los promotores controlados por los reguladores parálogos (**Fig. 28-B**). Además, CueR<sub>A16M-F19Y</sub> y GolS<sub>M16A-Y19F</sub> activaron con mayor eficiencia la transcripción del gen reportero desde los promotores con sus bases 3' y 3 sustituidas que desde los promotores silvestres (**Fig. 30**). Nuestra hipótesis es que la incapacidad de GolS de reconocer operadores con sustituciones C/G en las posiciones 3' y 3 se deba a la formación de un tercer puente de hidrógeno entre los pares de bases C-G, que resultan ser menos deformables que los pares A-T. Esto podría resultar en interferencias

estéricas o electrostáticas en la interacción de GolS, el cual presenta un residuo de metionina en la posición 16, más voluminoso e hidrofóbico que un residuo de Ala, Ser o Thr. La presencia de un residuo distintivo de Met en la hélice- $\alpha 2$  del dominio de unión del ADN de GolS se extiende a todas las proteínas homólogas a GolS cuyas secuencias operadoras en sus genes blanco putativos conservan las bases 3' y 3 A-T (**Fig. 29**; Pérez Audero y col., 2010). En cambio, los homólogos de CueR que reconocen promotores con las bases 3' y 3 C/G-C/G conservan una Ala, Ser o Thr en la posición 16 y, de hecho, el reemplazo del residuo Ala<sub>16</sub> de CueR por Thr no afecta su selectividad de operador (**Fig. 28-B**). Como era de esperar, el residuo en la posición 19 no muestra el mismo grado de conservación pero, interesantemente, los homólogos más cercanos a GolS presentan una Tyr en dicha posición, mientras que todos los homólogos a CueR poseen una Phe. De hecho, El recientemente caracterizado sensor de oro CupR de *Cupriavidus metallidurans* CH34, que controla la expresión de genes con operadores del tipo 3' y 3 A-T (Jian y col., 2009), conserva los residuos Met y Phe distintivos de GolS en su dominio N-terminal de unión al ADN. Notoriamente, varios homólogos MerR que reconocen secuencias pseudopalindrómicas con un espaciamiento de 1 pb y que presentan las bases C/G-C/G típicas de los operadores reconocidos por CueR (por ejemplo los sensores BmrR, Mta y TipA, y los metalo-reguladores CadR y PbrR) conservan una Ala o una Thr en la posición 16, pero nunca una Met, mientras que poseen una Phe o una Tyr en la posición 19 (Watanabe y col., 2008). Por lo tanto, es evidente que el reconocimiento específico de operador entre reguladores del tipo CueR y GolS depende de la interacción del residuo de aminoácido en la posición 16 con la base nucleotídica distintiva en la posición 3 del operador.

En resumen, estos estudios sugieren que, a lo largo de la evolución, el ensamblado de ambos reguladores transcripcionales GolS y CueR, y de los elementos regulatorios en sus genes blanco, confiere una nueva habilidad para detectar diferentes señales ambientales, evitando, al mismo tiempo, la regulación cruzada que podría poner en riesgo la respuesta adecuada a una situación de estrés específica.

## 2. CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub>: ¿imágenes especulares?

Sumado a la caracterización de la interacción sensor/operador en los reguladores parálogos CueR y Gols de *Salmonella*, comparamos el perfil de activación de los sensores maestros de los regulones *cue* de *Salmonella* y *E. coli*, CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub>, respectivamente. Si bien estos reguladores ortólogos son altamente homólogos en su secuencia proteica, las regiones promotoras de los genes que los codifican no muestran el mismo grado de conservación (**Fig. 32**). Es por ello que, en una primera instancia, se indagó acerca de la posible influencia de la concentración intracelular de los reguladores en su rol como activadores transcripcionales, generando distintas cepas de *E. coli* que expresen cada regulador ortólogo bajo el control de los promotores de *cueR* de *S. Typhimurium*, *PcueR<sub>STM</sub>*, o de *cueR* de *E. coli*, *PcueR<sub>EC</sub>* (**Fig. 33**). A pesar de que ambos reguladores poseen un 91% de identidad, y sólo los residuos correspondientes a las posiciones 9, 30, 42 y 63 varían en el dominio de unión al ADN desde la hélice- $\alpha$ 1 a la hélice- $\alpha$ 4 (**Fig. 31**), sólo CueR<sub>STM</sub> manifestó una cierta actividad residual en la inducción del reportero a partir del promotor de *golB* en presencia de oro, en tanto que no se vio activación del mismo reportero por CueR<sub>EC</sub> (**Fig. 34**). Ambos reguladores, sin embargo, se comportaron de manera similar en la activación del reportero a partir del promotor *PcopA*. Estos resultados sugieren que CueR<sub>STM</sub> es capaz de reconocer los operadores del regulón *gol* mientras que CueR<sub>EC</sub> presenta mayor selectividad por sus operadores.

Para minimizar diferencias en los niveles de expresión entre estos dos reguladores, los genes que codifican para los reguladores CueR<sub>EC</sub> y CueR<sub>STM</sub> fueron expresados desde un plásmido multicopia, bajo el control de un mismo promotor inducible por IPTG. Si bien no cuantificamos la concentración de estas proteínas sobre-expresadas, tampoco observamos inducción del gen reportero a partir de *PgolB* en la cepa que sobre-expresa CueR<sub>EC</sub>, aún aumentando la concentración de IPTG. El hecho de que se haya observado un mayor nivel de activación del gen reportero bajo el control de *PcopA* de manera correlativa al aumento de la concentración de IPTG sugiere que la proteína sobre-expresada se pliega correctamente y que la actividad transcripcional es proporcional a la concentración del regulador (Alon, 2007; Balleza y col., 2009). Seguido al análisis del perfil de regulación transcripcional de los sensores ortólogos CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> expresados en *E. coli* desde cromosoma y desde plásmido, y en vista a las diferencias de estos dos reguladores en cuanto a su capacidad de activar

*PgolB*, decidimos evaluar el comportamiento regulatorio de los mismos sobre-expresándolos desde plásmido en *Salmonella*. En esta bacteria, CueR<sub>EC</sub> fue capaz de activar el promotor heterólogo de *golB* de manera similar a como lo hace su regulador ortólogo CueR<sub>STM</sub>, que mantuvo el mismo perfil de activación que en *E. coli* (**Fig. 35**). Por lo tanto, la diferencia en la capacidad de estos dos reguladores de modular la expresión del gen reportero a partir del promotor heterólogo *PgolB* podría explicarse, al menos en parte, por variaciones en la concentración intracelular de metal entre *E. coli* y *Salmonella*. Factores intrínsecos a los mismos, como la afinidad por la secuencia promotora blanco o por el ión metálico inductor, tal vez influenciadas por diferencias sutiles en la conformación estructural como consecuencia de los cambios puntuales en su secuencia primaria, también podrían contribuir a la discrepancia observada en la capacidad de regulación transcripcional de ambos sensores.

Con el objetivo de determinar si diferentes afinidades por la secuencia blanco y/o por el metal inductor son la causa de las distintas capacidades de CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> para activar un gen perteneciente al regulón parálogo *gol*, construimos reguladores quiméricos combinando los dominios N-terminal de unión al ADN y C-terminal de unión al efector de ambos reguladores (**Fig. 36-A**). Evaluamos la capacidad de estos reguladores de inducir al reportero a partir de *PgolB* en *E. coli*. En ambos casos, los reguladores quimeras conservaron el mismo comportamiento de activación transcripcional que el del regulador silvestre del cual proviene su dominio N-terminal. En otras palabras, CueR<sub>EC</sub>, incapaz de inducir *PgolB* en *E. coli*, manifestó capacidad de hacerlo cuando se le reemplazó su dominio N-terminal de unión al ADN por la región homóloga en CueR<sub>STM</sub>, adquiriendo el mismo perfil regulatorio que dicho sensor silvestre. La sustitución del dominio C-terminal de unión al efector metálico de CueR<sub>EC</sub> por el de su regulador ortólogo, sin embargo, no le confirió la capacidad de activar el promotor de *golB* (**Fig. 36-B**). Estos resultados indican que es el dominio N-terminal de unión al ADN y no el dominio sensor, es el responsable de conferir la respuesta transcripcional característica de cada regulador. El hecho de que la sustitución del dominio C-terminal de CueR<sub>STM</sub> por el de CueR<sub>EC</sub> no afecte la capacidad del regulador de *Salmonella* para inducir *PgolB* refuerza esta hipótesis (**Fig. 36-B**). Para corroborarlo hemos planificado construir reguladores mutantes mediante la sustitución puntual, simple y combinada, de los residuos de aminoácidos en las posiciones 9, 30, 42 y 63 (**Fig. 31**) de un regulador por el del sensor ortólogo. La caracterización de la interacción

sensor/operador, *in vivo* por medio de ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa, e *in vitro* mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética y anisotropía de la fluorescencia, podría contribuir a la identificación de los residuos en el dominio de unión al ADN responsables de la actividad regulatoria diferencial de los sensores CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> en la inducción residual del promotor P<sub>golB</sub>.

Cada regulador posee una afinidad determinada hacia cada secuencia regulada, y en esa interacción existe una cierta probabilidad de que se produzca el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y consecuente expresión del gen blanco (Balleza y col., 2009). Mientras mayor sea la afinidad de un determinado sensor por su operador, mayor es el tiempo en el que se mantiene esta interacción, y mayor es la posibilidad de que se inicie la transcripción antes que se produzca la disociación por alguna fluctuación térmica. A pesar de que ninguno de los cuatro residuos de aminoácidos diferentes entre los dos reguladores ortólogos CueR coincide con los conservados en esas mismas posiciones en el dominio N-terminal de GolS (**Figs. 17-A y 31**), y que ninguno de estos cambios puntuales afecta la integridad de la hélice de reconocimiento  $\alpha 2$ , podrían estar contribuyendo a una mayor flexibilidad estructural de CueR<sub>STM</sub> y, por lo tanto, a una mayor versatilidad en la interacción proteína-ADN. Si bien la selectividad en el reconocimiento de operador está principalmente determinada por unos pocos contactos base-específicos entre residuos de la hélice- $\alpha 2$  y el surco mayor del ADN (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Newberry y Brennan, 2004; Aravind y col., 2005; Humbert y col., 2013), otras regiones proteicas distintas del dominio HTH mantienen contacto con el surco menor de la doble hélice, remodelando la estructura operadora o incrementando la afinidad del regulador por la misma. De hecho, en los reguladores transcripcionales del tipo wHTH, las láminas- $\beta$  adoptan una conformación flexible y desestructurada (“ala”), capaz de interactuar con el surco menor del ADN (Brennan, 1993; Clark, 1993; Huffman y Brennan, 2002; Bréchemier-Baey y col., 2012). Esta interacción, junto con la de las hélices  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  y  $\alpha 4$ , provee una interfase adicional para la interacción con el sustrato y es crítica en la estabilización del complejo regulador-operador.

Independientemente de la causa, resulta interesante que sólo CueR<sub>STM</sub> sea capaz de reconocer, aunque con baja afinidad y en presencia de oro, a la secuencia promotora nativa de GolS, teniendo en cuenta que *E. coli*, a diferencia de *Salmonella*, carece del regulón *gol*. Esta afinidad residual de CueR<sub>STM</sub> por operadores del regulón *gol* podría



entonces ser el reflejo de una adaptación de especie en el reconocimiento sensor-operador. La promiscuidad adquirida por CueR<sub>STM</sub> podría conferirle a *Salmonella* la ventaja evolutiva de poder inducir los regulones *cue* y *gol* en forma auxiliar cuando las concentraciones de Cu y Au alcanzan niveles saturantes para sus correspondientes sistemas primarios de detoxificación (Pérez Audero y col., 2010).

## Capítulo II

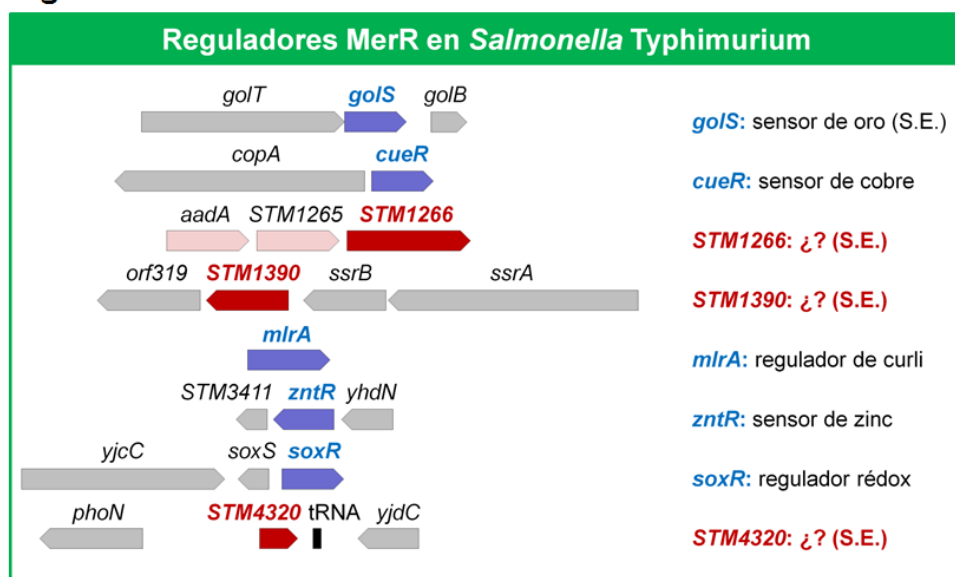
*STM1266: Un nuevo regulador MerR implicado en la  
formación de biopelículas*

## Resultados

### 1. Análisis *in silico* del entorno génico de *STM1266*

Además de la presencia de *golS* y de *cueR* (McClelland y col., 2001), existen otros 6 marcos de lectura con homología a reguladores de la familia MerR en el genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2 (**Fig. 37**). De estos, 5 fueron ya caracterizados tanto por nosotros, como por otros grupos en *Salmonella* o en otras enterobacterias relacionadas. Este es el caso de *golS* y *cueR*, previamente analizados en el *Capítulo I* (Changela y col., 2003; Stoyanov y Brown, 2003; Checa y col., 2007); de *mlrA* (Brown y col., 2001), responsable de la síntesis de fibras agregativas tipo curli, presente en ésta y otras enterobacterias; y de *zntR* (Brocklehurst y col., 1999) y *soxR* (Watanabe y col., 2008), caracterizados como responsables de la resistencia a zinc y a estrés oxidativo en *E. coli*, respectivamente, pero aún no analizados en *Salmonella*.

**Fig. 37**



**Fig. 37: Reguladores transcripcionales tipo MerR en *Salmonella*.** Representación esquemática de los 8 marcos de lectura abiertos con homología a reguladores de la familia MerR identificados en el genoma de *Salmonella* Typhimurium LT2 (McClelland y col., 2001). En azul se destacan los reguladores ya caracterizados y en rojo los genes cuyos productos génicos no presentan identidad con ningún regulador bacteriano conocido. En cada caso se indican la función del regulador y el entorno génico del mismo (gris). S.E.: *Salmonella* específico.

Entre estos genes se distinguen 3, *STM1266*, *STM1390* y *STM4320* (**Fig. 37**), ya que sus productos génicos no presentan identidad con ningún regulador bacteriano

conocido, y resultan especialmente interesantes por encontrarse ubicados en regiones del genoma específicas de *Salmonella* (McClelland y col., 2001).

*STM1266*, objeto de estudio de este proyecto, codifica para una proteína 26 % idéntica a *MlrA*, con un 46 % de similitud en su secuencia aminoacídica (**Fig. 38**).

**Fig. 38**

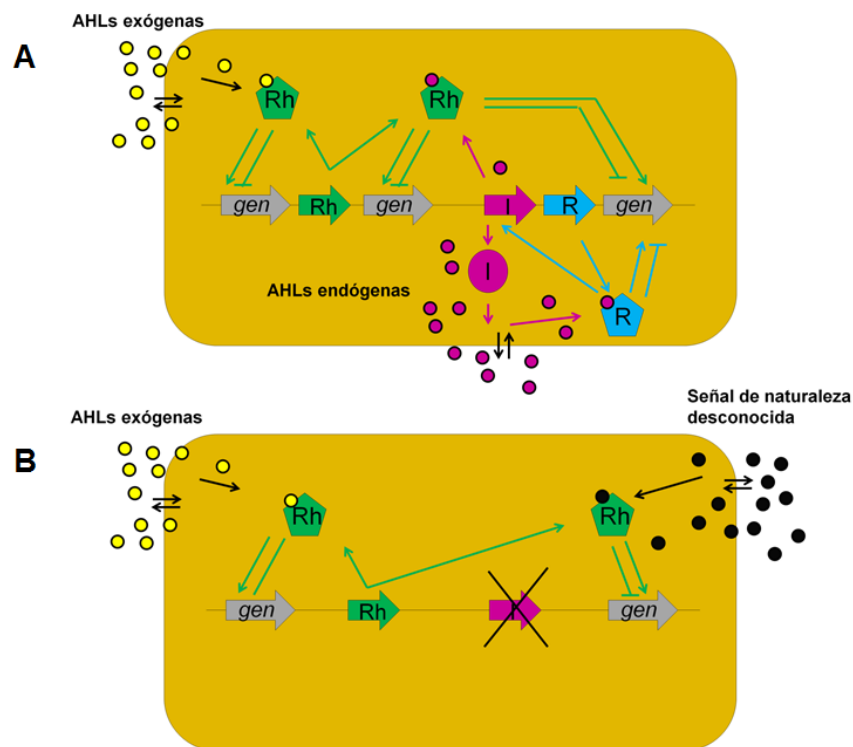


**Fig. 38:** Las proteínas *MlrA* y *STM1266* son 26 % idénticas y 46 % similares. Alineamiento de las secuencias proteicas de los reguladores transcripcionales *MlrA* y *STM1266* de *Salmonella* Typhimurium LT2 (McClelland y col., 2001). En rojo se indican los residuos idénticos entre ambos reguladores y en naranja, los similares. Sobre el alineamiento se muestra la región proteica correspondiente al primer dominio HTH (verde).

Corriente arriba de *STM1266* se encuentra *STM1265*, un gen que codifica para un regulador transcripcional putativo, también específico de *Salmonella*, perteneciente a la familia LuxR; la misma familia a la que pertenece CsgD (sección 4.3.2.3 de *Introducción*). Los reguladores del tipo LuxR están normalmente vinculados a sistemas de detección de densidad poblacional, conocido como “*quorum sensing*”, que modulan la expresión de determinados genes en respuesta a fluctuaciones en la densidad bacteriana en el entorno. Involucra la producción, liberación y posterior detección de moléculas señal llamadas autoinductores (Asad y Opal, 2008). Existen diferentes sistemas reguladores de *quorum sensing*, siendo uno de ellos el denominado Sistema del Autoinductor Tipo I, específico de bacterias Gram negativas (**Fig. 39**). Este sistema se caracteriza por la presencia de los genes *luxI* y *luxR*, fundamentalmente. Los genes del tipo *luxI* y sus homólogos codifican para una sintasa de N-acyl-homoserin lactonas (AHLs) que actúan como moléculas señal. En condiciones de alta densidad celular se

acumula suficiente cantidad de AHLs para interactuar con su respectivo receptor citosólico, LuxR. Este último, unido a su respectiva AHL, actúa como co-activador interaccionando con regiones promotoras de genes involucrados en la respuesta de *quorum sensing*, mejor conocidas como “boxes *lux*” (Antunes y col., 2008).

**Fig. 39**



**Fig. 39: Posibles roles de reguladores LuxR huérfanos en bacterias productoras y no productoras de AHLs. A.** En bacterias productoras de AHLs, los reguladores LuxR huérfanos (Rh) (verde) pueden sentir dicha señal endógena (rosado) y también la exógena (amarillo). Los LuxR típicos (R) (celeste), en cambio, sólo son capaces de unir AHL endógena producida por la sintasa (I) (rosado) a la que están asociados. **B.** En bacterias no productoras de AHLs, los Rh sólo pueden sentir AHLs exógenas u otras señales de naturaleza desconocida (negro). Los reguladores LuxR típicos (R) y huérfanos (Rh) controlan luego la expresión de sus genes blanco, generalmente vinculados a sistemas de *quorum sensing* (gris).

Los reguladores LuxR típicos reconocen AHLs producidas endógenamente por la sintasa LuxI a la que están asociados (**Fig. 39-A**). Algunas bacterias, como *E. coli* y *Salmonella*, no sintetizan AHLs pero conservan un LuxR funcional. Estos LuxR no asociados a una sintasa (*luxI*) se denominan “huérfanos” (Subramoni y Venturi, 2009). Algunos LuxR huérfanos reconocen AHLs exógenas, como por ejemplo SdiA, presente en *E. coli* y *Salmonella*. Existen otros reguladores huérfanos tales como CsgD y

Tabla 5

Comparación de residuos conservados en más del 95% de las proteínas tipo LuxR										
Residuos de aminoácidos conservados de TraR <sub>A. tumefaciens</sub>										
Dominio de unión al inductor						Dominio de unión al ADN				
	W <sub>57</sub>	Y <sub>61</sub>	D <sub>70</sub>	P <sub>71</sub>	W <sub>85</sub>	G <sub>113</sub>	E <sub>178</sub>	L <sub>182</sub>	G <sub>188</sub>	
<b>Reguladores tipo LuxR</b>										
<b>Homólogos LuxR típicos</b>										
LuxR <sub>V. fischeri</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
LasR <sub>P. aeruginosa</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
SinR <sub>S. meliloti</sub>	<b>A</b>	Y	D	P	W	G	E	L	G	
CinR <sub>R. etli</sub>	W	Y	D	P	W	N	E	L	G	
RhlR <sub>P. aeruginosa</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
Exp1 <sub>Erwinia sp.</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
SmaR <sub>Serratia sp.</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
<b>Homólogos LuxR huérfanos</b>										
TrIR <sub>A. tumefaciens</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	S*	A*	
TrIR <sub>A. tumefaciens</sub> *	W	Y	D	P	W	G	E	L*	G*	
QscR <sub>P. aeruginosa</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
VirR/ExpR2 <sub>Erwinia sp.</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
CarR <sub>Serratia sp.</sub>	<b>C</b>	Y	D	P	W	G	E	L	G	
CarR <sub>Erwinia sp.</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
BisR <sub>S. leguminosarum</sub>	W	Y	D	P	W	N	E	L	G	
SdiA <sub>E. coli</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
SdiA <sub>S. enterica</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
OxyR <sub>X. oryzae</sub>	<b>M</b>	W	D	P	W	G	E	L	G	
XccR <sub>X. campestris</sub>	<b>M</b>	W	D	P	W	G	E	L	G	
NesR <sub>S. meliloti</sub>	<b>M</b>	W	D	P	W	G	E	L	G	
ExpR <sub>S. meliloti</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
SMc00878 <sub>S. meliloti</sub>	W	Y	S	P	F	G	E	L	G	
AvhR <sub>A. vitis</sub>	W	Y	S	P	Y	G	E	L	G	
AviR <sub>A. vitis</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
VjbR <sub>B. melitensis</sub>	W	Y	D	P	<b>S</b>	<b>F</b>	E	L	G	
BlxR <sub>B. melitensis</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
BmaR4 <sub>B. mallei</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
BpmR4 <sub>B. pseudomallei</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
BtaR4 <sub>B. thailandensis</sub>	W	Y	D	P	W	G	E	L	G	
BmaR5 <sub>B. mallei</sub>	W	Y	D	P	L	G	E	L	G	
BpmR5 <sub>B. pseudomallei</sub>	W	Y	D	P	L	G	E	L	G	
BtaR5 <sub>B. thailandensis</sub>	W	Y	D	P	L	G	E	L	G	
<b>Homólogos LuxR huérfanos - putativos</b>										
VisN <sub>S. meliloti</sub>	<b>V</b>	W	S	<b>G</b>	<b>R</b>	G	E	L	G	
VisR <sub>S. meliloti</sub>	<b>C</b>	<b>A</b>	D	<b>E</b>	W	G	E	L	G	
SMc00877 <sub>S. meliloti</sub>	<b>L</b>	Y	S	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>A</b>	E	L	G	
SMc00658 <sub>S. meliloti</sub>	<b>L</b>	Y	S	<b>E</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	E	L	G	
VqsR <sub>P. aeruginosa</sub>	<b>L</b>	Y	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>H</b>	<b>E</b>	E	L	G	
STM1265 <i>S. Typhimurium</i>	-----			N-term	-----			<b>E120</b>	<b>L124</b>	<b>G130</b>
CsgD <i>S. Typhimurium</i>	-----			N-term	-----			<b>E160</b>	<b>L164</b>	<b>G170</b>
								3 AA	5 AA	

**Tabla 5: Conservación de residuos de aminoácidos directamente involucrados en la unión al inductor y al ADN en reguladores del tipo LuxR.** Del alineamiento de secuencia de TraR de *A. tumefaciens* con otras proteínas LuxR se identificaron 9 residuos de aminoácidos conservados en más del 95% de los reguladores de esta familia. Seis de estos residuos en el dominio N-terminal (W<sub>57</sub>, Y<sub>61</sub>, D<sub>70</sub>, P<sub>71</sub>, W<sub>85</sub> y G<sub>113</sub>) están involucrados en la unión al inductor, y tres residuos ubicados en el dominio C-terminal (E<sub>178</sub>, L<sub>182</sub> y G<sub>188</sub>) están asociados a la unión al ADN. Del análisis de estructura-función de TraR y otros homólogos LuxR se destaca el alto grado de conservación a nivel del dominio de unión al ADN, no así a nivel del dominio de unión al inductor, posiblemente para ampliar el rango de respuesta a estímulos de diferente naturaleza. La corrección de las mutaciones de corrimiento en el marco de lectura de TrIR (\*) restauran los correspondientes residuos de aminoácidos conservados. En **negrita** se destacan las sustituciones de residuos conservados, y en *cursiva* las sustituciones por residuos similares con respecto a los conservados en TraR<sub>A. tumefaciens</sub>. En rojo se indican los residuos conservados en STM1265 (E<sub>120</sub>, L<sub>124</sub> y G<sub>130</sub>) y CsgD (E<sub>160</sub>, L<sub>164</sub> y G<sub>170</sub>), correspondientes al dominio C-terminal de unión al ADN. (Adaptado de Patankar y González, 2009).

STM1265, para los cuales se desconoce si son capaces de reconocer una molécula señal y cuál es ésta (**Fig. 39-B**). Tanto los reguladores LuxR típicos como los LuxR huérfanos que detectan AHL exógenas conservan un alto grado de homología a nivel del dominio de unión al inductor en el N-terminal. Los LuxR huérfanos que no detectan AHL no conservan esta homología en el dominio de unión al inductor, pero poseen homología en el dominio de unión al ADN, caracterizado por la presencia de 3 residuos de aminoácidos: glutámico (E), leucina (L) y glicina (G), con un espaciamiento conservado de 3 y 5 residuos de aminoácidos entre ellos (**Tabla 5**) (Patankar y González, 2009).

Corriente arriba de *STM1265* se localiza *aadA*, que codifica para una aminoglicósido adeniltransferasa. Los aminoglicósidos, como estreptomomicina y espectinomomicina, son antibióticos que afectan la subunidad menor de los ribosomas bacterianos, inhibiendo la síntesis proteica (Kotra y col., 2000; Wright, 2010). Existen diferentes mecanismos bacterianos de resistencia a aminoglicósidos, incluyendo modificación química de la droga (adenilación, acetilación o fosforilación), alteración del blanco de la misma (mutaciones puntuales en la proteína ribosomal S12 y en el ARNr 16S, entre otras), o disminución del influjo y aumento del eflujo de la droga. El gen *aadA* se encuentra normalmente en plásmidos como el plásmido R (Fling y col., 1985) y está asociado genéticamente a transposones (Hollingshead y Vapnek, 1985), tales como el Tn1331 en *K. pneumoniae* (Tolmasky, 1990) y el Tn7 en *E. coli* (Fling y col., 1985). El extensivo grado de conservación del producto génico de *aadA* en bacterias es sorprendente, presentando cerca del 100 % de identidad aminoacídica entre bacterias como *E. coli* (Fling y col., 1985), *K. pneumoniae* (Tolmasky, 1990), *S. marcescens* (Van Nhieu y Collatz, 1987) y *S. enterica* (Leung y col., 1992; Koskiniemi y col., 2011), con la excepción de la aminoglicósido adeniltransferasa de *A. tumefaciens* que presenta el 82 % de homología con el resto de estas proteínas (Tait y col., 1985).

En *S. enterica aadA* es de localización cromosomal (Leung y col., 1992) y su transcripción depende del regulador global de respuesta a estrés (p)ppGpp (guanosina penta/tetra-fosfato) (Koskiniemi y col., 2011). Ante una escasez de aminoácidos o una limitación en la fuente de carbono disponible, las bacterias estimulan la producción de (p)ppGpp para desviar los recursos invertidos en crecimiento celular hacia la activación de metabolismos biosintéticos (Block y Haseltine, 1975). Los niveles de (p)ppGpp están regulados por RelA, que sintetiza (p)ppGpp en condiciones de hambruna de aminoácidos (Xiao y col., 1991), y por SpoT, que sintetiza e hidroliza (p)ppGpp

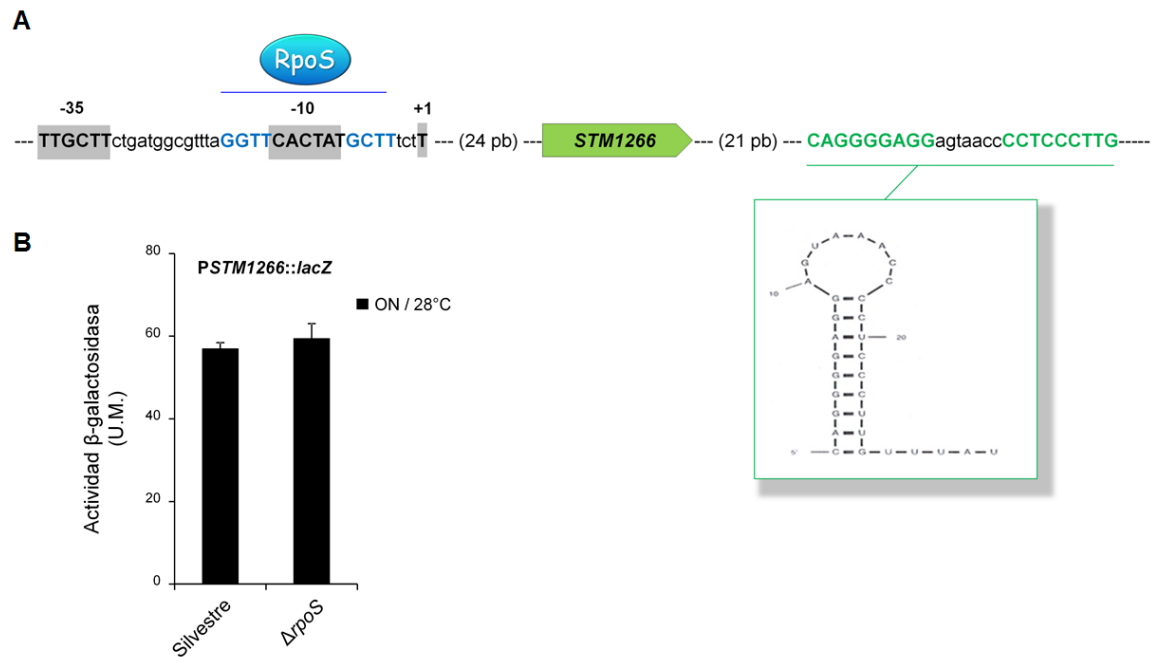
regulando los niveles intracelulares de este metabolito en respuesta a una privación de la fuente de carbono (Murray y Bremer, 1996). Se desconoce, sin embargo, el responsable de la inducción transcripcional de *aadA* dependiente de (p)ppGpp. Los reguladores putativos STM1266 (homólogo a reguladores MerR) y STM1265 (LuxR huérfano) resultan, por su cercanía física al gen *aadA*, dos posibles candidatos.

### 1.1 Arquitectura génica de *STM1266*

Del análisis *in silico* del gen *STM1266* y de su entorno (**Fig. 40**), identificamos las cajas regulatorias -35 y -10 posibles, y un terminador  $\rho$ -independiente a 21 pb corriente abajo del gen. El sitio de inicio de la transcripción +1, localizado a 24 pb del ATG, fue determinado por el laboratorio del Dr. Iñigo Lasa (comunicación personal) y por Kröger y colaboradores (Kröger y col., 2012). En la región promotora de *STM1266* identificamos, además, un sitio putativo de unión a RpoS, el factor sigma alternativo ( $\sigma^{38}$ ) característico de fase estacionaria, involucrado en la respuesta general a estrés (Hengge-Aronis, 1993). Esto concuerda con el hecho de que RpoS haya sido reportado como un regulador positivo de *MlrA* en *S. Typhimurium* (Brown y col., 2001; Weber y col., 2006). Por lo tanto, decidimos ensayar la dependencia de RpoS en la expresión de *STM1266*. Sin embargo, a diferencia de lo esperado por el grado de conservación del sitio putativo de unión a este factor sigma alternativo, la expresión de *STM1266* resultó ser independiente de  $\sigma^{38}$ , ya que no se observaron diferencias en el nivel de actividad transcripcional del mismo entre la cepa silvestre y la cepa  $\Delta rpoS$  (**Fig. 40-B**).



Fig. 40



**Fig. 40: A. Arquitectura del gen *STM1266*.** Análisis *in silico* de las regiones regulatorias (promotor y terminador transcripcional) de *STM1266*. En la secuencia se indican los elementos regulatorios -35 y -10 y sitio de inicio de la transcripción +1 (recuadrados en gris), el sitio de unión putativo a RpoS (azul), y un terminador transcripcional con estructura secundaria de «tallo y burbuja» (verde). La región promotora fue predicha por medio de los programas PePPER (Prediction of Prokaryote Promoter Elements and Regulons) (<http://pepper.molgenrug.nl/index.php/pepper-tools/promoter-predictie-tool>) y Neuronal Network Promoter Prediction para procariontes ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)). **B. La expresión de *STM1266* es independiente de RpoS.** Actividad β-galactosidasa (Unidades Miller) determinada en cepas silvestre y  $\Delta rpoS$ , ambas con la fusión reportera cromosomal al promotor *PSTM1266*. Las bacterias fueron crecidas toda la noche en medio LB con agitación a 28°C. Los datos corresponden a los valores promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

## 1.2 Reguladores *STM1266* y *STM1265*: ¿cascada regulatoria?

Nos propusimos estudiar la posibilidad de que el sensor *STM1266*, homólogo a *MlrA* (**Fig. 38**), fuese responsable de activar la transcripción de *STM1265*, de manera análoga a *MlrA*, que activa la transcripción de *csgD* (Brown y col, 2001). *STM1265* conserva los tres residuos de aminoácidos del dominio C-terminal de unión al ADN típicos de reguladores de esta familia (E<sub>120</sub>, L<sub>124</sub> y G<sub>130</sub>) (Vannini y col., 2002; Zhang y col., 2002; Nasser y Reverchon, 2007; Patancar y González, 2009), pero no está asociado a un gen *luxI* y se desconoce la naturaleza de la señal que lo induce (**Fig. 39-B** y **Tabla 5**). Del análisis *in silico* de la región promotora de *STM1265* encontramos dos secuencias diadas, una de ellas situada entre los elementos regulatorios -35 y -10,

análoga a la arquitectura de promotores regulados por sensores MerR convencionales, y la otra localizada corriente arriba del elemento regulatorio -35, similar a la disposición de la diada reconocida por MlrA en la región promotora de *csgD* de *E. coli* y *S. enterica*. Si bien no hay homología de secuencia entre esta región diada y la repetición invertida blanco de MlrA en *PcsgD*, es notable que ambas son ricas en las bases A y T (Fig. 41).

Para evaluar posible regulación transcripcional de *STM1265* por parte de *STM1266*, construimos una mutante transcripcional en la cual se insertó el gen reportero *lacZ* corriente abajo del marco de lectura abierto codificante

para *STM1265* por medio de transformación lineal, manteniendo la integridad del mismo. La actividad transcripcional de *STM1265* se determinó mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de cultivos en fase estacionaria crecidos a 28 °C, en una cepa silvestre para *STM1266*, y en una cepa delecionada de este último gen,  $\Delta$ *STM1266* (Fig. 42). Sin embargo, no pudimos completar este ensayo ya que el gen reportero en *STM1265* no se expresa, o al menos no pudimos evidenciar el desarrollo de color característico en un ensayo de  $\beta$ -galactosidasa. Además, las colonias resultaron blancas en medio LB sólido suplementado con X-gal. La deleción de *STM1266* su expresión a partir de un plásmido inducible por IPTG tampoco indujeron la actividad transcripcional del gen que codifica para el regulador LuxR huérfano, indicando que en las condiciones

**Fig. 41**

**A**

Prom *STM1265*

CGGTC **CTACGCTTTG**TGGATT **TGC**CAAAGGGCAGATCC **CCACGCAGTTCAC**  
ATAAGATGCCCCAGGACGTCTGTCA**GTTGCGCAA**ACGGCG**TTCCTCAACTA**  
CTACTTAATA**G**TTTCTCATCGCTGAAGTAAGCAGATGATCTT**ATG**CGGGCCA  
TCGAATGGATATCCACATGGCTCTCGTTTTGTTGAGGTGGAT**ATG**

**B**

Prom *csgD* (*E. coli*)

TTTTTAAAATTGTGCAATAAAAACCAATGTACAACTTTCTATCATTCT  
AAACTTAATAAAACCTTAAGGTTAACATTTAATATAACGAGTTACATTTAG  
TTACATGTTTAACTT**GATT**TAAGATTTGTAATGGCTAGATTGAAAT**CAGA**  
TGTAATCCATTAGTTTTATATTTTACCATTTAGGGCTGATTTACTACA  
CACAGCAGTGCAACATCTGTCACTTCTGGTGCTTCTATTTTAGAGGCAG  
CTGTCAAGGTGCGATCAATAAAAAAGCGGGTTTCAT**ATG**

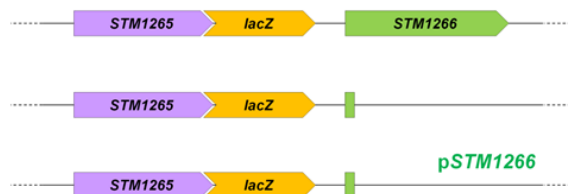
Prom *csgD* (*STM*)

TTTTTAAATCTATGCAATAACAGCGAAATGTACAACTTTCTATCAAATCTA  
AACTTCAAAAAACCCAAAAACAACATTTAATATATATTTTACATTTGGT  
TACAAGTTTAACTT**GCTTTA**AGATTTGTAATGGCTAGATTGAAAA**CAGTT**  
AAAAGTATTTTCGTAATATTTTCTCTTTCTGGATAATGGGCTATTTCAAC  
CCACAGCAGTGCAACATCTGTCACTTCTGGTGCCTTTATTTTATGGGGG  
CAGCTGTCAAGATGTGCGATTAAAAAAGTGGAGTTTCAT**ATG**

**Fig. 41: Análisis *in silico* de la región promotora de *STM1265*. A. Predicción de secuencias diadas en el promotor de *STM1265*. En la gráfica se indican dos repeticiones invertidas, ambas posibles sitios de unión del regulador MerR *STM1266*. En verde, una diada simétrica entre los elementos regulatorios -35 y -10 (subrayados), y en rosado, una diada de localización comparable al sitio blanco de unión de MlrA en la región promotora de *csgD*, respecto de la caja -35 (B). En celeste se destaca la secuencia correspondiente al extremo 3' del marco de lectura abierto para *STM1264*. B. Región promotora de *csgD*. Secuencia diada blanco de MlrA (rosado) en el promotor de *csgD* en *E. coli* (Ogasawara y col., 2010) y en *Salmonella*. En todos los casos (A y B), las cajas -35 y -10 se indican subrayadas, el sitio +1 de la transcripción en negrita y cursiva, y el codón de inicio de la traducción ATG en negrita.**

de cultivo ensayadas, *STM1265* no se expresa o lo hace a muy bajos niveles, aun cuando se sobre-exprese *STM1266*.

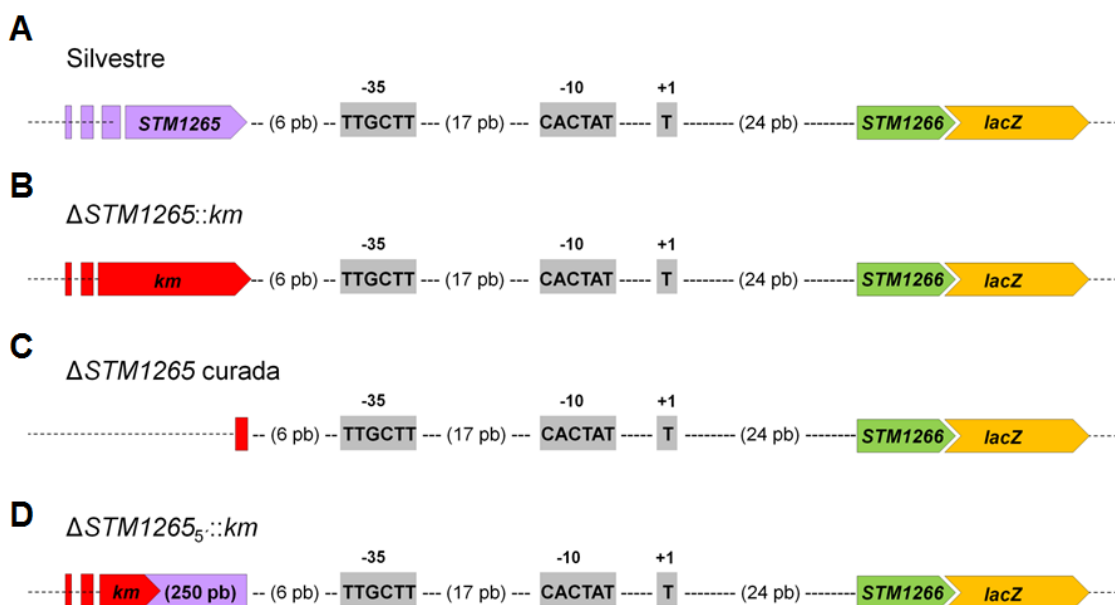
**Fig. 42**



**Fig. 42: El regulador LuxR huérfano putativo no manifiesta actividad transcripcional.** Representación gráfica de las construcciones cromosomales reporteras en *STM1265*, en un entorno silvestre, en ausencia de *STM1266* y en una cepa transformada con un vector que expresa ectópicamente *STM1266* a partir de un promotor inducible. Las condiciones de cultivo ensayadas se detallan en el texto.

Construimos una cepa reportera mediante la inserción del gen reportero *lacZ* corriente abajo de *STM1266*, manteniendo íntegro a dicho gen. Analizamos la actividad transcripcional del mismo por medio de ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de cultivos en fase estacionaria crecidos a 28 °C en un entorno silvestre o en la mutante  $\Delta STM1265$  (**Fig. 43-A y B**). La delección de *STM1265* provocó un incremento de 5 veces en los niveles transcripcionales de *STM1266* (**Fig. 44**). Sin embargo, la complementación con el gen codificante para el LuxR huérfano, clonado en el vector pUH21-2*lacI<sup>q</sup>* bajo el control del promotor *lac* inducible por IPTG, no alteró los niveles de activación transcripcional de *STM1266*. Este efecto resulta interesante debido a que, como fue anteriormente mencionado, los niveles de transcripción en las condiciones de cultivo ensayadas de *STM1265* serían suficientemente bajos para no observar su expresión mediante el gen reportero *lacZ*. Además, la complementación de la mutante  $\Delta STM1265$  con un vector que expresa ectópicamente a *STM1265* a partir de un promotor inducible no revirtió el fenotipo observado por la delección del mismo. Esto sugiere que la alteración producida sobre la activación de *STM1266* en una mutante  $\Delta STM1265$  es consecuencia de un efecto en *cis*. De hecho, el gen codificante para *STM1265* termina a 6 pb de la caja -35 ubicada en la región promotora de *STM1266* (**Fig. 43-A**).

Fig. 43



**Fig. 43:** La secuencia codificante para *STM1265* termina a 6 pb de la caja -35 de *STM1266*. Representación gráfica de las construcciones cromosomales realizadas sobre el gen *STM1265*, en cepas reporteras para *STM1266*. Las cepas (A-D) se discuten individualmente en el texto.

Una explicación posible a este resultado es que el cassette de resistencia a antibiótico insertado en *STM1265* ( $\Delta STM1265::km$ ) estuviese provocando un efecto polar sobre la transcripción de *STM1266*, ya que el cassette de resistencia está clonado en la misma orientación que el gen que codifica al regulador tipo MerR. Alternativamente, que la delección del gen que codifica para el regulador LuxR huérfano haya eliminado una región represora o moduladora negativa de la transcripción de *STM1266*. Para evaluar estas hipótesis, decidimos eliminar el cassette de resistencia a kanamicina (sección 11, **Fig. 20** – *Materiales y Métodos*). De esta manera se elimina el posible efecto polar del mismo sobre la transcripción de *STM1266* (**Fig. 43-C**). El nivel de expresión del gen que codifica para el regulador tipo MerR en la mutante  $\Delta STM1265$  curada continuó siendo alrededor de 5 veces mayor que el observado en la cepa silvestre para *STM1265*, similar a la transcripción medida para la mutante polar  $\Delta STM1265::km$  (**Fig. 44**). Esto sugiere fuertemente la presencia de una región represora dentro de la región codificante para *STM1265*. Para analizar esta hipótesis, construimos una mutante en la que sólo delecionamos los primeros 344 nt de *STM1265*, conservando 250 pb en el extremo 3' del mismo,  $\Delta STM1265_5::km$  (**Fig. 43-D**). La actividad transcripcional de *STM1266* en esta mutante fue de alrededor de 2 veces la determinada para la cepa silvestre en *STM1265*, significativamente menor que el nivel de expresión observado en

Fig. 44

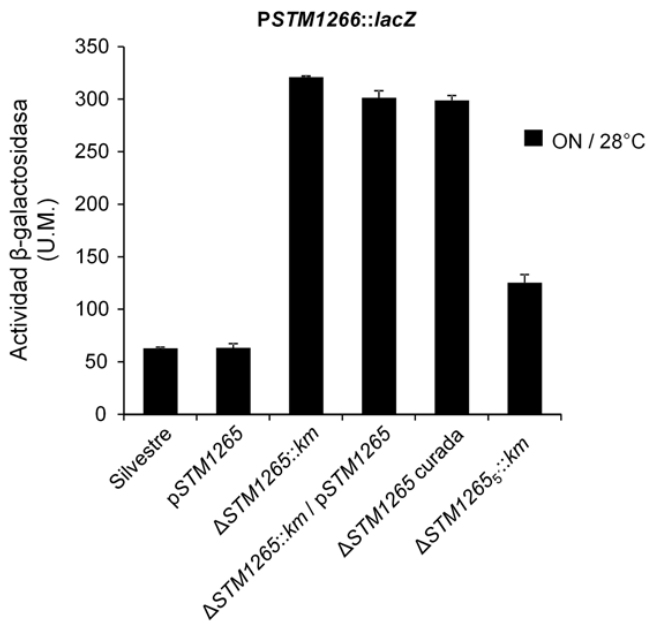


Fig. 44: El marco de lectura codificante para *STM1265* presenta una región moduladora negativa de *STM1266*. Las actividades β-galactosidasa (Unidades Miller) fueron determinadas en cepas silvestre, sobreexpresante de *STM1265*,  $\Delta STM1265::km$ ,  $\Delta STM1265::km$  complementada,  $\Delta STM1265$  curada y  $\Delta STM1265::km$ , con la fusión reportera al promotor *PSTM1266*. Las bacterias fueron crecidas toda la noche en medio LB con agitación a 28°C. Los datos corresponden a los valores promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

ausencia de la totalidad del marco de lectura abierto codificante para *STM1265* (Fig. 44). Estos resultados sugieren la existencia de una región que ejerce un efecto represor sobre la transcripción de *STM1266* en el extremo 3' de *STM1265*. Alternativamente, podría existir un sitio de unión para el mismo *STM1266*, si éste estuviese siendo autorregulado, como ha sido previamente descrito para otros reguladores de la familia MerR (Ansari y col., 1995; Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Newberry y Brennan, 2004; Checa y col., 2007; Pidot y col., 2010; Takano y col., 2011). La notable cercanía de *STM1265* a las cajas regulatorias -35 y -10 en la región promotora de *STM1266* y la presencia de tres repeticiones invertidas localizadas en el extremo 3' de la región codificante *STM1265*, refuerzan esta hipótesis (Fig. 45).

Fig. 45

Prom *STM1266*

```

CTGACTAAATTAGGTTGTAGAACAGTTCTGGATTATCAAATACTGTCCGTT
CTAAAGCCTTTACGCACgTGGCTTACAATAAATAATGTTGATAATGTAATTTCC
CCGTGTAATAAGTAAAGGTCATGCTTAAATAATGATTTGCTTCTGATGGCGTT
TAGGTTCACTATGCTTTCTTACATCATCATGAGGCCAGACAGGCATG

```

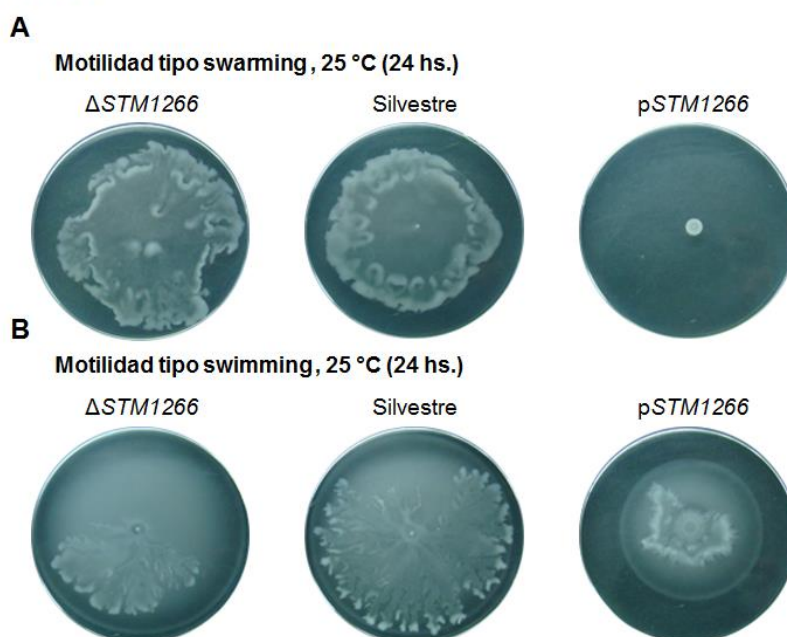
Fig. 45: Análisis *in silico* de la región promotora de *STM1266*. Predicción de secuencias diadas en el promotor de *STM1266*. En rosado, verde y gris se indican tres repeticiones invertidas, todas posibles sitios de unión del regulador MerR *STM1266*. En las regiones de superposición de posibles diadas (rosado y verde), las bases se indican de color verde. En celeste se destaca la secuencia correspondiente al extremo 3' del marco de lectura abierto para *STM1265*. Las cajas -35 y -10 se indican subrayadas, el sitio +1 de la transcripción en negrita y cursiva, y el codón de inicio de la traducción ATG en negrita.

## 2. Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta STM1266$ y de una cepa que expresa ectópicamente a $STM1266$

MlrA fue identificado como el regulador positivo para la síntesis de fimbria tipo curli y de la matriz extracelular en *E. coli* y *S. Typhimurium* (sección 4.3.2.3 de *Introducción*) (Brown y col., 2001). Su única función conocida hasta el momento es la de activar la transcripción del regulador maestro de producción de curli y celulosa CsgD, el principal regulador de respuesta para la formación de biopelículas. De manera análoga a como fue descrito para MlrA, analizamos si la expresión ectópica de  $STM1266$  a partir de un plásmido afecta la motilidad y modifica la formación de biopelículas.

### 2.1 Altos niveles de $STM1266$ disminuyen la motilidad

Para evaluar si  $STM1266$  está implicado en mecanismos regulatorios vinculados a cambios en la motilidad, construimos una mutante delecionada en  $STM1266$ . Además clonamos a  $STM1266$  en un plásmido bajo el control de un promotor *lac* inducible por IPTG, pUH21-2*lacI<sup>l</sup>*. Con la cepa carente de  $STM1266$  y la cepa que sobre-expresa al regulador realizamos ensayos comparativos de motilidad tipo swarming y swimming. En medio rico (LB), la sobre-expresión de  $STM1266$  imposibilitó la motilidad tipo swarming a 25 °C. De manera contraria, la deleción de  $STM1266$  incrementó la motilidad respecto de la cepa silvestre y manifestó, además, un fenotipo mucoso (**Fig. 46-A**). Altos niveles de expresión de  $STM1266$  provocaron también una disminución en la capacidad de motilidad tipo swimming respecto de la cepa delecionada en  $STM1266$  y la cepa silvestre, aunque las diferencias fenotípicas, en este caso, fueron menos drásticas que las observadas en los ensayos de motilidad tipo swarming (**Fig. 46-B**).

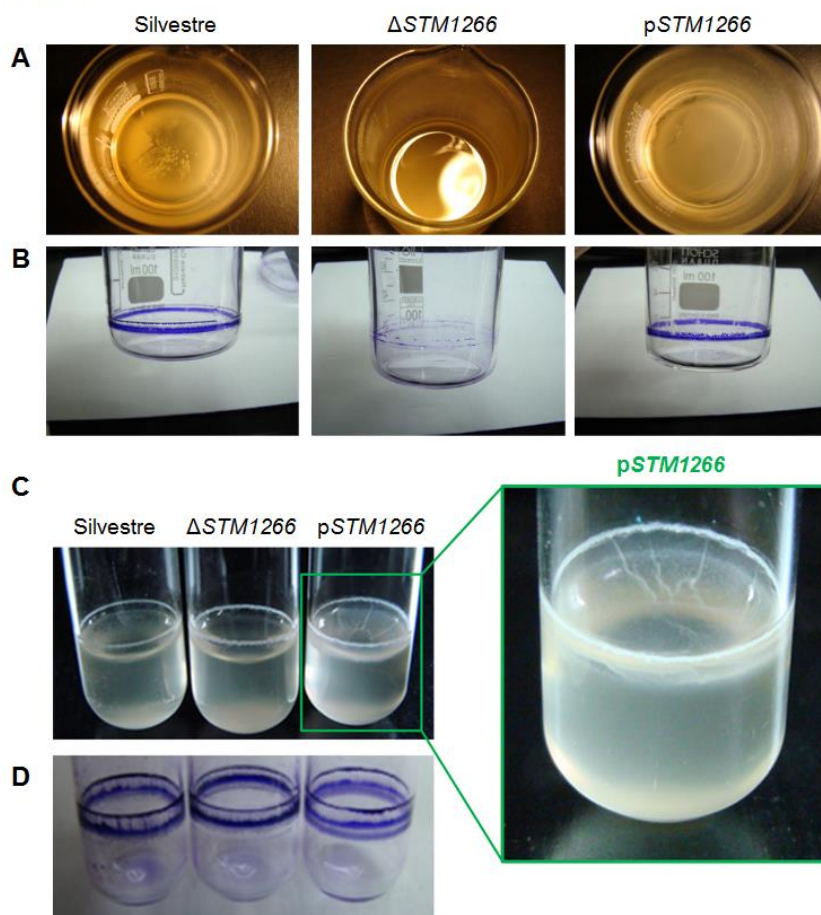
**Fig. 46**

**Fig. 46: Altos niveles de STM1266 disminuyen la motilidad tipo swarming y swimming.** **A.** Ensayo de swarming en medio LB agar 0,6 % suplementado con glucosa 0,5 %. **B.** Ensayo de swimming en medio LB agar 0,3 % suplementado con glucosa 0,5 %. En ambos casos, el experimento se realizó por triplicado, a 25 °C, con las cepas  $\Delta STM1266$ , pSTM1266 y silvestre como control. Las fotos corresponden a 24 hs. de incubación.

## 2.2 La sobre-expresión de *STM1266* estimula la formación de biopelículas

Como fue anteriormente descrito para los reguladores MlrA y CsgD (Pesavento y col., 2008; Ogasawara y col., 2011; Boehm y Vogel, 2012; Lindenberg y col., 2013), una disminución de la motilidad está comúnmente asociada a la formación de biopelículas. Decidimos entonces analizar si la sobre-expresión de *STM1266* estaba vinculada a una mayor capacidad de formar biopelículas. Para ello probamos distintas condiciones de cultivo, tanto en tubos de ensayo, en vasos de precipitado (ambos de borosilicato), a 28 °C, 37 °C y 42 °C, en luz y oscuridad, e incubando por 6 o 12 días, siempre en condiciones de cultivo estático. Detectamos que la incubación a 28 °C, tanto en luz como en oscuridad, es la condición más óptima para la detección de diferencias fenotípicas entre las mutantes en la formación de biopelículas. Además, no se detectó la formación de biopelícula ni a 37 °C ni a 42 °C, sugiriendo una regulación térmica en la inducción de los mecanismos asociados a este fenómeno, similar a como fue previamente reportado para los procesos celulares dependientes de MlrA en *E. coli* (Gerstel y col., 2003; Ogasawara y col., 2010).

Fig. 47



**Fig. 47: STM1266 induce la formación de biopelícula.** **A.** Ensayo de formación de biopelícula en medio LB. La incubación se realizó en vaso de precipitado de borosilicato, a 28 °C durante 12 días, en condición de cultivo estático. **B.** Tinción con cristal violeta. **C.** Ensayo de biofilm en medio LB. La incubación se llevó a cabo en tubos de ensayo de borosilicato, a 28 °C durante 6 días, sin agitación. **D.** Tinción con cristal violeta.

Una cepa con altos niveles del regulador STM1266 no sólo pierde completamente su capacidad de motilidad tipo swarming y muestra una disminución en su capacidad de motilidad tipo swimming (Fig. 46), sino que además muestra un aumento en la producción de biopelícula respecto de la cepa silvestre. La delección de *STM1266* muestra, de forma opuesta, una producción de biopelícula disminuida respecto de la cepa silvestre, limitándose al anillo adherido a la superficie del tubo en la interfase líquido-aire, y se observa ausencia de biopelícula en vaso de precipitado, que presenta mayor diámetro que los tubos de ensayo. En este último caso y a diferencia de la cepa que sobre-expresa STM1266 y de la cepa silvestre, la mutante  $\Delta STM1266$  no forma la película sobre la superficie del cultivo (en tubo de ensayo o en vaso de precipitado), la cual resultó ser extremadamente fina y particulada en el caso de la cepa parental, y mucho más gruesa y resistente en la mutante con altos niveles del regulador (Fig. 47).

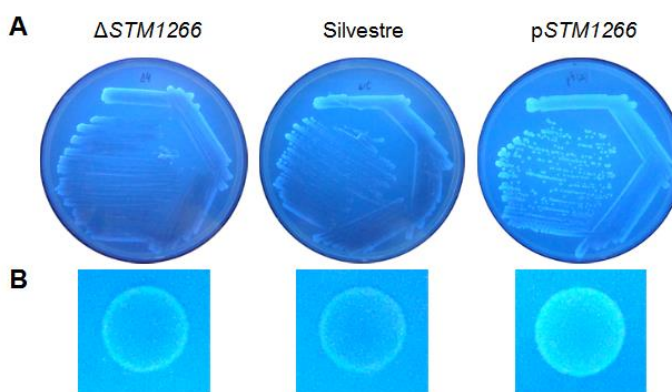


### 2.3 La inducción de *STM1266* incrementa la producción y secreción de celulosa

Uno de los principales componentes de la matriz extracelular de *Salmonella* es la celulosa (Zogaj y col., 2001; García y col., 2004; Kader y col., 2006; Jonas y col., 2007). El Calcoflúor es un indicador de la producción de este polisacárido, ya que fluoresce cuando se intercala en este compuesto. Altos niveles del regulador *STM1266* no sólo favorecen la formación de biopelícula (**Fig. 47**), sino que además se correlacionan con una mayor producción y secreción de celulosa, que se detecta por medio de una mayor intensidad de fluorescencia en medio SLB-ágar suplementado con Calcoflúor (**Fig. 48-A y B**). Estos resultados se confirman creciendo a las mutantes en medio rico, sólido, suplementado con Rojo Congo y Azul Brillante de Coomassie, un colorante que, de manera similar al Calcoflúor, también permite la detección de celulosa secretada, evidenciado en este caso por el fenotipo *Rdar* (*Red, dry and rough*) (Römling, 2005). La mutante sobreexpresante de *STM1266*, a diferencia de la cepa delecionada de este regulador y de la cepa silvestre, manifestó las características fenotípicas propias del fenotipo *Rdar*, demostrando una mayor producción y secreción de celulosa (**Fig. 48-C y D**). Estos resultados contribuyen a la explicación de cómo altos niveles de este regulador *MerR* estimulan o favorecen a la formación de biopelículas.

**Fig. 48**

Calcoflúor, 28 °C (48 hs.)



Fenotipo *Rdar*, 28 °C y 37 °C (7 días)



**Fig. 48: Altos niveles de *STM1266* estimulan la producción y secreción de celulosa. A-B. Calcoflúor.** Estriado (A) y gota de 20  $\mu$ l (B) de cultivos en fase estacionaria de las cepas  $\Delta$ *STM1266*, silvestre y *pSTM1266* en placas de SLB-agar suplementadas con 50  $\mu$ g/ml de Calcoflúor, incubadas durante 48 hs. a 28 °C. Las fotos fueron tomadas en un transiluminador de luz UV. Una mayor intensidad de fluorescencia indica mayor producción de exopolisacáridos. **C-D. Fenotipo *Rdar*.** 20  $\mu$ l de cultivo en fase estacionaria de las cepas  $\Delta$ *STM1266*, silvestre y *pSTM1266* en placas de SLB-agar suplementadas con Rojo Congo y Azul Brillante Coomassie, incubadas durante 7 días a 28 °C (C) o a 37 °C (D).

## 2.4 Altos niveles de STM1266 confieren resistencia a estreptomicina

Muchos de los reguladores del tipo MerR caracterizados hasta el momento regulan la expresión de genes cercanos. Corriente arriba de STM1266 se encuentra un gen que codifica para una proteína de resistencia a aminoglicósidos (*STM1264*), también conocido como *aadA* (sección 1). Predecir los elementos promotores de reguladores MerR, sobre todo la caja -10 que es la menos conservada, resulta difícil ya que estos sensores reconocen secuencias operadoras con un espaciamiento sub-óptimo entre las cajas -35 y -10 de 19 o 20 pb (Lund y Brown, 1989; O'Halloran y col., 1989; Park y col., 1992; Brocklehurst y col., 1999). Sin embargo, un análisis *in silico* de la región promotora de *STM1264* nos permitió detectar cuatro repeticiones invertidas. Una de ellas, por la longitud y continuidad de cada una de sus hemi-diadas simétricas, resulta ser la más factible de unir algún tipo de regulador del tipo MerR (Fig. 49).

**Fig. 49**

Prom *STM1264*

```
AGGCATTGTTGCAAGAGATGGAAAACCTGGCCTACCTATTATCCTTATCAGTT
AAAGGCGAATGAGGTCGTTGACGAAATGCTACATCATTAAAGTCTGATTGCAA
TGTTAAAAGCTCGCTATGAATAGCGAGCTTTTTTCTGCCGTTATGCCATAT
TTCGGCAATCAATATAAAAAATACCTGCGCCCCGGAGCGATGATG
```

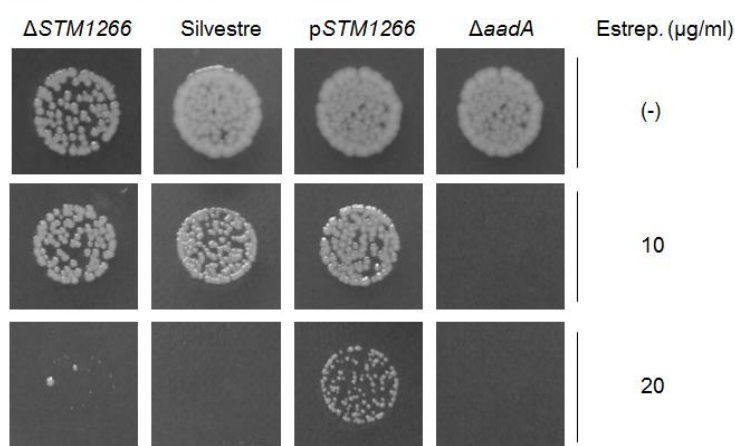
**Fig. 49: Análisis *in silico* de la región promotora de *STM1264*.** Predicción de secuencias diadas en el promotor de *STM1264*. En rosado, verde, gris y violeta se indican cuatro repeticiones invertidas, todas posibles sitios de unión del regulador MerR STM1266. Por su longitud y continuidad, la diada simétrica destacada en color rosado es la más probable. En las regiones de superposición de posibles diadas (verde y violeta), las bases se indican de color violeta. En celeste se destaca la secuencia correspondiente al extremo 3' del marco de lectura abierto para *STM1263*. Las cajas -35 y -10 se indican subrayadas, el sitio +1 de la transcripción en negrita y cursiva, y el codón de inicio de la traducción ATG en negrita.

En una primera aproximación para la determinación de una posible regulación transcripcional de *aadA* por parte de STM1266, decidimos analizar si la delección del regulador, o su sobre-expresión, afectaban la resistencia a aminoglicósidos. Para ello, determinamos la concentración inhibitoria mínima (CIM) en placa suplementando el medio con concentraciones crecientes de dos antibióticos aminoglicósidos, estreptomicina y espectinomina. Tal como se ha reportado previamente (Koskiniemi y col., 2011), la presencia de *aadA* confiere resistencia a aminoglicósidos, principalmente estreptomicina, ya que su delección reduce significativamente la resistencia a dicho antibiótico (Fig. 50-A). Observamos además que altos niveles de STM1266 confirieron mayor resistencia a estreptomicina (Fig. 50-A), mientras que las diferencias fenotípicas en presencia de espectinomina fueron más sutiles y se observaron a tiempos mayores que con estreptomicina. Esto mismo lo analizamos también con antibiogramas en función de la comparación cualitativa de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento, confirmando así una mayor resistencia a estreptomicina en la cepa que

sobre-expresa STM1266 (**Fig. 50-B**). Este fenotipo no se observó en la mutante  $\Delta STM1266$  la que, a diferencia de la mutante deletionada en *aadA*, presentó cierta deficiencia en cuanto a su capacidad de crecimiento en medio sólido, aún en ausencia del antibiótico. Estos resultados sugieren que no habría regulación transcripcional directa de *aadA* por parte de STM1266. Este regulador, en cambio, estaría participando de otras funciones importantes para el crecimiento de la bacteria. La mayor resistencia a estreptomicina que se observó con la sobre-expresión de STM1266 posiblemente se deba a un efecto indirecto conferido por una mayor capacidad de formar biopelícula (Koskiniemi y col., 2011). Alternativamente, es posible que altos niveles de expresión de STM1266 estuviesen provocando, directa o indirectamente, una acumulación intracelular del regulador global de respuesta a estrés (p)ppGpp, que actuaría luego como regulador positivo de la transcripción de *aadA*, resultando finalmente en un fenotipo de mayor resistencia a aminoglicósidos (Koskiniemi y col., 2011).

**Fig. 50**

**A CIM - Estreptomicina, 25 °C (36 hs.)**



**B Antibiograma - Estreptomicina ( $\mu\text{g/ml}$ ), 25 °C (12 hs.)**



**Fig. 50: La sobre-expresión de STM1266 confiere mayor resistencia a estreptomicina. A. Concentración inhibitoria mínima (CIM).** Formación de colonias en placas con las concentraciones indicadas de estreptomicina, de las cepas  $\Delta STM1266$ ,  $\Delta aadA$  y conteniendo el plásmido pSTM1266, comparadas con la cepa silvestre. **B. Antibiograma.** Análisis de la sensibilidad a estreptomicina en función de la comparación cualitativa de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas  $\Delta STM1266$ , silvestre y pSTM1266. Se indica la concentración ( $\mu\text{g/ml}$ ) de antibiótico empleada en cada caso.

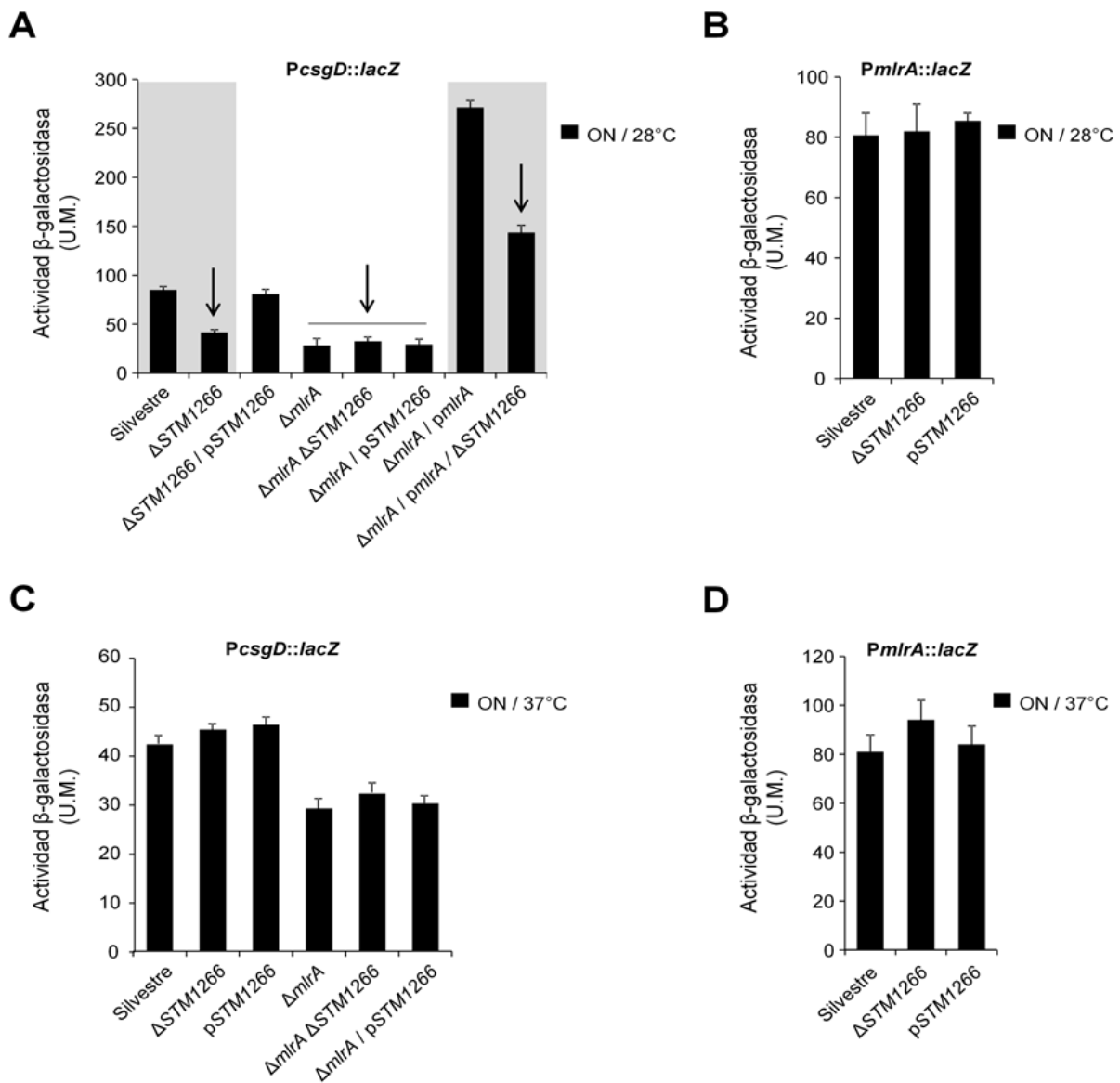
### 3. STM1266 y su implicancia en la regulación de la formación de biopelículas

MlrA y STM1266 son dos reguladores MerR homólogos y atípicos (sección 4.3.2 de *Introducción*) que presentan un dominio C-terminal de unión al inductor mucho mayor que el presente en los metalo-reguladores de la familia y, en ambos casos, se desconoce la señal inductora. MlrA induce la transcripción de *csgD* (Brown y col., 2001). Sin embargo, existe un amplio número de reguladores transcripcionales para *csgD* (Gerstel y col., 2003; Ogasawara y col., 2010; Ogasawara y col., 2011). De hecho, su promotor es reconocido como uno de los más complejos de *E. coli*. Debido a que la sobre-expresión de STM1266 estimula la formación de biopelícula y su delección afecta drásticamente esta capacidad (sección 2.2), este regulador podría estar afectando la transcripción de *csgD*, de manera análoga a MlrA. De hecho, la región de unión al ADN presenta un alto grado de homología con la misma región de MlrA (**Fig. 38**), por lo cual es factible que ambos reguladores estuviesen reconociendo y posiblemente compitiendo por los mismos operadores blanco. Alternativamente, STM1266 podría modular la expresión de *mlrA*. Para analizar la primera hipótesis, construimos cepas reporteras con el gen *lacZ* fusionado corriente abajo del promotor de *csgD*, en una cepa silvestre para *mlrA* y en una cepa  $\Delta mlrA$ , y ensayamos la actividad transcripcional de *csgD* en presencia y en ausencia de *STM1266*. Para evaluar la segunda hipótesis, construimos una cepa reportera en *mlrA* y analizamos posibles variaciones en los niveles transcripcionales de la misma como consecuencia de la presencia o ausencia de *STM1266* o de su sobre-expresión. Estos experimentos nos permiten además determinar si la mayor capacidad de formar biopelícula de una cepa que sobre-expresa STM1266 se debe a su capacidad de inducción de la expresión de CsgD, ya sea por un efecto directo sobre la región promotora del regulador maestro de curli o por la activación de *mlrA*.

De manera concordante con las evidencias fenotípicas que demuestran que la cepa que produce altos niveles de STM1266 posee una mayor capacidad de formar biopelículas que la cepa silvestre, los ensayos transcripcionales confirman que la delección de *STM1266* disminuye aproximadamente a la mitad la expresión de *csgD*, aún en presencia de *mlrA*. Sin embargo, la sobre-expresión del regulador no mostró diferencias con la cepa control, sugiriendo que STM1266 podría estar además estimulando la formación de biopelículas por medio de algún mecanismo independiente de CsgD. La delección de *mlrA*, principal activador de *csgD*, disminuye significativamente el nivel de activación del sistema, impidiendo detectar diferencias

por delección o por sobre-expresión de *STM1266* sobre *csgD*. Es decir, en ausencia de MlrA, la transcripción de *csgD* disminuye, incluso por debajo de los niveles detectados con la cepa mutante  $\Delta STM1266$ , enmascarando cualquier posible efecto de *STM1266* sobre la inducción del regulador de curli. En una mutante  $\Delta mlrA$  complementada con MlrA expresada de manera ectópica a partir de un plásmido bajo el control de un promotor inducible por IPTG, sin embargo, se recupera el efecto de *STM1266* sobre la expresión de *csgD* (**Fig. 51-A**). Por otra parte, no se vio regulación transcripcional directa de *mlrA* por *STM1266* (**Fig. 51-B y D**); y observamos que la incubación de las cepas a 37 °C inactiva el sistema (**Fig. 51-C**), coherente con reportes previos que demuestran activación del mismo a 28 °C (Gerstel y col., 2003; Ogasawara y col., 2010; Ogasawara y col., 2011).

Fig. 51



**Fig. 51: La ausencia de STM1266 disminuye la expresión de *csgD*.** Las actividades β-galactosidasa (Unidades Miller) fueron determinadas en cepas silvestre,  $\Delta STM1266$ ,  $\Delta mIra$  y  $\Delta mIra \Delta STM1266$  con las fusiones reporteras a los promotores *PcsGD* (A y C) o *PmlrA* (B y D), portadoras de los vectores de expresión con los reguladores STM1266 o *MlrA*, como se indica en cada caso. Las bacterias fueron crecidas toda la noche en medio LB con agitación a 28 °C (A y B) o a 37 °C (C y D). Los datos corresponden a los valores promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error corresponden a los desvíos estándar.

## Discusión

---

Al día de la fecha han sido reportados numerosos trabajos que demuestran el alto grado de conservación en los mecanismos de activación transcripcional entre la mayoría de los reguladores pertenecientes a la familia MerR (O'Halloran y col., 1989; Ansari y col., 1992; Blocklehurst y col., 1999; Outten y col., 1999; Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001; Godsey y col., 2001; Godsey y col., 2002; Brown y col., 2003; Changela y col., 2003; Newberry y Brennan, 2004; Checa y col., 2007; Espariz y col., 2007; Pontel y col., 2007; Watanabe y col., 2008; Pérez Audero y col., 2010; Humbert y col., 2013, entre otros). Sin embargo, investigaciones recientes (Brown y col., 2001; Navarro-Avilés y col., 2004; Navarro-Avilés y col., 2007; Ogasawara y col., 2010; Pidot y col., 2010; Ortiz-Guerrero y col., 2011; Takano y col., 2011) sugieren que el mecanismo estructural de reconocimiento del ADN y activación transcripcional inicialmente propuesto para BmrR (Zheleznova Heldwein y Brennan, 2001), y demostrado luego para otros sensores tipo MerR, no constituye un paradigma de regulación para reguladores de esta familia y nos permiten inferir la existencia de al menos dos grupos de reguladores filogenéticamente emparentados y estructuralmente análogos, aunque funcionalmente divergentes (**Fig. 8 – Introducción**).

En este Capítulo se describe la caracterización molecular y fenotípica de STM1266, un regulador MerR específico de *Salmonella* que conserva un 46 % de similitud con MlrA. Por medio de la construcción de un reportero cromosomal en STM1266 y ensayos de actividad transcripcional del mismo en una cepa silvestre o en una mutante para STM1265, que codifica para un regulador LuxR huérfano putativo, demostramos la presencia de una región de represión transcripcional ubicada en el extremo 3' de STM1265, que afecta la región promotora de STM1266 (**Fig 44**). Desconocemos hasta el momento cómo funciona esta región o si incluso es reconocida por el mismo STM1266.

Nuestros resultados sugieren que los fenotipos de menor motilidad, mayor producción y secreción de polisacáridos, mayor resistencia a aminoglicósidos y capacidad aumentada de formar biopelícula de una mutante que sobre-expresa a este regulador respecto de la cepa silvestre, podrían estar vinculados al menos en parte con la participación de STM1266 en la regulación transcripcional de *csgD*. Una disminución

de la expresión de *csgD* a la mitad en una mutante  $\Delta STM1266$  sostienen esta hipótesis (**Fig. 51-A**). Sin embargo, la sobre-expresión de STM1266 no mostró diferencias en los niveles de inducción de *csgD* respecto de la cepa control (**Fig. 51-A**), sugiriendo que altos niveles de este regulador estarían también estimulando la formación de biopelículas por medio de algún mecanismo regulatorio independiente de CsgD.

La disposición génica y los sistemas de regulación asociados al pasaje de vida planctónica a sésil están altamente conservados en bacterias relacionadas como *E. coli* y *S. enterica* (Römling y col., 2008). Sin embargo, la ausencia de *STM1266* en el genoma de *E. coli*, sumado a la observación de la influencia de este regulador en la formación de biopelículas en *S. enterica*, sugiere la existencia de modificaciones o diferencias a nivel regulatorio.

### 1. Análisis comparativo de la regulación transcripcional de *csgD* en *E. coli* y *S. enterica*

A pesar que la búsqueda en bases de datos y la comparación de secuencias genómicas revela una importante abundancia de proteínas con actividad diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa (Galperin y col., 2001b), el sistema de señalización mediado por c-di-GMP parece estar restringido a bacterias, ya que no se ha encontrado este metabolito en los reinos Archaea o Eukarya (Galperin, 2004). El número de proteínas con dominios GGDEF (actividad diguanilato ciclasa) y EAL (actividad fosfodiesterasa) codificadas en un único genoma bacteriano puede variar desde ninguna a algunas, o pudiendo alcanzar a aproximadamente 100 (Galperin y col., 2001a; Galperin, 2004). El genoma de *S. Typhimurium* (LT2) codifica para 19 proteínas con dominios GGDEF y/o EAL, cinco de éstas poseen sólo el dominio GGDEF, siete el dominio EAL y las restantes siete presentan los dos dominios (Kader y col., 2006; Simm y col., 2007). El mínimo módulo requerido para la señalización vía c-di-GMP consiste en una diguanilato ciclasa, una fosfodiesterasa y un componente efector que controle de manera directa la regulación de un gen específico (Hengge, 2009).

Reportes previos demuestran la estimulación dependiente de c-di-GMP en la expresión de curli en *E. coli* y *Salmonella* (Römling y col., 2005; Kader y col., 2006, Simm y col., 2007; Sommerfeldt y col., 2009; Lindenberg y col., 2013). La expresión de curli ocurre al inicio de la fase estacionaria y a temperaturas inferiores a los 30 °C. Es



estrictamente dependiente del factor sigma alternativo de respuesta general a estrés  $\sigma^{38}$ , responsable de activar la transcripción de *MlrA*, un activador transcripcional que coopera con la RNAPol dependiente de  $\sigma^{38}$  en la activación de la expresión de *csgD* (Brown y col., 2001).

En *E. coli*, *YdaM* e *YegE*, dos proteínas con actividad diguanilato ciclasa, también modulan positivamente la transcripción de *csgD*, mientras que las fosfodiesterasas *YciR* e *YhjH* cumplen un rol antagónico (Weber y col., 2006; Pesavento y col., 2008; Sommerfeldt y col., 2009). En esta bacteria, el mecanismo de activación de *csgD* opera como una cascada de señalización. El reservorio de c-di-GMP controlado por el par diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa *YegE/YhjH* (módulo I) modula la actividad del par *YdaM/YciR* (módulo II) (**Fig. 13 – Introducción**). Por medio de múltiples interacciones directas, las proteínas del módulo II forman un complejo de señalización con *MlrA* (Lindenberg y col., 2013). *YciR* actúa como un conector entre los módulos I y II y funciona como una enzima detonante. Su inhibición directa de la diguanilato ciclasa *YdaM* se ve reprimida cuando une y degrada el c-di-GMP generado por el módulo I. Como consecuencia, *YdaM* genera c-di-GMP y, mediante interacción directa, activa a *MlrA* para que estimule la transcripción de *csgD* (Lindenberg y col., 2013).

La arquitectura general de la cascada regulatoria de la producción de curli en *E. coli* y *S. enterica* (serovar Typhimurium) es prácticamente la misma (Römling y col., 2008). Sin embargo, el sistema de modulación del reservorio intracelular de c-di-GMP vinculado a los mecanismos regulatorios de la expresión de curli parece ser bastante diferente. No sólo el número (28 o 29 en *E. coli* versus 19 en *S. Typhimurium*) sino también las identidades de las proteínas GGDEF/EAL, que son sorprendentemente disímiles en las dos especies (**Tabla 6**). En *Salmonella* no existe *YdaM*, y STM3388, una proteína con dominios GGDEF + EAL pero con actividad diguanilato ciclasa, ausente en *E. coli*, y STM2123, un homólogo de *YegE*, modulan positivamente la expresión de *csgD*, mientras que STM1703, la fosfodiesterasa homóloga a *YciR*, y STM4264, una proteína con dominio EAL, homóloga a *YjcC* en *E. coli*, disminuyen los niveles de expresión de *csgD* (Kader y col., 2006; Simm y col., 2007). En *E. coli*, la delección de *yhjH* reduce significativamente la motilidad (Pesavento y col., 2008), *YhjH* (pero no *YjcC*) disminuye la inducción de *csgD* y curli durante la fase estacionaria temprana de crecimiento, y la expresión de *yjcC* es mucho menor que la de *yhjH* en la

Tabla 6

*Escherichia coli* (K-12) *Salmonella enterica* (ser. Typhimurium)

Gen	Número-B	Designación alternativa	Gen	Designación alternativa
<b>Proteínas GGDEF</b>				
<i>yaiC</i>	B0385		<i>STM0385</i>	<i>adrA</i>
<i>ycdT</i>	B1025		-	
<i>ydaM</i>	B1341		-	
<i>yddV</i>	B1490		-	
<i>ydeH</i>	B1535		-	
<i>yeal</i>	B1785		-	
<i>yeaJ</i>	B1786		<i>STM1283</i>	
<i>yeaP</i>	B1794		-	
<i>yedQ</i>	B1956		<i>STM1987</i>	<i>gcpA</i>
<i>yfiN</i>	B2604		<i>STM2672</i>	
<i>yliF</i>	B0834		-	
<i>yneF</i>	B1522		-	
-			<i>STM4551</i>	
<b>Proteínas GGDEF + EAL</b>				
<i>yciR</i>	B1285	<i>gmr</i>	<i>STM1703</i>	<i>gcpE</i>
<i>yddU</i>	B1489	<i>dos</i>	-	
<i>yegE</i>	B2067		<i>STM2123</i>	
<i>yfeA</i>	B2395		<i>STM2410</i>	
<i>yfgF</i>	B2503		<i>STM2503</i>	
<i>yhdA</i>	B3252	<i>csrD</i>	<i>STM3375</i>	
<i>yhjK</i>	B3529		<i>STM3615</i>	
-			<i>STM3388</i>	
<b>Proteínas EAL</b>				
<i>rtn</i>	B2176		<i>STM2215</i>	
<i>yahA</i>	B0315		-	
<i>ycgF</i>	B1163		-	
<i>ycgG</i>	B1168		-	
<i>ydiV</i>	B1707		<i>STM1344</i>	
<i>yhjH</i>	B3525		<i>STM3611</i>	
<i>yjcC</i>	B4061		<i>STM4264</i>	
<i>ylaB</i>	B0457		<i>STM0468</i>	
<i>yliE</i>	B0833		-	
<i>yoaD</i>	B1815		<i>STM1827</i>	
-			<i>STM0343</i>	

**Tabla 6: Designación de genes GGDEF/EAL homólogos en *E. coli* y *S. enterica*.** Se destacan en color verde y rojo aquellos genes cuyas actividades diguanilato ciclasa o fosfodiesterasa, respectivamente, afectan la expresión de *csgD*. De estos, los genes *ydaM* e *yeaP* carecen de su correspondiente homólogo en *Salmonella*; *STM3388* no tiene homólogo en *E. coli*; y en el caso particular de los genes *yhjH* y *STM4264*, sus respectivos homólogos no cumplen la misma función en las dos especies bacterianas. Cada uno de estos genes (verde y rojo) se discuten individualmente en el texto.

misma fase de crecimiento (Sommerfeldt y col., 2009). Podría especularse que variaciones simples en las regiones promotoras de *yjcC* (que produzcan una variación en la dependencia de  $\sigma^{38}/\sigma^{70}$ ) serían suficientes para explicar estas desemejanzas. A diferencia de lo observado en *E. coli*, *YhjH* pareciera jugar un rol menor en *Salmonella*, ya que las mutantes *yhjH* muestran sólo una reducción parcial de la motilidad (Rychlik y col., 2002; Frye y col., 2006; Ryjenkov y col., 2006; Simm y col., 2007). Además, *YhjH* tiene un efecto despreciable en la expresión de curli en *Salmonella* (Simm y col., 2007). *YjcC* (*STM4264*), en cambio, podría ser la principal fosfodiesterasa responsable

de mantener bajos los niveles intracelulares de c-di-GMP en fase de crecimiento exponencial tardío (Kader y col., 2006; Simm y col., 2007).

Además de las diferencias en los componentes moduladores del reservorio intracelular de c-di-GMP, es factible que existan también variaciones en cuanto a los reguladores transcripcionales que interaccionan con la región promotora de *csgD* en *E. coli* y *S. enterica*. Si bien la estructura génica de los operones divergentes *csgBAC* y *csgDEFG* está conservada en ambas bacterias, el promotor de *csgD* es similar pero no idéntico entre estas dos especies (80 % de homología) (Fig. 52). Las repeticiones invertidas blanco de unión de MlrA no son iguales (Ogasawara y col., 2010), pero ambas diadas son ricas en las bases A y T. Conservan la misma distancia respecto de la caja -35 (Fig. 7 – *Introducción*), y si bien las cajas -10 en el promotor de *csgD* son completamente idénticas en ambas especies bacterianas, las cajas -35 no lo son ya que existe una sustitución puntual de A en *E. coli* por C en *Salmonella*.

**Fig. 52**

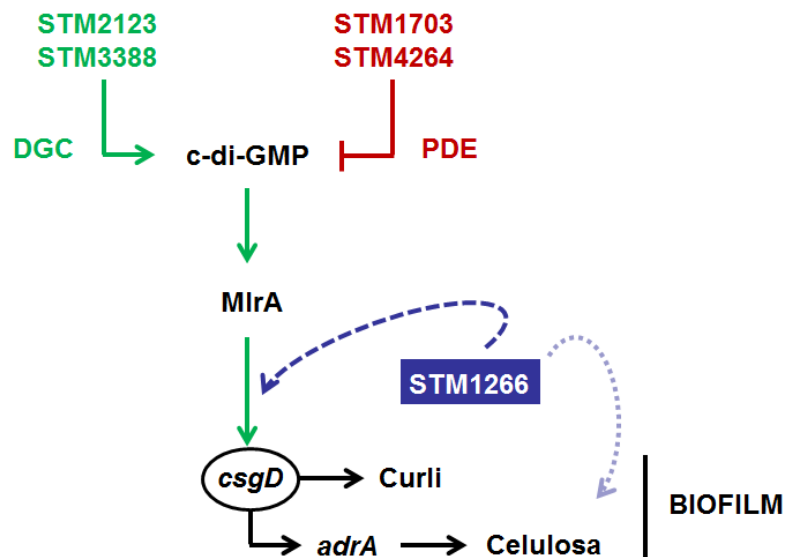


**Fig. 52:** Los promotores de *csgD* en *E. coli* y *Salmonella* son 80% homólogos. Alineamiento de las regiones promotoras de *csgD* en *E. coli* y *S. Typhimurium*. En rojo y recuadradas en gris se destacan las secuencias diadas blanco de MlrA (Ogasawara y col., 2010). Los elementos regulatorios -35 y -10 se muestran subrayados, en negrita y en azul, el sitio de inicio de la transcripción +1 en cursiva y en azul, y el codón de inicio de la traducción en negrita. Los asteriscos verdes señalan las bases no conservadas entre los dos promotores. A pesar de las diferencias puntuales, se conserva la composición general de bases (rica en A y T), la disposición de la diada simétrica respecto de las cajas -35 y -10 y el espaciamiento de 15 pb entre las mismas.

En este trabajo demostramos que, de manera coherente a la menor capacidad de formar biopelícula (Fig. 47), la delección de *STM1266* disminuye aproximadamente a la mitad la expresión transcripcional de *csgD*, siendo este fenómeno posiblemente dependiente de la presencia de MlrA y de temperaturas inferiores a los 30 °C (Fig. 51). Es posible, por lo tanto, que *STM1266* actúe como co-activador de MlrA (Fig. 53). Las

discrepancias en la identidad de las proteínas GGDEF/EAL que modulan la concentración de c-di-GMP en *E. coli* y *S. enterica*, sumado a las diferencias en la secuencia de bases nucleotídicas en la región promotora de *csgD*, refuerzan la hipótesis de que la evolución ha re-ensamblado funciones altamente conservadas, dependientes de c-di-GMP, como lo es la expresión de curli y formación de biopelículas, por medio de la transferencia horizontal de genes y modificaciones en los mecanismos regulatorios de los mismos, permitiendo posiblemente la adaptación y colonización de nuevos nichos.

Fig. 53



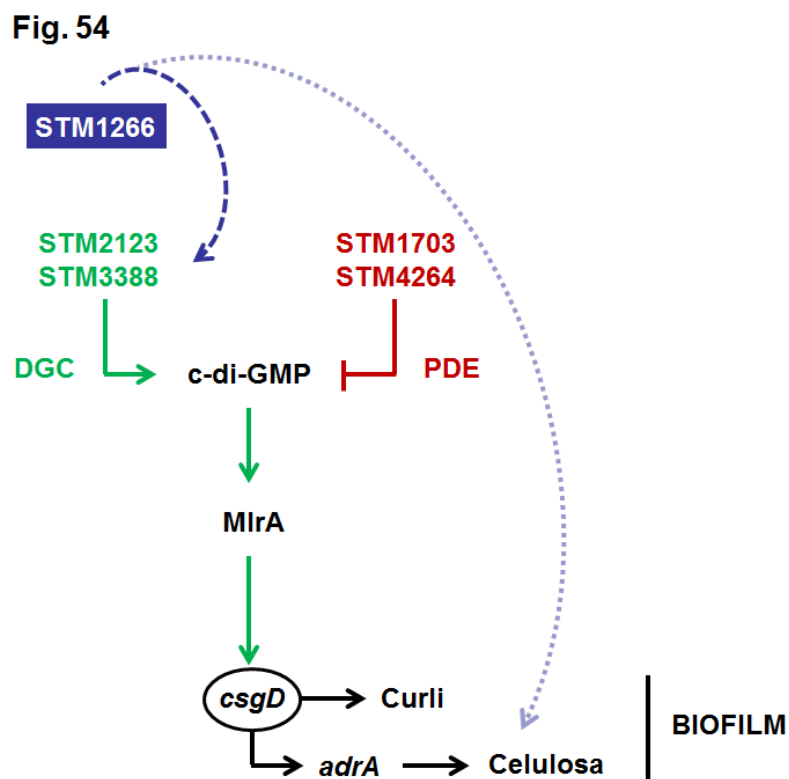
**Fig. 53: Modelo I de la cascada regulatoria dependiente de c-di-GMP en la transcripción de *csgD* en *Salmonella*.** Las proteínas GGDEF/EAL STM2123 (YegE) y STM3388 (verde) contribuyen positivamente a la biosíntesis de c-di-GMP, en tanto que las proteínas GGDEF/EAL STM1703 (YciR) y EAL STM4264 (YjcC) (rojo) participan de la degradación del mismo. En condiciones de altos niveles de c-di-GMP, MirA activa la transcripción de *csgD*, el cual luego actúa como regulador positivo de la síntesis de curli y estimula, de manera indirecta, la síntesis de celulosa por medio de la activación de la proteína GGDEF AdrA. STM1266 (azul) podría participar de la activación de *csgD*, uniéndose como cofactor positivo de MirA a la región promotora del mismo. STM1266 podría, además, estimular la formación de biopelículas por medio de la activación de algún mecanismo de producción de celulosa, independiente de CsgD. Las flechas continuas simbolizan eventos moleculares previamente reportados, mientras que las discontinuas representan eventos posibles pero aún no demostrados. DGC: actividad diguanilato ciclasa; PDE: actividad fosfodiesterasa.

### 1.1 Proteínas con dominio GGDEF: regulación positiva de *csgD*

Además de inducir la síntesis de curli, CsgD estimula la síntesis y secreción de celulosa por medio de la inducción de la transcripción de *adrA*, que codifica para una proteína con dominio GGDEF (Römling, 2005). Si bien *S. Typhimurium* posee cinco proteínas con dominio GGDEF y otras siete proteínas con ambos dominios GGDEF y EAL (**Tabla 6**) (Kader y col., 2006; Simm y col., 2007), la delección de *adrA* resulta en una cepa deficiente en la producción de celulosa pero con motilidad comparable a la de la cepa silvestre (Römling y col., 2000). Debido a que la motilidad es un fenómeno también dependiente del mensajero secundario c-di-GMP, es evidente que las diferentes proteínas con dominios GGDEF no poseen funciones redundantes y contribuyen a distintos reservorios de c-di-GMP que no se comunican entre sí (Tal y col., 1998; Kader y col., 2006; Simm y col., 2007; Hengge, 2009; Sommerfeldt y col., 2009; Lindenberg y col., 2013). De hecho, a pesar que la sobre-expresión de AdrA resulta en una retro-alimentación positiva en la regulación transcripcional de *csgD*, la inactivación de AdrA no tiene efecto sobre la transcripción del mismo. Un análisis minucioso de cada una de las restantes once proteínas con dominio GGDEF en *Salmonella* demostró que STM2123 y STM3388, ambas también portadoras de un dominio EAL inactivo, son las responsables principales en la inducción transcripcional y post-transcripcional de *csgD* como consecuencia directa de un aumento en la concentración intracelular de c-di-GMP (sección 1 – *Discusión Capítulo II*) (Kader y col., 2006).

Otra posible hipótesis que explica la disminución en los niveles de activación transcripcional de *csgD* en una cepa deficiente en STM1266 (**Fig. 51**) es que este regulador no se está uniendo directamente a la región promotora de *csgD* (tal vez como co-factor positivo de MirA; sección 1 – *Discusión Capítulo II*), sino que modula la expresión de alguna de estas dos proteínas con actividad diguanilato ciclasa (STM2123 y/o STM3388) (**Fig. 54**). De hecho, es probable que STM3388, ausente en *E. coli*, y STM2123, homóloga a YegE, estén formando parte de los módulos I y II previamente reportados en *E. coli* (Lindenberg y col., 2013). Esto explicaría la dependencia de la presencia de MirA para que la delección de STM1266 disminuya la transcripción de *csgD* (**Fig. 51**). La falta de identificación de un regulador transcripcional para STM2123 y STM3388 y la presencia de repeticiones invertidas en las regiones promotoras de estos genes (**Fig. 55**) como sitios posibles de unión de STM1266, refuerzan esta hipótesis.

La posibilidad de que STM1266 estuviese induciendo la transcripción de proteínas con actividad diguanilato ciclasa explica también de qué manera la sobre-expresión de este regulador promueve la formación de biopelículas sin alterar los niveles transcripcionales de *csgD* (Fig. 51-A). Altos niveles de STM1266 estarían, en este caso, disminuyendo la motilidad (Fig. 46) y estimulando la producción y secreción de celulosa (Fig. 48) como consecuencia directa de un aumento en los niveles intracelulares de c-di-GMP, favoreciendo así la formación de la matriz extracelular propia de las biopelículas (Fig. 54).



**Fig. 54:** Modelo II de la cascada regulatoria dependiente de c-di-GMP en la transcripción de *csgD* en *Salmonella*. Alternativamente al Modelo I, STM1266 (azul) podría participar de la activación de las diguanilato ciclasas STM2123 (YegE) y/o STM3388 (verde), contribuyendo positivamente a la acumulación de c-di-GMP y estimulando, en consecuencia, la transcripción de *csgD* vía MirA. De manera simultánea, altos niveles de c-di-GMP podrían estar estimulando la formación de biopelículas mediante la activación de algún mecanismo de producción de celulosa, independiente de CsgD. Las flechas continuas simbolizan eventos moleculares previamente reportados, mientras que las discontinuas representan eventos posibles pero aún no demostrados. DGC: actividad diguanilato ciclasa; PDE: actividad fosfodiesterasa.

**Fig. 55**Prom *STM2123* (*YegE*)

TTTGACGTCGCGACGTAAAAGCGTTCAGTTTAAACGCGGGCAGCGGTTTTAT  
 CGACCCGTCCTGGAGGAGGAATACGCCGGGAGCCACAATTTATATTAGCCAG  
 CGTATAAAATCATTACGCGTTTATACTAGCATAATCACAGAGTAAACTGACGC  
 GTCCGGTATTCCGCGACGTTACCGGCGATTCCGGATAGAGTGGTAATG

Prom *STM3388*

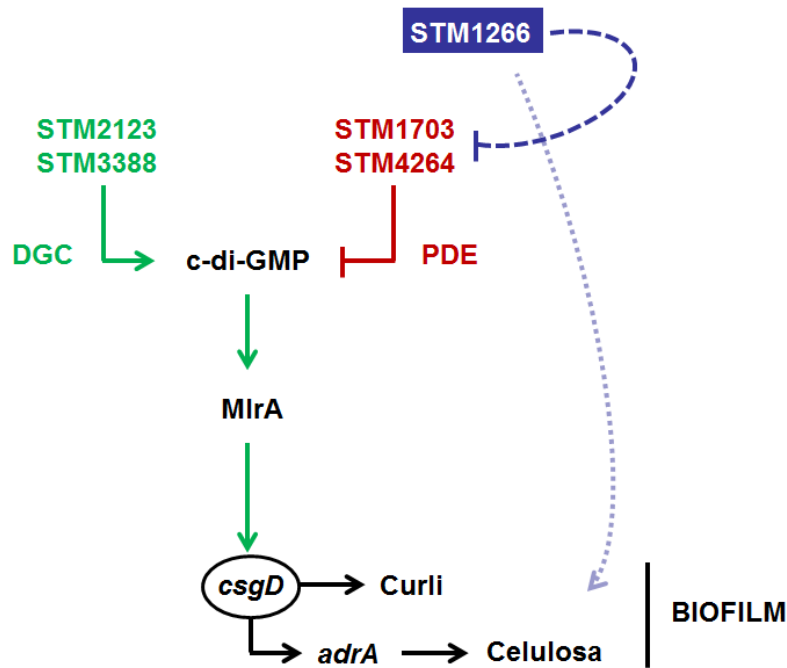
TGGATTTCGGTTAACCCCTCAAATTGATCAATTGTACCGATCTGGAGTAGCG  
 AACCGGCGATTTAACCTATGATTATTATCACCCGGATTTCTTTTATCCCT  
 TATAAAAACAGGAATTAAAACACGTTGAGGATAAAAGAAAGGGGTGATACTG  
 TCTCGTCCGTTCTTTTCTGCATAACCAATGAGCTAATGATACATG

**Fig. 55: Análisis *in silico* de las regiones promotoras de las diguanilato ciclasas *STM2123* (*YegE*) y *STM3388*.** Predicción de secuencias diadas. En rosado, verde, gris y violeta se indican diferentes repeticiones invertidas, posibles sitios de unión del regulador MerR *STM1266*. Por su longitud y continuidad, las diadas simétricas destacadas en color rosado y gris son las más probables. En las regiones de superposición de posibles diadas en el promotor de *STM3388* (verde y rosado), las bases se indican de color rosado. Las cajas -35 y -10 se indican subrayadas, el sitio +1 de la transcripción en negrita y cursiva, y el codón de inicio de la traducción ATG en negrita.

## 1.2 Proteínas con dominio EAL: regulación negativa de *csgD*

Alternativamente a la posibilidad que *STM1266* estuviese activando la transcripción de los genes que codifican para las diguanilato ciclasas *STM2123* y/o *STM3388*, podría también estar reprimiendo la expresión de los genes que codifican para las fosfodiesterasas *STM1703* y/o *STM4264* (**Fig. 56**). En cualquiera de los casos, una delección de *STM1266* provocaría una disminución en el reservorio intracelular de c-di-GMP, resultando finalmente en una disminución en los niveles de activación de *csgD* (**Fig. 51**) y, en consecuencia, menor capacidad de formar biopelícula (**Fig. 47**). Alternativamente, una sobre-expresión de *STM1266* produciría un incremento en los niveles intracelulares de c-di-GMP, lo que explicaría una mayor capacidad de formar biopelículas por medio de un mecanismo independiente de la activación de *csgD* (**Fig. 51-A**), posiblemente como consecuencia de una sobre-producción y secreción de celulosa (**Fig. 48**). El análisis *in silico* de las regiones promotoras de *STM1703* y *STM4264* también reveló la presencia de repeticiones invertidas que podrían estar actuando como probables sitios de unión de *STM1266* (**Fig. 57**).

Fig. 56



**Fig. 56: Modelo III de la cascada regulatoria dependiente de c-di-GMP en la transcripción de *csgD* en *Salmonella*.** Además de las hipótesis postuladas en los Modelos I y II, STM1266 (azul) podría actuar como represor de las fosfodiesterasas STM1703 (YciR) y/o STM4262 (YjcC) (rojo), favoreciendo la acumulación del c-di-GMP sintetizado por las diguanilato ciclasas STM2123 (YegE) y STM3388 (verde). De esta manera, STM1266 estaría activando indirectamente la transcripción de *csgD* vía MirA. Además, STM1266 podría estar estimulando la formación y secreción de celulosa por medio de algún mecanismo independiente de CsgD, contribuyendo así a la formación de biopelículas. Las flechas continuas simbolizan eventos moleculares previamente reportados, mientras que las discontinuas representan eventos posibles pero aún no demostrados. DGC: actividad diguanilato ciclasa; PDE: actividad fosfodiesterasa.

Fig. 57

Prom *STM1703* (YciR)

```
TCCCTTCGGTCATGCTCTAAGTTAATCTTATTCAAGCGCCCATTTCTTGT
TATTTTTAGCTGGCGACTATGCTTTTCCAGAACTGGATTACATATGAATA
CATAGATAAAACAATACGTTCCAGCCATAATTACCCTTATTTATAACATGGCT
AACCTTTCTTTTCGGGCACCTGGCGCTTAAATGGGATGGTACGCATG
```

Prom *STM4264* (YjcC)

```
AGTATAAATCTGATATTATCAAAAATATTTAGTGTCTGCTGGTATGCGAA
AGAGATTGCGGCTGTTATTAATGGTAAATGTTGATCGGTAAAAGTCTGTTG
CTAATATTGATAAATTCATGCACCGTAAACCTCCATTTGGTTCACGCTTTAT
TTTGCCAACAATAGTCACAAATAATGCAGGGAAATAGGCTGAAAATG
```

**Fig. 57: Análisis *in silico* de las regiones promotoras de las fosfodiesterasas STM1703 (YciR) y STM4264 (YjcC).** Predicción de secuencias diadas. En rosado, verde, violeta y amarillo se indican diferentes repeticiones invertidas, todas posibles sitios de unión del regulador MerR STM1266. Por su longitud y continuidad, las diadas simétricas destacadas en color rosado son las más probables. En la región de superposición de posibles diadas en el promotor de STM4264 (rosado y amarillo), la base se indica de color amarillo. Las cajas regulatorias -35 y -10 se indican subrayadas, el sitio +1 de la transcripción en negrita y cursiva, y el codón de inicio de la traducción ATG en negrita.



# **Conclusiones Generales**

## Conclusiones Generales

---

En este Proyecto de Tesis nos propusimos como primer objetivo caracterizar las bases moleculares que determinan la selectividad sensor/operador para los metalo-reguladores transcripcionales CueR y GolS, responsables de la homeostasis y resistencia a cobre y oro en *Salmonella*, respectivamente.

Para identificar la región responsable de la selectividad sensor/operador comenzamos diseñando mutantes quimeras de CueR y GolS en las que reemplazamos diferentes dominios de la región N-terminal de un regulador por los respectivos fragmentos del regulador parálogo (**Fig. 23**). Por medio de ensayos de actividad transcripcional *in vivo* con cepas reporteras para promotores de los regulones *cue* y *gol*, logramos definir a la hélice- $\alpha 2$  del primer dominio HTH como la mínima unidad estructural responsable del reconocimiento selectivo de operador (**Fig. 25**).

La caracterización *in vitro* mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) de la interacción de los reguladores silvestres CueR y GolS y de los reguladores mutantes CueR- $\alpha 2_S$  y GolS- $\alpha 2_R$  con fragmentos de ADN que contienen las regiones promotoras de *copA* o *golB* nos permitió verificar la importancia de la hélice- $\alpha 2$  en la selectividad de operador (**Fig. 27-A**).

La afinidad de unión para cada par regulador/operador fue estimada por anisotropía de fluorescencia (**Fig. 27-B**). Las constantes de equilibrio ( $k_D$ ) calculadas para las interacciones CueR/*PcopA*, GolS- $\alpha 2_R$ /*PcopA*, GolS/*PgolB* y CueR- $\alpha 2_S$ /*PgolB* demuestran que las mutantes CueR- $\alpha 2_S$  y GolS- $\alpha 2_R$  exhibieron una mayor afinidad de unión al promotor heterólogo en detrimento de sus secuencias operadoras nativas respecto de las proteínas parentales, simulando el comportamiento del regulador parálogo.

Un análisis más detallado de la región de la hélice- $\alpha 2$  por medio de la comparación de los reguladores transcripcionales que agrupan filogenéticamente con GolS con sensores homólogos a CueR (**Fig. 28-A y 29**), nos permitió identificar a los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 16 y 19 como posibles candidatos para el reconocimiento selectivo de operador entre estos dos reguladores transcripcionales. En vista a estas observaciones, construimos las versiones mutantes

simples y dobles de CueR y GolS, reemplazando los residuos de GolS de las posiciones 16 y/o 19 por aquellos presentes en CueR y viceversa, y ensayamos su habilidad de activar la transcripción desde *PcopA* o *PgolB* en presencia de cobre (**Fig. 28-B**). Las mutantes dobles CueR<sub>A16M-F19Y</sub> o GolS<sub>M16A-Y19F</sub> manifestaron mejor capacidad de inducción de la transcripción a partir de los promotores heterólogos y una capacidad de inducción disminuida desde las secuencias promotoras innatas en comparación a los reguladores silvestres, asemejando su perfil de activación al observado con las mutantes  $\alpha 2$  de CueR y GolS. Las mutantes simples CueR<sub>A16M</sub> y GolS<sub>M16A</sub> también mostraron un patrón de inducción similar al de las proteínas mutantes dobles. Estos resultados, sumados a la observación que el sólo reemplazo del residuo en la posición 19 (CueR<sub>F19Y</sub> y GolS<sub>Y19F</sub>) tuvo un efecto menor en el patrón de reconocimiento de operador, indican que el residuo en la posición 16 es el principal determinante de la selectividad sensor/operador entre los regulones *gol* y *cue*, en tanto que el residuo correspondiente a la posición 19 modula de manera fina dicho reconocimiento selectivo.

Un modelado *in silico* por medio del cual simulamos la interacción de CueR o GolS con el ADN nos permitió determinar que la cadena lateral del residuo 16 en ambos reguladores está cercana y direccionada hacia la base de la posición 3 desde el centro del operador, en tanto que la cadena lateral del residuo de aminoácido en la posición 19 se muestra orientada hacia una posición intermedia entre las bases nucleotídicas 3 y 4 (**Fig. 28-C**).

La inducción de expresión a partir de los promotores *gol* y *cue* silvestres y mutantes *PcopA<sub>AT</sub>* y *PgolB<sub>CC</sub>* por CueR<sub>A16M-F19Y</sub> fue similar a aquella obtenida con GolS, mientras que el perfil de activación de los mismos promotores por GolS<sub>M16A-Y19F</sub> se asemejó al de CueR silvestre (**Fig. 30**). Estos resultados verifican la participación de los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones 16 y 19 en la distinción de la bases nucleotídicas del operador situadas en las posiciones 3' y 3.

Estos resultados sugieren que GolS y CueR son prototipos de dos subfamilias evolutivamente emparentadas de reguladores MerR que han divergido para controlar grupos diferentes de genes en respuesta a los metales monovalentes Au y Cu, respectivamente. La co-evolución de circuitos regulatorios parálogos, basada en el ensamblaje de los reguladores locales y de sus operadores blanco, confiere una nueva

habilidad para detectar diferentes señales ambientales y garantiza, al mismo tiempo, la respuesta adecuada al daño provocado por un metal específico.

De la observación previa que en *E. coli* sólo CueR de *S. Typhimurium*, CueR<sub>STM</sub>, y no así su homólogo en esta bacteria, CueR<sub>EC</sub>, es capaz de reconocer, aunque con baja afinidad y sólo en presencia de oro, a un operador controlado por GolS (**Fig. 34**), y con el objetivo de determinar si dicha diferencia es debida a distintas afinidades por el operador y/o por el metal inductor, construimos genes que expresan reguladores quiméricos combinando los dominios N-terminal de unión al ADN y C-terminal de unión al efector de CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> (**Fig. 36-A**). Del análisis de la capacidad de los reguladores silvestres CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub> y de los reguladores mutantes CueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub> (dominio N-terminal de CueR<sub>STM</sub> fusionado al dominio C-terminal de CueR<sub>EC</sub>) y CueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub> (dominio N-terminal de CueR<sub>EC</sub> fusionado al dominio C-terminal de CueR<sub>STM</sub>) para inducir la expresión de un reportero bajo control de un promotor del regulón *gol* en *E. coli*, observamos que la activación transcripcional del promotor heterólogo depende del origen de la secuencia N-terminal del regulador quimera. En otras palabras, CueR<sub>STM</sub>-C<sub>EC</sub> indujo la expresión del promotor P*golB* mientras que no se observó tal fenotipo con CueR<sub>EC</sub>-C<sub>STM</sub> (**Fig. 36-B**).

Estos resultados indican que alguna de las diferencias en el dominio N-terminal de unión al ADN de los sensores ortólogos CueR<sub>STM</sub> y CueR<sub>EC</sub>, que se limitan a los residuos de aminoácidos en las posiciones 9, 30, 42 y 63 (**Fig. 31**), afectan la inducción residual de los genes del regulón *gol*. Probablemente, mutaciones seleccionadas a lo largo de la evolución han permitido que en un caso CueR sea capaz de reconocer los operadores homólogos del regulón *gol*, mientras que en el otro, debido a la ausencia de operadores homólogos, no haya habido presión para la selección de estas mutaciones. CueR<sub>STM</sub> podría, por lo tanto, inducir el regulón *gol* en forma auxiliar cuando el sistema primario de detoxificación de Au resulte insuficiente en condiciones de estrés provocado por concentraciones excesivas del metal, confiriendo así una ventaja evolutiva a este patógeno.

El segundo objetivo general de este proyecto de Tesis se centró en el análisis molecular y funcional de STM1266, un regulador transcripcional homólogo a MlrA, específico de *Salmonella*.

Del análisis *in silico* de *STM1266* y de su entorno génico, y conociendo el sitio de inicio de la transcripción +1 localizado a 24 pb del ATG (Kröger y col., 2012), identificamos las posibles cajas regulatorias -35 y -10 y un terminador  $\rho$ -independiente a 21 pb corriente abajo del gen (**Fig. 40-A**). En la región promotora de *STM1266* identificamos, además, un sitio putativo de unión a RpoS. Sin embargo, la expresión de *STM1266* resultó ser independiente de  $\sigma^{38}$  (**Fig. 40-B**).

Del análisis *in silico* de la región promotora de *STM1265*, codificante para un regulador LuxR huérfano putativo, encontramos dos secuencias diadas, una de ellas situada entre las cajas regulatorias -35 y -10, análoga a la arquitectura de promotores regulados por sensores MerR convencionales, y la otra localizada corriente arriba del elemento regulatorio -35, similar a la disposición de la diada reconocida por MlrA en la región promotora de *csgD* de *E. coli* y *S. enterica* (**Fig. 41**). Sin embargo, no pudimos determinar posible regulación transcripcional del mismo por parte de *STM1266*, ya que *STM1265* no se expresa o lo hace por debajo de los niveles detectables en las condiciones de cultivo ensayadas.

Observamos que la delección de *STM1265* provocó un incremento de 5 veces en los niveles transcripcionales de *STM1266* y que la complementación de la mutante  $\Delta STM1265$  con un vector que expresa ectópicamente a *STM1265* no revirtió el fenotipo observado por la delección del mismo (**Fig. 44**). Estos resultados, sumados al hecho de que el gen codificante para *STM1265* termina a 6 pb de la caja -35 ubicada en la región promotora de *STM1266* (**Fig. 43-A**), sugieren la posibilidad de que exista una región represora o moduladora negativa en el extremo 3' de *STM1265*. Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que una mutante en la que sólo delecionamos los primeros 344 nt de *STM1265*, conservando 250 pb en el extremo 3' del mismo,  $\Delta STM1265_3::km$ , manifestó un nivel de actividad transcripcional de *STM1266* más aproximado al determinado para la cepa silvestre en *STM1265* (**Fig. 44**).

Observamos que una cepa con altos niveles del regulador *STM1266* no sólo perdió completamente su capacidad de motilidad tipo swarming (**Fig. 46-A**) y mostró una disminución en su capacidad de motilidad tipo swimming (**Fig. 46-B**), sino que además manifestó un aumento en la producción de biopelícula respecto de la cepa silvestre (**Fig. 47**). Coherente con estos fenotipos, demostramos que la expresión ectópica de *STM1266* estimuló la producción y secreción de celulosa (**Fig. 48**), uno de

los principales componentes de la matriz extracelular. Además, observamos que la sobre-expresión de este regulador confirió mayor resistencia a estreptomycin (Fig. 50). La delección de *STM1266*, en cambio, mostró un aumento leve de la motilidad respecto de la cepa silvestre, manifestó un fenotipo mucoso (Fig. 46-A), disminuyó significativamente la capacidad de formación de biopelículas (Fig. 47) y presentó cierta deficiencia en cuanto a su capacidad de crecimiento en medio sólido, aún en ausencia del antibiótico (Fig. 50).

Si bien la cepa que produce altos niveles de *STM1266* posee mayor capacidad de formar biopelículas que la cepa silvestre, ensayos transcripcionales confirmaron que la sobre-expresión de este regulador no afectó transcripcionalmente la expresión ni de *mlrA* ni de *csgD*, aunque la delección del mismo mostró una disminución aproximadamente a la mitad la inducción de *csgD* en una cepa silvestre para *mlrA* a temperaturas inferiores a los 30°C (Fig. 51-A). Evidentemente, *STM1266* estimula la formación de biopelículas por medio de algún mecanismo independiente de *csgD*, posiblemente como consecuencia de un aumento en los niveles intracelulares de c-di-GMP. El hecho de que *STM1266* estuviese induciendo la expresión de enzimas con actividad diguanilato ciclasa o reprimiendo la expresión de enzimas con actividad fosfodiesterasa explicaría estas observaciones.

Ha sido reportado (Römling y col., 2008) que la arquitectura general de la cascada regulatoria de la producción de curli en *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium es prácticamente la misma. Sin embargo, las discrepancias en la identidad de las proteínas GGDEF/EAL que modulan la concentración de c-di-GMP en estas bacterias (Tabla 6), sumado a las diferencias en la secuencia de bases nucleotídicas en la región promotora de *csgD* (Fig. 52) y al hecho de que *STM1266* sea específico de *Salmonella* (McClelland y col., 2001; Fig. 37), refuerzan la hipótesis de que la evolución haya re-ensamblado funciones altamente conservadas, dependientes de c-di-GMP, como lo es la expresión de curli y formación de biopelículas, por medio de la transferencia horizontal de genes y modificaciones en los mecanismos regulatorios de los mismos. La caracterización de los procesos celulares dependientes de *STM1266* contribuirá a la comprensión de los mecanismos funcionales de reguladores MerR no convencionales (Fig. 8).

# Resumen

## Resumen

---

Dos reguladores transcripcionales parálogos de la familia MerR, CueR y GolS, son responsables de la detección y la resistencia a iones de metales monovalentes en *Salmonella enterica*. A pesar de que presentan un grado de similitud alto en su secuencia proteica y en la secuencia nucleotídica de sus operadores blanco, estas proteínas difieren en la naturaleza de la señal que reconocen así como en el conjunto de genes cuya transcripción regulan. Recientemente, en el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis se demostró que el reconocimiento selectivo de secuencias promotoras depende de la presencia de bases específicas localizadas en las posiciones 3' y 3 de los operadores reconocidos por estos reguladores. En el primer Capítulo de la presente Tesis demostramos que el residuo de metionina en la posición 16 de GolS, absolutamente conservado entre proteínas homólogas a este regulador pero ausente en todos los xenólogos del tipo CueR, es clave para el reconocimiento selectivo de secuencias promotoras que presentan la marca distintiva de todos los operadores regulados por GolS, en tanto que el residuo en la posición 19 auxilia en la interacción específica sensor/operador; y que el reemplazo de estos residuos por los conservados en el regulador parálogo cambia el conjunto de genes reconocidos por estos factores transcripcionales. A su vez, demostramos que existe una actividad regulatoria diferencial entre CueR de *Salmonella*, CueR<sub>STM</sub>, y su ortólogo de *E. coli*, CueR<sub>EC</sub>, probablemente debido a diferencias sutiles en el dominio N-terminal de unión al ADN. Estos resultados indican que la co-evolución de un regulador y sus operadores blanco dentro de la célula bacteriana provee de las condiciones necesarias para evitar el reconocimiento cruzado y garantizar la respuesta adecuada al daño provocado por un estresante dado, en este caso un ión metálico. Finalmente, iniciamos la caracterización de otro regulador transcripcional MerR, específico de *Salmonella* y homólogo a MlrA, implicado en la regulación de la motilidad en y la formación de biopelículas. Los resultados que se describen en el segundo Capítulo de esta Tesis demuestran que altos niveles de STM1266 disminuyen la motilidad, incrementan la producción y secreción de celulosa, confieren mayor resistencia a estreptomycin y estimulan la formación de biopelículas, posiblemente debido a la participación de este regulador en la modulación transcripcional de *csgD*.



# Referencias Bibliográficas

## Referencias Bibliográficas

---

- Aiyar A., Xiang Y., y Leis J. (1996). Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR. *Methods Mol. Biol. (Clifton, N.J.)*, 57, 177–91.
- Alfano C., Sanfelice D., Babon J., Kelly G., Jacks A., Curry S., y Conte M. R. (2004). Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11(4), 323–9.
- Alon U. (2007). Network motifs: theory and experimental approaches. *Nat. Rev. Genet.*, 8(6), 450–61.
- Andoy N. M., Sarkar S. K., Wang Q., Panda D., Benítez J. J., Kalininskiy A., y Chen P. (2009). Single-molecule study of metalloregulator CueR-DNA interactions using engineered Holliday junctions. *Biophys. J.*, 97(3), 844–52.
- Ansari A. Z., Bradner J. E., y O'Halloran T. V. (1995). DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism. *Nature*, 374(6520), 371–5.
- Ansari A. Z., Chael M. L., y O'Halloran T. V. (1992). Allosteric underwinding of DNA is a critical step in positive control of transcription by Hg-MerR. *Nature*, 355(6355), 87–9.
- Ansari T. M., Marr I. L., y Tariq N. (2004). Heavy metals in marine pollution. *J. Applied Sci.*, 4, 1–20.
- Antunes L. C. M., Ferreira R. B. R., Lostroh C. P., y Greenberg E. P. (2008). A mutational analysis defines *Vibrio fischeri* LuxR binding sites. *J. Bacteriol.*, 190(13), 4392–7.
- Aravind L., Anantharaman V., Balaji S., Babu M. M., e Iyer L. M. (2005). The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29(2), 231–62.
- Asad S., y Opal S. M. (2008). Bench-to-bedside review: Quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. *Crit. Care (London, England)*, 12(6), 236.
- Ausmees N., Mayer R., Weinhouse H., Volman G., Amikam D., Benziman M., y Lindberg M. (2001). Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, 204(1), 163–7.
- Bachmann B. J. (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol. Rev.*, 36(4), 525–57.
- Balleza E., López-Bojorquez L. N., Martínez-Antonio A., Resendis-Antonio O., Lozada-Chávez I., Balderas-Martínez Y. I., Encarnación S., y Collado-Vides J.

- (2009). Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiol. Rev.*, 33(1), 133–51.
- Barnhart M. M., y Chapman M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol.*, 60, 131–147.
- Barton L. L., Goulhen F., Bruschi M., Woodards N. A., Plunkett R. M., y Rietmeijer F. J. (2007). The bacterial metallome: composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biometals*, 20(3-4), 291–302.
- Baudart J., Lemarchand K., Brisabois A., y Lebaron P. (2000). Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(4), 1544–52.
- Bjelland A. M., Sørum H., Tegegne D. A., Winther-Larsen H. C., Willassen N. P., y Hansen H. (2012). LitR of *Vibrio salmonicida* is a salinity-sensitive quorum-sensing regulator of phenotypes involved in host interactions and virulence. *Infect. Immun.*, 80(5), 1681–9.
- Boehm A., y Vogel J. (2012). The *csgD* mRNA as a hub for signal integration via multiple small RNAs. *Mol. Microbiol.*, 84(1), 1–5.
- Borremans B., Hobman J. L., Provoost A., Brown, N. L., y van Der Lelie D. (2001). Cloning and Functional Analysis of the *pbr* Lead Resistance Determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J. Bacteriol.*, 183(19), 5651–5658.
- Bréchemier-Baey D., Domínguez-Ramírez L., y Plumbridge J. (2012). The linker sequence, joining the DNA-binding domain of the homologous transcription factors, Mlc and NagC, to the rest of the protein, determines the specificity of their DNA target recognition in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 85(5), 1007–19.
- Brennan R. G. (1993). The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell*, 74(5), 773–6.
- Brenner F. W., Villar R. G., Angulo F. J., Tauxe R., y Swaminathan B. (2000). *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2465–2467.
- Brocklehurst K. R., Hobman J. L., Lawley B., Blank L., Marshall S. J., Brown N. L., y Morby, A. P. (1999). ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of *zntA* in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 31(3), 893–902.
- Brown N. L., Stoyanov J. V, Kidd S. P., y Hobman J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3), 145–163.
- Brown P. K., Dozois C. M., Cheryl A., Zuppardo A., Terlonge J., y Curtiss R. (2001). MlrA , a novel regulator of curli ( AgF ) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.*, 41(2), 349–363.

- Bruins M. R., Kapil S., y Oehme F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45(3), 198–207.
- 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), 471–4.
- Chan C., Paul R., Samoray D., Amiot N. C., Giese B., Jenal U., y Schirmer T. (2004). Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(49), 17084–9.
- Changela A., Chen K., Xue Y., Holschen J., Outten C. E., O'Halloran T. V., y Mondragón A. (2003). Molecular Basis of Metal-Ion Selectivity and Zeptomolar Sensitivity by CueR. *Science*, 301(5638), 1383–1387.
- Checa S. K., Espariz M., Pérez Audero M. E., Botta P. E., Spinelli S. V, y Soncini F. C. (2007). Bacterial sensing of and resistance to gold salts. *Mol. Microbiol.*, 63(5), 1307–18.
- Checa S. K., y Soncini F. C. (2011). Bacterial gold sensing and resistance. *Biometals*, 24(3), 419–27.
- Chen P., Andoy N. M., Benítez J. J., Keller A. M., Panda D., y Gao F. (2010). Tackling metal regulation and transport at the single-molecule level. *Nat. Prod. Rep.*, 27(5), 757–67.
- Christen M., Christen B., Folcher M., Schauerte A., y Jenal U. (2005). Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.*, 280(35), 30829–37.
- Clark K. L., Halay E. D., Lai E., y Burley S. K. (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature*, 364(6436), 412–20.
- Datsenko K. A, y Wanner B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(12), 6640–5.
- Davis B. M., Kimsey H. H., Kane A. V, y Waldor M. K. (2002). A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. *EMBO J.*, 21(16), 4240–9.
- Davis R. W., Bolstein D. y Roth J. R. (1980). Advanced bacterial genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Dong G., Chakshusmathi G., Wolin S. L., y Reinisch K. M. (2004). Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *EMBO J.*, 23(5), 1000–7.
- Eisler R. (2004). Gold concentrations in abiotic materials, plants, and animals: a synoptic review. *Environ. Monit. Assess.*, 90(1-3), 73–88.

- Elías-Arnanz M., Padmanabhan S., y Murillo F. J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14(2), 128–35.
- Espariz M., Checa S. K., Pérez Audero M. E., Pontel L. B., y Soncini F. C. (2007). Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology*, 153(Pt 9), 2989–97.
- Eswaran J., Koronakis E., Higgins M. K., Hughes C., y Koronakis V. (2004). Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 14(6), 741–7.
- Fan B., y Rosen B. P. (2002). Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *J. Biol. Chem.*, 277(49), 46987–92.
- Fields P. I., Swanson R. V., Haidaris C. G., y Heffron F. (1986). Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 83(14), 5189–93.
- Fling M. E., Kopf J., y Richards C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 13(19), 7095–7106.
- Franke S., Grass G., Rensing C., y Nies D. H. (2003). Molecular Analysis of the Copper-Transporting Efflux System CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 185(13), 3804–3812.
- Frantz B., y O'Halloran T. V. (1990). DNA distortion accompanies transcriptional activation by the metal-responsive gene-regulatory protein MerR. *Biochemistry*, 29(20), 4747–51.
- Freedman J. H., Ciriolo M. R., y Peisach J. (1989). The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.*, 264(10), 5598–605.
- Frye J., Karlinsey J. E., Felise H. R., Marzolf B., Dowidar N., McClelland M., y Hughes K. T. (2006). Identification of New Flagellar Genes of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 188(6), 2233–2243.
- Fung D. K., Lau W. Y., Chan W. T., y Yan A. (2013). Copper efflux is induced during anaerobic amino acid limitation in *Escherichia coli* to protect iron-sulfur cluster enzymes and biogenesis. *J. Bacteriol.*, 195(20), 4556–68.
- Gajiwala K. S., y Burley, S. K. (2000). Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10(1), 110–6.
- Galperin M. Y., Gaidenko T. A., Mulkidjanian A. Y., Nakano M., y Price C. W. (2001a). MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol. Lett.*, 205(1), 17–23.
- Galperin M Y, Nikolskaya A. N., y Koonin E. V. (2001b). Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.*, 203(1), 11–21.

- Galperin M. Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol.*, 6(6), 552–567.
- García B., Latasa C., Solano C., García-del Portillo F., Gamazo C., y Lasa I. (2004). Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, 54(1), 264–77.
- Gerstel U., Park C., y Römling U. (2003). Complex regulation of *csgD* promoter activity by global regulatory proteins. *Mol. Microbiol.*, 49(3), 639–654.
- Godsey M H, Baranova N. N., Neyfakh A. A., y Brennan R. G. (2001). Crystal structure of MtaN, a global multidrug transporter gene activator. *J. Biol. Chem.*, 276(50), 47178–84.
- Godsey M. H., Zheleznova Heldwein E. E., y Brennan R. G. (2002). Structural biology of bacterial multidrug resistance gene regulators. *J. Biol. Chem.*, 277(43), 40169–72.
- Groisman E. A., y Saier M. H. Jr. (1990). *Salmonella* virulence: new clues to intramacrophage survival. *Trends Biochem. Sci.*, 15(1), 30–3.
- Guo F., Gopaul D. N., y van Duyne G. D. (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature*, 389(6646), 40–6.
- Hammar M., Arnqvist A., Bian Z., Olsén A., y Normark S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.*, 18(4), 661–70.
- Han F. X., Banin A., Su Y., Monts D. L., Plodinec M. J., Kingery W. L., y Triplett G. E. (2002). Industrial age anthropogenic inputs of heavy metals into the pedosphere. *Naturwissenschaften*, 89(11), 497–504.
- Hathaway B. J., Lancashire R. J., Puddephatt R. J. (1987). Copper, Silver, Gold. *Comprehensive coordination Chemistry*. Pergamon Press, London, UK. 533–923.
- Heckman K. L., y Pease L. R. (2007). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.*, 2(4), 924–32.
- Hengge R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7(4), 263–73.
- Hengge-Aronis R. (1993). Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, 72(2), 165–8.
- Hernandez-Mendoza A., Quinto C., Segovia L., y Perez-Rueda E. (2007). Ligand-binding prediction in the resistance-nodulation-cell division (RND) proteins. *Comput. Biol. Chem.*, 31(2), 115–23.

- Hickman J. W., Tifrea D. F., y Harwood C. S. (2005). A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(40), 14422–7.
- Hobman J. L. (2007). MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Mol. Microbiol.*, 63(5), 1275–8.
- Hobman J. L., Wilkie J., y Brown N. L. (2005). A design for life: prokaryotic metal-binding MerR family regulators. *Biomaterials*, 18(4), 429–36.
- Hollingshead S., y Vapnek D. (1985). Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase. *Plasmid*, 13(1), 17–30.
- Huffman J. L., y Brennan R. G. (2002). Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12(1), 98–106.
- Humbert M. V., Rasia R. M., Checa S. K., y Soncini F. C. (2013). Protein signatures that promote operator selectivity among paralog MerR monovalent metal ion regulators. *J. Biol. Chem.*, 288(28), 20510–9.
- Jian, X., Wasinger, E. C., Lockard, J. V, Chen, L. X., y He, C. (2009). Highly Sensitive and Selective Gold (I) Recognition by a Metalloregulator in *Ralstonia metallidurans*. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(31), 10869–71.
- Joklik W. K., Willett H. P., y Amos D. B. (1989). Enterobacteriaceae Oportunistas. *Zinsser Microbiología*, 18<sup>a</sup> ed. (Editorial Médica Panamericana). 697–707.
- Jonas K., Tomenius H., Kader A., Normark S., Römling U., Belova L. M., y Melefors O. (2007). Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol.*, 7, 70.
- Kader A., Simm R., Gerstel U., Morr M., y Römling U. (2006). Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.*, 60(3), 602–16.
- Karamushka V. I., y Gadd G. M. (1999). Interaction of *Saccharomyces cerevisiae* with gold: toxicity and accumulation. *Biomaterials*, 12(4), 289–94.
- Karthikeyan S., y Beveridge T. J. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms react with and precipitate toxic soluble gold. *Environ. Microbiol.*, 4(11), 667–75.
- Kashefi K., Tor J. M., Nevin K. P., y Lovley D. R. (2001). Reductive Precipitation of Gold by Dissimilatory Fe (III) -Reducing Bacteria and Archaea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(7), 3275–3279.
- Kim J. S., Kim M. H., Joe M. H., Song S. S., Lee I. S., y Choi S. Y. (2002). The *sctR* of *Salmonella enterica* serova Typhimurium encoding a homologue of MerR protein is involved in the copper-responsive regulation of *cuiD*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 210(1), 99–103.

- Kittleson J. T., Loftin I. R., Hausrath A. C., Engelhardt K. P., Rensing C., y McEvoy M. M. (2006). Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI. *Biochemistry*, 45(37), 11096–102.
- Koskiniemi S., Pránting M., Gullberg E., Näsval J., y Andersson D. I. (2011). Activation of cryptic aminoglycoside resistance in *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.*, 80(6), 1464–78.
- Kotra L. P., Haddad J., y Mobashery S. (2000). Aminoglycosides: Perspectives on Mechanisms of Action and Resistance and Strategies to Counter Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44(12), 3249–3256.
- Koutmos M., y Coucouvanis D. (2006). Metal clusters as ligands. Substitution of Fe ions in Fe/Mo/S clusters by thiophilic CuI ions. *Inorg. Chem.*, 45(4), 1421–3.
- Kröger C., Dillon S. C., Cameron A. D. S., Papenfort K., Sivasankaran S. K., Hokamp K., Chao Y., Sittka A., Hébrard M., Händler K., Colgan A., Leekitcharoenphon P., Langridge G. C., Lohan A. J., Loftus B., Lucchini S., Ussery D. W., Dorman C. J., Thomson N. R., Vogel J., y Hinton J. C. D. (2012). The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(20), E1277–86.
- Lane D., Prentki P., y Chandler M. (1992). Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.*, 56(4), 509–28.
- Lee S. W., Glickmann E., y Cooksey D. A. (2001). Chromosomal Locus for Cadmium Resistance in *Pseudomonas putida* Consisting of a Cadmium-Transporting ATPase and a MerR Family Response Regulator. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4), 1437–1444.
- Lee S. M., Grass G., Rensing C., Barrett S. R., Yates C. J., Stoyanov J. V., y Brown N. L. (2002). The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 295(3), 616–20.
- León E., Navarro-Avilés G., Santiveri C. M., Flores-Flores C., Rico M., González C., Murillo F. J., Elías-Arnanz M., Jiménez M. A., y Padmanabhan S. (2010). A bacterial antirepressor with SH3 domain topology mimics operator DNA in sequestering the repressor DNA recognition helix. *Nucleic Acids Res.*, 38(15), 5226–41.
- Leung K. Y., Ruschkowski S. R., y Finlay B. B. (1992). Isolation and characterization of the *aadA* aminoglycoside-resistance gene from *Salmonella choleraesuis*. *Mol. Microbiol.*, 6(17), 2453–60.
- Lewis R. J., Brannigan J. A., Offen W. A., Smith I., y Wilkinson A. J. (1998). An evolutionary link between sporulation and prophage induction in the structure of a repressor:anti-repressor complex. *J. Mol. Biol.*, 283(5), 907–12.
- Lim S. Y., Joe M. H., Song S. S., Lee M. H., Foster J. W., Park Y. K., Choi S. Y., y Lee, I. S. (2002). CuiD is a crucial gene for survival at high copper environment in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Cells*, 14(2), 177–84.



- Lindenberg S., Klauck G., Pesavento C., Klauck E., y Hengge R. (2013). The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J.*, 32(14), 2001–14.
- Loferer H., Hammar M., y Normark S. (1997). Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Mol. Microbiol.*, 26(1), 11–23.
- López-Rubio J. J., Elías-Arnanz M., Padmanabhan S., y Murillo F. J. (2002). A repressor-antirepressor pair links two loci controlling light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.*, 277(9), 7262–70.
- Lu Z. H., y Solioz M. (2002). Bacterial copper transport. *Adv. Protein Chem.*, 60, 93–121.
- Lund P. A., Ford S. J., y Brown N. L. (1986). Transcriptional regulation of the mercury-resistance genes of transposon Tn501. *J. Gen. Microbiol.*, 132(2), 465–80.
- Lund P. A., y Brown N. L. (1989). Regulation of transcription in *Escherichia coli* from the mer and merR promoters in the transposon Tn501. *J. Mol. Biol.*, 205, 343–353.
- Lundblad J. R., Laurance M., y Goodman R. H. (1996). Fluorescence polarization analysis of protein-DNA and protein-protein interactions. *Mol. Endocrinol.*, 10(6), 607–12.
- Luo Y., Pfuetzner R. A., Mosimann S., Paetzel M., Frey E. A., Cherney M., Kim B., Little J. W., y Strynadka N. C. (2001). Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell*, 106(5), 585–94.
- Lutkenhaus J. F. (1977). Role of a major outer membrane protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 131(2), 631–7.
- Ma Z., Jacobsen F. E., y Giedroc D. P. (2009). Coordination Chemistry of Bacterial Metal Transport and Sensing. *Chem. Rev. (ACS Publications)*, 109(10), 4644–4681.
- Martínez-Núñez M. A., Pérez-Rueda E., Gutiérrez-Ríos R. M., y Merino E. (2010). New insights into the regulatory networks of paralogous genes in bacteria. *Microbiology*, 156(Pt 1), 14–22.
- Masuda S., y Bauer C. E. (2002). AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell*, 110(5), 613–23.
- McClelland M., Sanderson K. E., Spieth J., Clifton S. W., Latreille P., Courtney L., Porwollik S., Ali J., Dante M., Du F., Hou S., Layman D., Leonard S., Nguyen C., Scott K., Holmes A., Grewal N., Mulvaney E., Ryan E., Sun H., Florea L., Miller W., Stoneking T., Nhan M., Waterston R., Wilson R. K. (2001). Complete Genome Sequence of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium LT2. *Nature*, 413, 852–856.

- McKeegan K. S., Borges-Walmsley M. I., y Walmsley A. R. (2003). The structure and function of drug pumps: an update. *Trends Microbiol.*, 11(1), 21–9.
- Miller J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*.
- Moore M. H., Gulbis J. M., Dodson E. J., Demple B., y Moody P. C. (1994). Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O6-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *EMBO J.*, 13(7), 1495–501.
- Moss R., Scott S. D., y Binns R. A. (2001). Gold content of eastern Manus basin volcanic rocks: Implications for enrichment in associated hydrothermal precipitates. *Econ. Geol.*, 96, 91–107.
- Munson G. P., Lam D. L., Outten F. W., y O'Halloran T. V. (2000). Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 182(20), 5864–71.
- Murray K. D., y Bremer H. (1996). Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 259(1), 41–57.
- Nasser W., y Reverchon S. (2007). New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387(2), 381–90.
- Navarro-Avilés G., Jiménez M. A., Pérez-Marín M. C., González C., Rico M., Murillo F. J., Elías-Arnanz M., y Padmanabhan S. (2007). Structural basis for operator and antirepressor recognition by *Myxococcus xanthus* CarA repressor. *Mol. Microbiol.*, 63(4), 980–94.
- Newberry K. J., y Brennan R. G. (2004). The structural mechanism for transcription activation by MerR family member multidrug transporter activation, N terminus. *J. Biol. Chem.*, 279(19), 20356–62.
- Nies D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51(6), 730–50.
- Nies D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3), 313–39.
- 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), 119–29.
- Ogasawara H., Yamamoto K., e Ishihama A. (2010). Regulatory role of MlrA in transcription activation of *csgD*, the master regulator of biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 312(2), 160–8.
- Ogasawara H., Yamamoto K., e Ishihama A. (2011). Role of the biofilm master regulator CsgD in cross-regulation between biofilm formation and flagellar synthesis. *J. Bacteriol.*, 193(10), 2587–97.

- Olukoya D. K., Smith S. I., e Ilori M. O. (1997). Isolation and characterization of heavy metals resistant bacteria from Lagos Lagoon. *Folia microbiologica (Praha)*, 42(5), 441–4.
- Ortiz-Guerrero J. M., Polanco M. C., Murillo F. J., Padmanabhan S., y Elías-Arnanz M. (2011). Light-dependent gene regulation by a coenzyme B12-based photoreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 108(18), 7565–70.
- Osman D., y Cavet J. S. (2008). Copper homeostasis in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.*, 65(08), 217–47.
- Outten C. E. y O'Halloran T. V. (2001). Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, 292(5526), 2488–92.
- 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*. *J. Biol. Chem.*, 274(53), 37517–37524.
- Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., y O'Halloran T. V. (2001). The independent *cue* and *cus* systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 276(33), 30670–7.
- Outten F. W., Outten C. E., Hale J., y O'Halloran T. V. (2000). Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, *cueR*. *J. Biol. Chem.*, 275(40), 31024–9.
- Park S. J., Wireman J., y Summers A. O. (1992). Genetic analysis of the Tn21 mer operator-promoter. *J. Bacteriol.*, 174(7), 2160–71.
- Parkhill J., Ansari A. Z., Wright J. G., Brown N. L., y O'Halloran, T. V. (1993). Construction and characterization of a mercury- independent MerR activator (MerRAC): transcriptional activation in the absence of Hg (II) is accompanied by DNA distortion. *EMBO J.*, 12(2), 413–421.
- Patankar A. V, y González J. E. (2009). Orphan LuxR regulators of quorum sensing. *FEMS Microbiol. Rev.*, 33(4), 739–56.
- Paul J. H., Rose J. B., Brown J., Shinn E. A., Miller S., y Farrah S. R. (1995). Viral tracer studies indicate contamination of marine waters by sewage disposal practices in Key Largo, Florida. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6), 2230–4.
- Paul R., Weiser S., Amiot N. C., Chan C., Schirmer T., Giese B., y Jenal U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Gene. Dev.*, 18(6), 715–727.
- Pennella M. A, y Giedroc D. P. (2005). Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators. *Biometals*, 18(4), 413–28.
- Pérez Audero M. E., Podoroska B. M., Ibáñez M. M., Cauerhff A., Checa S. K., y Soncini F. C. (2010). Target transcription binding sites differentiate two groups of MerR-monovalent metal ion sensors. *Mol. Microbiol.*, 78(4), 853–65.

- Perez J. C., y Groisman E. A. (2009). Evolution of transcriptional regulatory circuits in bacteria. *Cell*, 138(2), 233–44.
- Pérez-Marín M. C., López-Rubio J. J., Murillo F. J., Elías-Arnanz M., y Padmanabhan S. (2004). The N terminus of *Myxococcus xanthus* CarA repressor is an autonomously folding domain that mediates physical and functional interactions with both operator DNA and antirepressor protein. *J. Biol. Chem.*, 279(32), 33093–103.
- Pesavento C., Becker G., Sommerfeldt N., Possling A., Tschowri N., Mehliis A., y Hengge R. (2008). Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Gene. Dev.*, 22(17), 2434–2446.
- Petersen C., y Møller L. B. (2000). Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene*, 261(2), 289–98.
- Pidot S. J., Porter J. L., Tobias N. J., Anderson J., Catmull D., Seemann T., Kidd S., Davies J. K., Reynolds E., Dashper S., y Stinear T. P. (2010). Regulation of the 18 kDa heat shock protein in *Mycobacterium ulcerans*: an alpha-crystallin orthologue that promotes biofilm formation. *Mol. Microbiol.*, 78(5), 1216–31.
- Pontel L. B., Pérez Audero, M. E., Espariz M., Checa S. K., y Soncini F. C. (2007). GolS controls the response to gold by the hierarchical induction of *Salmonella*-specific genes that include a CBA efflux-coding operon. *Mol. Microbiol.*, 66(3), 814–25.
- Pontel L. B., y Soncini F. C. (2009). Alternative periplasmic copper-resistance mechanisms in Gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.*, 73(2), 212–25.
- Porwollik S., Boyd E. F., Choy C., Cheng P., Florea L., Proctor E., y McClelland M. (2004). Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. *J. Bacteriol.*, 186(17), 5883–5898.
- Pumarola A. (1994). *Shigella* y *Escherichia* (*E. Coli* productores de diarrea). *Microbiología y Parasitología Médica*, 2<sup>a</sup> ed. (Masson-Salvat Medicina), 431–440.
- Rapisarda V A, Montelongo L. R., Farías R. N., y Massa E. M. (1999). Characterization of an NADH-linked cupric reductase activity from the *Escherichia coli* respiratory chain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 370(2), 143–50.
- Rapisarda V. A, Chehín, R. N., De Las Rivas J., Rodríguez-Montelongo L., Farías R. N., y Massa E. M. (2002). Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. *Arch. Biochem. Biophys.*, 405(1), 87–94.
- Reeve W. G., Tiwari R. P., Kale N. B., Dilworth M. J., y Glenn A. R. (2002). ActP controls copper homeostasis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* preventing low pH-induced copper toxicity. *Mol. Microbiol.*, 43(4), 981–91.

- Reith F., Rogers S. L., McPhail D. C., y Webb D. (2006). Biomineralization of gold: biofilms on bacterioform gold. *Science*, 313(5784), 233–6.
- Religa T. L., Johnson C. M., Vu D. M., Brewer S. H., Dyer R. B., y Fersht A. R. (2007). The helix-turn-helix motif as an ultrafast independently folding domain: the pathway of folding of Engrailed homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(22), 9272–7.
- Rensing C., y Grass G. (2003). Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3), 197–213.
- Roane T. M., y Perkins S. J. (2000). *Microorganisms and metal pollutants*. 403–423.
- Römling U. (2005). Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62(11), 1234–46.
- Römling U. (2008). Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. *Sci. Signal.*, 1(33), pe39.
- Römling U., y Amikam D. (2006). Cyclic di-GMP as a second messenger. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9(2), 218–28.
- Römling U., Rohde M., Olsén A., Normark. S., y Reinköster J. (2000). AgfD , the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. *Mol. Microbiol.*, 36(1), 10–23.
- Rutherford J. C. (1999). Cobalt-dependent Transcriptional Switching by a Dual-effector MerR-like Protein Regulates a Cobalt-exporting Variant CPx-type ATPase. *J. Biol. Chem.*, 274(36), 25827–25832.
- Ryan R. P., Fouhy Y., Lucey J. F., Crossman L. C., Spiro S., He Y. W., Zhang L. H., Heeb S., Cámara M., Williams P., y Dow J. M. (2006). Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103(17), 6712–7.
- Rychlik I., Martin G., Methner U., Lovell M., Cardova L., Sebkova A., Sevcik M., Damborsky J., y Barrow P. A. (2002). Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes associated with growth suppression in stationary-phase nutrient broth cultures and in the chicken intestine. *Arch. Microbiol.*, 178(6), 411–20.
- Ryjenkov D. A., Simm R., Römling U., y Gomelsky M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J. Biol. Chem.*, 281(41), 30310–4.
- Ryjenkov D. A., Tarutina M., Moskvina O. V., y Gomelsky M. (2005). Cyclic Diguanylate Is a Ubiquitous Signaling Molecule in Bacteria: Insights into Biochemistry of the GGDEF Protein Domain. *J. Bacteriol.*, 187(5), 1792–1798.
- Sambrook J. F. E. F. y M. T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*.

- Scherer C. A. y Miller S. I. (2003). *Molecular Pathogenesis of Salmonellae*. 265 – 333.
- Schmidt A. J., Ryjenkov D. A., y Gomelsky M. (2005). The Ubiquitous Protein Domain EAL Is a Cyclic Diguanylate-Specific Phosphodiesterase: Enzymatically Active and Inactive EAL Domains. *J. Bacteriol.*, 187(14), 4774–4781.
- Selmer M., y Su X. D. (2002). Crystal structure of an mRNA-binding fragment of *Moorella thermoacetica* elongation factor SelB. *EMBO J.*, 21(15), 4145–53.
- Silver S., y Phung L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32(11-12), 587–605.
- Simm R., Lusch A., Kader A., Andersson M., y Römling U. (2007). Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.*, 189(9), 3613–23.
- Solioz M., y Stoyanov J. V. (2003). Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 27(2-3), 183–95.
- Sommerfeldt N., Possling A., Becker G., Pesavento C., Tschowri N., y Hengge R. (2009). Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155(Pt 4), 1318–31.
- Soncini F. C., García Vescovi E., y Groisman E. A. (1995). Transcriptional autoregulation of the *Salmonella* Typhimurium *phoPQ* operon. *J. Bacteriol.*, 177(15), 4364–71.
- Stanisich V. A., Bennett P. M., y Richmond M. H. (1977). Characterization of a translocation unit encoding resistance to mercuric ions that occurs on a nonconjugative plasmid in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 129(3), 1227–33.
- Stoyanov J. V., Hobman J. L., y Brown N. L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol. Microbiol.*, 39(2), 502–11.
- Stoyanov J. V., y Brown N. L. (2003). The *Escherichia coli* copper-responsive *copA* promoter is activated by gold. *J. Biol. Chem.*, 278(3), 1407–10.
- Subramoni S., y Venturi V. (2009). LuxR-family “solos”: bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology*, 155(Pt 5), 1377–85.
- Summers A. O. (1992). Untwist and Shout : a Heavy Metal-Responsive Transcriptional Regulator. *J. Bacteriol.*, 174(10), 3097–3101.
- Summers A. O. (2009). Damage control: regulating defenses against toxic metals and metalloids. *Curr. Opin. Microbiol.*, 12(2), 138–44.

- Tait R. C., Rempel H., Rodriguez R. L., y Kado C. I. (1985). The aminoglycoside-resistance operon of the plasmid pSa: nucleotide sequence of the streptomycin-spectinomycin resistance gene. *Gene*, 36(1-2), 97–104.
- Takano H., Kondo M., Usui N., Usui T., Ohzeki H., Yamazaki R., Washioka M., Nakamura A., Hoshino T., Hakamata W., Beppu T., y Ueda K. (2011). Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, 193(10), 2451–9.
- Tal R., Wong H. C., Calhoon R., Gelfand D., Fear A. L., Volman G., Mayer R., Ross P., Amikam D., Weinhouse H., Cohen A., Sapir S., Ohana P., y Benziman M. (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.*, 180(17), 4416–25.
- Tamayo R., Pratt J. T., y Camilli A. (2007). Roles of Cyclic Diguanylate in the Regulation of Bacterial Pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 131–148.
- Teichmann S. A., y Babu M. M. (2004). Gene regulatory network growth by duplication. *Nat. Genet.*, 36(5), 492–6.
- Tetaz T. J., y Luke R. K. (1983). Plasmid-Controlled Resistance to Copper in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 154(3), 1263–1268.
- Thomason B. M., Cherry W. B., y Dodd D. J. (1977). *Salmonellae* in health foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34(5), 602–3.
- Toguchi A., Siano M., Burkart M., y Harshey R. M. (2000). Genetics of Swarming Motility in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium: Critical Role for Lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.*, 182(22), 6308–6321.
- Tolmasky M. E. (1990). Sequencing and expression of *aadA*, *bla*, and *tnpR* from the multiresistance transposon Tn1331. *Plasmid*, 24(3), 218–26.
- Tran van Nhieu G., y Collatz E. (1987). Primary structure of an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase AAC (6')-4, fused *in vivo* with the signal peptide of the Tn3-encoded beta-lactamase. *J. Bacteriol.*, 169(12), 5708–5714.
- Tschowri N., Busse S., y Hengge R. (2009). The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Gene. Dev.*, 23(4), 522–34.
- Tschowri N., Lindenberg S., y Hengge R. (2012). Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 85(5), 893–906.
- Ulrich L. E., Koonin E. V., y Zhulin I. B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.*, 13(2), 52–6.

- Valko M., Morris H., y Cronin M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12(10), 1161–208.
- van Hijum, S. A., Medema M. H., y Kuipers O. P. (2009). Mechanisms and evolution of control logic in prokaryotic transcriptional regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73(3), 481–509.
- Vannini A., Volpari C., Gargioli C., Muraglia E., Cortese R., De Francesco R., Neddermann P., y Marco S. Di. (2002). The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J.*, 21(17), 4393–401.
- Velge P., Cloeckaert A., y Barrow P. (2005). Emergence of *Salmonella* epidemics : The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet. Res.*, 36(3), 267–288.
- Wah D. A., Hirsch J. A., Dorner L. F., Schildkraut I., y Aggarwal A. K. (1997). Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature*, 388(6637), 97–100.
- Watanabe S., Kita A., Kobayashi K., y Miki K. (2008). Crystal structure of the [ 2Fe-2S ] oxidative-stress sensor SoxR bound to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(11), 4121–4126.
- Weber H., Pesavento C., Possling A., Tischendorf G., y Hengge R. (2006). Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 62(4), 1014–34.
- Winfield M. D., y Groisman E. A. (2003). Role of Nonhost Environments in the Lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(7), 3687–3694.
- Wintjens R., y Rooman M. (1996). Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes. *J. Mol. Biol.*, 262(2), 294–313.
- Wong H. C., Mao J., Nguyen J. T., Srinivas S., Zhang W., Liu B., Li L., Wu D., y Zheng J. (2000). Structural basis of the recognition of the dishevelled DEP domain in the Wnt signaling pathway. *Nat. Struct. Biol.*, 7(12), 1178–84.
- Wright G. D. (2010). The antibiotic resistome. *Expert opinion on drug discovery*, 5(8), 779–88.
- Wulfsberg G. (1991). The Hard and Soft Acid-Base (HSAB) Principle and Its Applications. *Principles of Descriptive Inorganic Chemistry. Middle Tennessee State University*. 266–305.
- Xiao H., Kalman M., Ikeharaz K., Zemelb S., y Glaserll G. (1991). Residual guanosine 3', 5' -bispyrophosphate synthetic activity of *reZA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.*, 266(9), 5980–5990.



- Yamamoto K., e Ishihama A. (2005). Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol. Microbiol.*, 56(1), 215–27.
- Yanisch-Perron C., Vieira J., y Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103–19.
- Zalieckas J. M., Wray L. V, y Fisher S. H. (2006). Cross-Regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* and *tnrA* Genes Provides Evidence for DNA Binding Site Discrimination by GlnR and TnrA. *J. Bacteriol.*, 188(7), 2578–2585.
- Zhang R., Pappas K. M., Pappas T., Brace J. L., Miller P. C., Oulmassov T., Molyneaux J. M., Anderson J. C., Bashkin J. K., Winans S. C., y Joachimiak A. (2002). Structure of a bacterial quorum-sensing transcription factor complexed with pheromone and DNA. *Nature*, 417(6892), 971–4.
- Zheleznova Heldwein E. E., y Brennan R. G. (2001). Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug. *Nature*, 409(6818), 378–382.
- Zheng N., Schulman B. A., Song L., Miller J. J., Jeffrey P. D., Wang P., Chu C., Koepf D. M., Elledge S. J., Pagano M., Conaway R. C., Conaway J. W., Harper J. W., y Pavletich N. P. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, 416(6882), 703–9.
- Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W., y Römling U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.*, 39(6), 1452–63.