

# Sistemas de homeostasis del cobre en las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*

**Karen Marrero y Rafael Fando.**

Departamento de Biología Molecular, Área Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: karen.marrero@cnic.edu.cu

Recibido: 8 de diciembre de 2008.

Aceptado: 24 de diciembre de 2008.

Palabras clave: cobre, homeostasis, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*.

Key words: copper, homeostasis, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*.

**RESUMEN.** El cobre es un metal de transición esencial para el metabolismo celular que está involucrado en diversos procesos biológicos como cofactor de varias enzimas. Aunque esencial, es también tóxico. Por esta razón, los organismos en todos los reinos de la vida han desarrollado sistemas homeostáticos para su control. El cobre es incluso más tóxico en las condiciones anaerobias y ligeramente ácidas del tracto gastrointestinal, lo que ha hecho que las enterobacterias, y enteropatógenos en particular, desarrollen mecanismos de adaptación a este elemento. En este trabajo, luego de una pequeña introducción sobre el cobre y sus mecanismos de toxicidad, se describen los sistemas homeostáticos de este metal en la enterobacteria Gram negativa *Escherichia coli*. A continuación, se analiza mediante métodos bioinformáticos, la conservación de estos sistemas en el enteropatógeno *Vibrio cholerae* y se sintetizan recientes hallazgos relacionados con la tolerancia al cobre en este microorganismo. Se encontró que en *V. cholerae* se conservan parcialmente los sistemas descritos en *E. coli*. En *Vibrio* está presente la ATPasa CopA, responsable de la homeostasis del cobre en el citoplasma, pero no se identificaron homólogos de la oxidasa multicobre CueO ni del sistema de transporte multicomponentes CusCFBA, ambos encargados de la homeostasis del cobre en el periplasma. Esto sugiere la existencia de otros mecanismos para controlar la concentración de cobre en este compartimiento en *V. cholerae*.

**ABSTRACT.** Copper is a transition metal essential for cellular metabolism, which is involved in many biological processes as a cofactor of several enzymes. Although essential, it is also toxic. For this reason, organisms in all kingdoms have developed homeostatic systems for its control. This element becomes more toxic under the anaerobic and slightly acidic conditions of the gastrointestinal tract forcing enterobacteria, and enteropathogens in particular, to develop mechanisms which allow them adapting to this element. In this work, after a short introduction about copper and its toxicity mechanisms, are described the copper homeostatic systems used for the Gram negative enteric bacterium *Escherichia coli*. The conservation of these systems in the enteropathogen *Vibrio cholerae* is analyzed by bioinformatic methods and recent findings related to copper tolerance in this microorganism are summarized. It was found that systems described in *E. coli* are partially conserved in *V. cholerae*, being present the CopA ATPase, responsible of copper homeostasis in the cytoplasm. However, it was not identified any homolog of multi-copper oxidase CueO nor the multicomponent system CusCFBA, both involved in copper homeostasis in the periplasmic space. This suggests the existence of other systems to control copper concentration in this compartment in *V. cholerae*.

## INTRODUCCIÓN

Las respuestas celulares a la carencia de un nutriente son complicadas si este es esencial, pero a la vez, su exceso es tóxico. El cobre es un metal de transición que como nutriente posee esta característica, el cual es un cofactor de enzimas que participan en diversos procesos biológicos esenciales para la vida.<sup>1</sup> Este elemento puede adoptar distintos estados de reducción, tanto oxidado como Cu(II) o en la forma reducida como Cu(I) y posee un elevado potencial redox que puede ser usado por las cuproenzimas para la oxidación directa de sustratos fácilmente oxidables tales como superóxido, ascorbato, catecol o fenolatos.<sup>2</sup> Debido a esta propiedad, el cobre es también tóxico, ya que las transiciones entre Cu(II) y Cu(I) de los iones libres pueden dar lugar a la generación de radicales superóxido e hidroxilo.<sup>3</sup> El Cu(II)

puede formar enlaces covalentes estables con átomos de nitrógenos los que son frecuentemente inertes, mientras que los enlaces con átomos de oxígeno son más lábiles. El Cu(I), por otro lado, se une fuertemente a grupos funcionales como los tiolatos de los residuos de cisteína y a los átomos de nitrógeno del imidazol de los residuos de histidina de ciertas proteínas, con lo que pueden afectar sus funciones fisiológicas cuando la unión es inespecífica.<sup>4</sup>

Las proteínas que contienen cobre están ampliamente distribuidas en los organismos aerobios y están involucradas en procesos vitales tales como respiración, transporte de hierro, protección al estrés oxidativo y pigmentación.<sup>5</sup> Además, este metal es necesario para la actividad de las enzimas monooxigenasas, dioxigenasas y enzimas fotosintéticas.<sup>6</sup> La deficiencia de las

enzimas que contienen cobre o presentan alteración de sus actividades causan frecuentemente enfermedades o condiciones patofisiológicas.<sup>6</sup>

En la enterobacteria Gram negativa *Escherichia coli*, las enzimas ubiquinol oxidasa,<sup>7</sup> Cu/Zn superóxido dismutasa<sup>8</sup> y amino oxidasa<sup>9,10</sup> contienen como cofactor al cobre, lo que hace necesario la existencia de sistemas que garanticen la disponibilidad intracelular de este elemento para su incorporación a estas proteínas. Debido a su toxicidad, por otra parte, sus concentraciones intracelulares necesitan ser reguladas dentro de muy estrechos límites. *E. coli*, durante su ciclo de vida, se enfrenta a concentraciones de cobre variables. En el sistema digestivo la concentración de este elemento puede ser elevada, particularmente en el estómago y en el duodeno, pero incluso en esos compartimientos probablemente no llega a ser mayor que 10  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>3</sup> Sin embargo, en esas partes del tracto gastrointestinal prevalecen condiciones ácidas y anaerobias, en las cuales el cobre se hace mucho más tóxico.<sup>11</sup> Por esta razón, las enterobacterias, y en particular, los enteropatógenos, deben haber desarrollado mecanismos homeostáticos del cobre para adaptarse a su nicho ecológico: el sistema digestivo. En los últimos años, se han realizado considerables progresos en la comprensión de los sistemas utilizados por *E. coli* para controlar la concentración intracelular de cobre, pudiendo emplearse como organismo modelo de la familia *Enterobacteriaceae*, responsable de serios trastornos gastrointestinales con gran morbilidad en la población mundial.<sup>3</sup>

*Vibrio cholerae* es una bacteria Gram negativa miembro de la familia *Vibrionaceae* y agente causal de la enfermedad diarreica aguda conocida como cólera.<sup>12</sup> Este microorganismo coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado humano y secreta la toxina del cólera, la que provoca una diarrea acuosa característica de la enfermedad. A diferencia de muchos agentes bacterianos que provocan diarrea, *V. cholerae* sobrevive en los ambientes acuáticos durante los períodos entre epidemias. De hecho, este microorganismo reside primariamente en los océanos y estuarios, algunas veces asociado con la superficie externa o los intestinos de copépodos y crustáceos.<sup>12</sup> De esta manera, *V. cholerae* debe poseer los sistemas necesarios para sobrevivir en estos dos nichos totalmente diferentes<sup>13</sup> y como enteropatógeno de humanos debe poseer sistemas de tolerancia al cobre que le permitan sobrevivir en las condiciones anaerobias y ligeramente ácidas del intestino, en las cuales el cobre es más tóxico. La elucidación de estos sistemas y su papel durante la patogénesis de *V. cholerae* son aspectos de interés para comprender los mecanismos de adaptación usados por este microorganismo durante la infección en humanos.

Este trabajo se propuso analizar los estudios recientes relacionados con los mecanismos homeostáticos del cobre en *E. coli* e investigar la conservación de estos en *V. cholerae* a través de métodos bioinformáticos. Además, resumir los últimos hallazgos asociados con la tolerancia al cobre en este microorganismo. Se encontró que en *V. cholerae* se conservan parcialmente los sistemas descritos en *E. coli*, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos para el control de la concentración intracelular de cobre.

## MECANISMOS DE TOXICIDAD DEL COBRE

Se han propuesto fundamentalmente dos mecanismos a través de los cuales un exceso de cobre puede inhibir el crecimiento de las células o causar su muerte:

la generación de especies reactivas del oxígeno e inactivación de enzimas debido a la formación de puentes disulfuro no nativos o sustitución por el cobre de otro metal de transición en los centros activos de las metaloenzimas.

En estudios en células eucariotas tratadas con un exceso de cobre, se detectaron lesiones del ADN, oxidación de proteínas, peroxidación lipídica y generación de especies reactivas del oxígeno.<sup>14-18</sup> Estudios *in vitro* mostraron que el cobre genera radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno y por lo tanto, facilita el daño oxidativo del ADN.<sup>19</sup> De hecho, las constantes de velocidad de la reducción del Cu(II) a Cu(I) por los iones sulfidrilos<sup>20</sup> y de la oxidación del Cu(I) por el peróxido de hidrógeno<sup>21</sup> indican que este proceso parecido a la reacción de Fenton pudiera ocurrir fisiológicamente a una velocidad significativa. Se ha sugerido que los radicales hidroxilo generados pudieran dañar al ADN, los lípidos y las proteínas. De hecho, una exposición de las células de mamíferos a elevadas dosis de cobre resultó en algunas indicaciones de un daño acelerado del ADN.<sup>22</sup>

Un exceso de iones cobre, por otro lado, puede competir con otros metales de transición esenciales por la unión a los centros activos de las metaloenzimas y catalizar la formación de puentes disulfuro no nativos en las proteínas, resultando en una perturbación de la función de estas.<sup>23</sup> Además, el cobre cambia la permeabilidad de las membranas y afecta la conductancia de los canales iónicos.<sup>24,25</sup>

En *E. coli*, la toxicidad del cobre está relacionada igualmente con el estrés oxidativo causado por la formación de especies reactivas del oxígeno tales como los radicales hidroxilo<sup>26</sup> y el anión superóxido.<sup>27-29</sup> La producción del anión superóxido *in vivo* por el cobre es consistente con la inducción del sistema SoxRS, regulador de la respuesta al estrés por superóxido,<sup>29</sup> e inducción de la transcripción de los genes pertenecientes a este regulón en células crecidas en presencia de un exceso de cobre.<sup>30,31</sup> La supresión de la toxicidad del cobre por el tirón (un secuestrador de radicales superóxido)<sup>32</sup> en un mutante de *E. coli* en el gen *cueO*, responsable de la tolerancia a cobre en condiciones aerobias, sugiere también la generación de radicales superóxido.<sup>28</sup> Sin embargo, el manitol (un secuestrador de radicales hidroxilo)<sup>33</sup> no tuvo ningún efecto sobre la sensibilidad al cobre en este mutante.<sup>28</sup>

Por otro lado, las células de *E. coli* activan respuestas generales de estrés gobernadas por el factor sigma RpoE<sup>34</sup> y el sistema de transducción de señales de dos componentes CpxRA en presencia de elevadas concentraciones de cobre.<sup>30,35</sup> Ambas vías responden al estrés ambiental y controlan la expresión de genes requeridos para reparar proteínas dañadas en el periplasma y en la envoltura o superficie celular.<sup>36</sup> Además, la actividad de la disulfuro isomerasa DsbC es requerida para la tolerancia al cobre.<sup>23</sup> DsbC reordena los puentes disulfuro no-nativos formados en las proteínas periplasmáticas dañadas por el cobre. Igualmente, las proteínas de respuesta al estrés por calor IbpA/B constituyen un elemento adicional en la defensa contra la toxicidad del cobre en condiciones aerobias en *E. coli*.<sup>37</sup> Las proteínas IbpA/B son chaperonas moleculares que se unen a proteínas desnaturalizadas y facilitan su subsiguiente re-plegamiento por las chaperonas dependientes de ATP DnaK, DnaJ, GrpE y Club.<sup>38-40</sup> Las proteínas IbpA/B son inducidas por concentraciones elevadas de cobre y protegen a las células del daño oxidativo causado por este.<sup>37</sup> Estos resultados sugieren que en presencia de un exceso

de cobre se producen modificaciones importantes en las proteínas y que la toxicidad de este metal no es mediada exclusivamente por un daño oxidativo. Así, en *E. coli*, la toxicidad del cobre *in vivo* no involucra un daño oxidativo del ADN.<sup>27</sup> Además, en condiciones anaerobias, el cobre es más tóxico<sup>27,41</sup> debido a que probablemente cambia el estado de oxidación de Cu(II) a Cu(I) pudiendo difundir a través de la membrana citoplasmática.<sup>3,41</sup>

### SISTEMAS HOMEOSTÁTICOS DEL COBRE EN LA ENTEROBACTERIA *E. COLI*

Los intentos iniciales para identificar los genes involucrados en el transporte y manejo intracelular de cobre en *E. coli* no fueron concluyentes. Sobre la base de una primera caracterización de mutantes sensibles a cobre, se propuso que los genes *cutA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E* y *-F* estaban involucrados en la entrada, almacenamiento intracelular o extrusión de cobre.<sup>42</sup> Sin embargo, pocos de estos genes han sido relacionados directamente con el metabolismo, transporte o regulación del cobre. El locus *cutA*<sup>43</sup> y los genes *cutC*,<sup>44</sup> *cutE*<sup>45</sup> y *cutF*<sup>44</sup> se clonaron y se les asignó una función probable. Estas proteínas pudieran tener un papel auxiliar en el manejo del cobre tal como la reducción de metioninas en proteínas importantes en la desintoxicación de cobre como la oxidasa multicobre, CueO; modificación de las porinas o asegurando un plegamiento apropiado de las proteínas en el periplasma. Cualquiera que sea su función, ellas solo tienen una pequeña contribución en la resistencia a cobre con la excepción de CutE. El gen *cutE* (*lnt*) codifica una *N*-aciltransferasa de apo-lipoproteínas, la que pudiera acilar a apo-lipoproteínas requeridas para la tolerancia a cobre como CusC.<sup>46,47</sup> Sin embargo, la mayoría de los genes *cut* probablemente solo están relacionados indirectamente con la homeostasis del cobre en *E. coli*.<sup>48</sup>

El cobre cruza la membrana externa probablemente a través de las porinas, ya que se han aislado mutantes deficientes de estas proteínas resistentes a cobre<sup>49</sup> y para una completa tolerancia a este elemento se requiere una expresión aumentada de la porina OmpC.<sup>34</sup> En las bacterias no se ha descrito concluyentemente cómo el cobre atraviesa la membrana citoplasmática, a no ser la posibilidad de que el Cu(I) pueda equilibrarse a través de esta barrera.<sup>41</sup> Sin embargo, es poco probable que esta sea una ruta principal de entrada de cobre, debido a que las células eucariotas necesitan transportadores específicos para el Cu(I).<sup>5</sup> Se ha sugerido que *E. coli* reduce el Cu(II) durante la entrada a la célula mediante la actividad de la NADH deshidrogenasa-2 (reductasa cúprica-NDH-2) como ocurre en eucariotas,<sup>3</sup> pero no queda claro si la reducción de cobre es la función fisiológica de esta enzima, ya que una cepa mutante en el gen que codifica para esta proteína fue más sensible a elevadas o bajas concentraciones de cobre que la cepa salvaje,<sup>50,51</sup> lo que sugiere que la NDH-2 disminuye los efectos dañinos del cobre o el estrés oxidativo en la cadena respiratoria o ambos y contribuye a la desintoxicación de este elemento.<sup>51</sup>

En *E. coli* se han identificado varios sistemas que regulan directamente la concentración de cobre intracelular.<sup>3</sup> Un componente central en la homeostasis del cobre es la ATPasa CopA transportadora de cobre, presente en la membrana interna, la que asegura la remoción del exceso de Cu(I) del citoplasma. Una vez que el cobre es transportado al periplasma por CopA, queda sujeto a la acción de la oxidasa multicobre CueO y el sistema de extrusión de cobre multi-componentes CusCFBA. Además, en algunas cepas de *E. coli* existen factores codificados en plasmidios que aumentan consi-

derablemente la tolerancia al cobre, los que permiten el crecimiento en ambientes ricos en este metal.

### Sistema Cue

Uno de los sistemas reguladores que median la tolerancia al cobre en *E. coli* es el denominado Cue (*Cu-efflux*) que es controlado por el regulador transcripcional CueR (*Cu-export regulator*). CueR es activado por los iones Cu<sup>+</sup> y Ag<sup>+</sup> presentes en el citoplasma y activa la expresión de los genes *copA* y *cueO*.<sup>48,52,53</sup> CueR, además, es activado por los iones oro.<sup>54</sup>

CueR es un activador transcripcional de la familia MerR que posee un motivo de unión al ADN en la región N-terminal, un dominio de unión a cobre en la región C-terminal y un dominio de dimerización.<sup>55</sup> Los miembros de la familia MerR que se activan por metales, incluyendo a CueR, forman un subgrupo de proteínas que son homólogas incluso en su región C-terminal.<sup>52</sup> La especificidad por el cobre en el caso de CueR viene dada por el espaciamiento de siete aminoácidos entre las cisteínas conservadas 112 y 120 de la región C-terminal.<sup>48,52</sup>

CueR es muy sensible a los iones Cu<sup>+</sup> libres intracelularmente en el intervalo 10<sup>-21</sup> molar, lo que corresponde a menos de un ion cobre por célula.<sup>56</sup> Las bases de esta ultra-sensibilidad fueron estudiadas resolviendo la estructura de la proteína mediante Difracción de Rayos X.<sup>57</sup> La estructura cristalina de CueR reveló que el sitio de unión de cobre es interno, inaccesible a disolventes, en una cavidad formada en la superficie de contacto entre los monómeros en el dímero. Este sitio restringe el metal a una geometría lineal con solo dos ligandos de coordinación: los átomos de azufre de las cisteínas conservadas 112 y 120.<sup>57</sup> La mutación de estas cisteínas hace que CueR no se active en presencia de iones cobre, plata y oro, *in vivo*<sup>54</sup> e *in vitro*.<sup>58</sup> Las dos cisteínas son necesarias para detectar el cobre con una gran afinidad en condiciones fisiológicas y los sitios de unión de cobre deben estar ocupados para la actividad transcripcional.<sup>58</sup> En el dímero de CueR, los iones Cu<sup>+</sup> se unen por las cisteínas 112 y 120 de cada monómero, sin ninguna interacción adicional inter-monómeros.<sup>58</sup>

### ATPasa CopA

CopA es el componente central de la homeostasis del cobre en *E. coli* en condiciones aerobias y anaerobias<sup>41</sup> y su expresión es activada por CueR.<sup>48,52,53</sup> CopA es una ATPasa que bombea el exceso de cobre desde el citoplasma al periplasma<sup>59</sup> y aunque estudios iniciales indicaron que no estaba implicada en la resistencia a la plata,<sup>59,60</sup> un trabajo posterior demostró su función en la exportación de los iones de este metal.<sup>61</sup>

CopA pertenece a la superfamilia de las ATPasas tipo-P, que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para transportar sustratos cargados a través de las membranas biológicas<sup>62</sup> y se caracterizan por poseer un dominio conservado de unión a ATP, un residuo de ácido aspártico que es el sitio de formación de la fosfoenzima y un dominio fosfatasa. Una rama incluye a las ATPasas transportadoras de cationes de metales débiles,<sup>63</sup> denominación en la que el término débil hace referencia a su carácter de ácidos débiles de Lewis. Estas ATPasas pueden ser subdivididas en bombas de cationes monovalentes y divalentes.<sup>64,65</sup> Las ATPasas transportadoras de iones de metales débiles tienen características conservadas que no están presentes en otras ATPasas tipo-P, en particular, los motivos de unión a metales ricos en histidina o cisteínas en la región N-terminal, la secuencia cisteína-prolina-cisteína (o histidina) presente

en el sexto segmento transmembranoso y la existencia de ocho segmentos transmembranosos. Estas bombas son frecuentemente llamadas ATPasas tipo-CPx,<sup>66</sup> tipo-P de metales débiles,<sup>64,67</sup> o tipo-P-1B.<sup>68</sup> Este último grupo se subdivide en al menos cinco ramas según la especificidad por el metal transportado. El grupo de las ATPasas tipo-P-1B-1 incluye a todas las ATPasas transportadoras de cobre, tales como las humanas que provocan las enfermedades de Menkes<sup>69</sup> o Wilson<sup>70</sup> y las bacterianas CopA de *Helicobacter pylori*<sup>71</sup> y de *E. coli*.<sup>59</sup>

En común con otras ATPasas tipo-P-1B-1, CopA de *E. coli* es una proteína integral de la membrana citoplasmática que posee ocho segmentos transmembranosos y una región N-terminal citoplasmática con dos dominios de unión a metales que contienen la secuencia cisteína-x-x-cisteína, donde x es cualquier aminoácido. En la región citoplasmática, conectando los segmentos transmembranosos cuatro y cinco, se encuentra el dominio conservado de fosfatasa y en las hélices transmembranosas sexta, séptima y octava están presentes las secuencias conservadas cisteína-prolina-cisteína, tirosina-asparagina y metionina-x-x-serina, respectivamente, que forman parte del sitio de unión a cobre en la membrana citoplasmática durante su transportación.<sup>68</sup> En la región citoplasmática que conecta los segmentos transmembranosos sexto y séptimo se encuentran los dominios de unión de ATP y fosforilación y la secuencia conservada (histidina-prolina), supuestamente relacionada con la unión a metales, que solo está presente en las ATPasa tipo-P de metales débiles.<sup>59</sup>

CopA forma un intermediario acil-fosfato con ATP solo en presencia de los iones  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Ag}^+$ , pero no en presencia de los iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Co}^{2+}$  y su actividad fosfatasa es estimulada solo por los iones  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Ag}^+$  e inhibida por vanadato de sodio, un inhibidor específico de las ATPasas tipo-P. Además, CopA solo es capaz de transportar cobre en presencia de ditiotreitol, un potente reductor, necesario para reducir el  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ .<sup>72</sup> Todos estos resultados sugieren que las especies transportadas por CopA son  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Ag}^+$ .

Estudios recientes han permitido develar muchos aspectos relacionados con la estructura, función y mecanismo catalítico de las ATPasas tipo-P-1B.<sup>68</sup> Las estructuras tridimensionales de los dominios citoplasmáticos involucrados en la fosforilación, unión de ATP, fosfatasa y de unión a metales de diversas ATPasas se han determinado.<sup>68</sup> En el caso particular de CopA de *E. coli*, se demostró que los motivos conservados cisteína-x-x-cisteína de la región N-terminal no son requeridos para la función de la proteína y no confieren especificidad a los metales.<sup>73</sup> Estos motivos, por otro lado, pudieran tener una función reguladora.<sup>74</sup> La especificidad a los metales está más bien dada por los sitios de unión a metales presentes en el dominio de translocación presente en la membrana citoplasmática<sup>68</sup> al que *in vitro*, según un estudio reciente de González-Guerrero y cols. con CopA de *Archaeoglobus fulgidus*, se transfieren los iones  $\text{Cu}^+$  desde la chaperona CopZ.<sup>75</sup> En el caso de *E. coli*, donde no se ha identificado ninguna chaperona citoplasmática específica para el cobre, y está demostrada la existencia de bajas concentraciones de iones  $\text{Cu}^+$  libres en el citoplasma, no está claro aún cuál es el mecanismo de captura de  $\text{Cu}^+$  para su posterior transportación.

### Oxidasa multicobre CueO

CueO es una oxidasa multicobre periplasmática involucrada en la resistencia a cobre en aerobiosis que oxida el  $\text{Cu(I)}$  a la forma menos tóxica  $\text{Cu(II)}$ .<sup>41,76,77</sup> CueO

protege las enzimas periplasmáticas del daño inducido por el cobre, lo que sugiere una función de desintoxicación del cobre periplasmático.<sup>77</sup>

Las oxidasas multicobre combinan la oxidación de un electrón de cuatro moléculas de sustrato a la reducción completa del oxígeno molecular a agua, empleando una unidad funcional formada por tres sitios de unión a cobre con propiedades espectroscópicas y funcionales diferentes: sitio de unión a cobre tipo 1, 2 y 3.<sup>78</sup> La proteína CueO purificada posee las propiedades espectroscópicas típicas de la presencia de cada uno de los sitios de unión a cobre.<sup>77</sup> CueO está formada por tres dominios similares parecidos a las azurinas conectados a través de péptidos y contiene cuatro iones cobre por monómero, formando un centro activo típico de las oxidasas multicobre.<sup>79</sup> Adicionalmente, posee una región extensa, rica en metioninas, que forma una hélice que cubre la entrada al sitio de cobre tipo 1 (T1).<sup>79</sup> La estructura cristalina de CueO unida a cobre exógeno fue determinada y se identificó un quinto sitio de unión a cobre.<sup>80</sup> Un ion  $\text{Cu(II)}$  se une a una región rica en metioninas en una posición que puede mediar la transferencia de electrones desde el sustrato al sitio de cobre T1.<sup>80</sup> La mutación de los residuos de unión del quinto ion cobre (metioninas 359 y 441 y aspárticos 439 y 460) inactivan la enzima.<sup>80</sup> La remoción de la extensa región rica en metioninas que forma la hélice encima del sitio de unión del sustrato, evidenció que esta funciona como una barrera que limita el acceso de sustratos orgánicos, lo que provee a CueO con la especificidad propia de una oxidasa de iones  $\text{Cu(I)}$ .<sup>81</sup>

El mecanismo de la incorporación del cobre a CueO fue investigado por espectroscopia y los resultados indican que el proceso es secuencial, siendo el sitio de unión a cobre Tipo 1 el primero en ser reconstituido, seguido por el sitio Tipo 2 y los sitios Tipo 3.<sup>82</sup> El aminoácido glutámico-106 constituye el paso limitante para la reconstitución del sitio de cobre tri-nuclear.<sup>83</sup>

CueO posee un péptido señal perfecto reconocido por la maquinaria de translocación de proteínas TAT (*twin-arginine translocation*)<sup>48</sup> y la chaperona DnaK desempeña un papel central en la translocación de CueO por este sistema.<sup>84</sup> El sistema TAT transporta al periplasma a proteínas totalmente plegadas unidas con sus cofactores.<sup>85-89</sup> Por esta razón, inicialmente se sugirió que la carga de cobre por CueO en el citoplasma con su subsiguiente transporte al periplasma pudiera contribuir a la eliminación de este elemento del citoplasma.<sup>76</sup> Sin embargo, el impacto de esta translocación de cobre dependiente de CueO en la resistencia a cobre debe ser marginal, ya que CopA transporta el cobre a través de la membrana citoplasmática mucho más eficientemente.

Muchos estudios se han centrado en las propiedades de CueO y su papel en la protección de *E. coli* contra la toxicidad del cobre.<sup>79,80,90-92</sup> CueO purificada posee una excelente actividad oxidasa de los iones  $\text{Cu(I)}$ ,<sup>92</sup> así como una actividad fenol oxidasa usando el sideroforo enterobactina como sustrato.<sup>90,91</sup> La oxidación de hierro ferroso por CueO solo fue detectada en presencia de un exceso de cobre, lo que sugiere que esta actividad solo puede ser significativa en esas condiciones.<sup>77,91,92</sup> Previamente se había mostrado que CueO oxidaba *in vitro* la enterobactina y los catecoles relacionados, produciendo un precipitado coloreado.<sup>91</sup> Esto llevó a sugerir que la formación de un precipitado coloreado podía estar relacionada con reacciones de polimerización involucradas en los procesos de melanización microbianos y se especuló que la síntesis de un compuesto para unir cobre podía ser una excelente manera de disminuir sus concentraciones tóxicas y una

de las funciones fisiológicas de CueO.<sup>3</sup> Recientemente, Rensing y cols. han propuesto un modelo en el que CueO tiene un papel central en la homeostasis del cobre en el periplasma, en el cual se convierte el Cu(I) tóxico en la forma menos permeable y tóxica Cu(II). Esta actividad pudiera detener el daño a la membrana citoplasmática y la reducción de Cu(II), protegiendo de esta manera a las células del daño inducido por el cobre, ya que previene la reacción de Fenton del cobre redox activo. La oxidación de la enterobactina por CueO, además previene que este difenol reduzca el Cu(II) al pro-oxidante Cu(I) ayudando a proteger a la célula contra la toxicidad del cobre, particularmente, cuando el hierro es limitante, que es cuando se producen estos sideroforos.<sup>90</sup> Adicionalmente, la enterobactina oxidada puede secuestrar el cobre contribuyendo a su destoxificación.

Existe una estrecha relación entre CueO y la homeostasis de otros metales.<sup>28,93</sup> Un mutante de *cueO*, muy sensible a iones cobre en medio mínimo, acumula concentraciones mayores de cobre que la cepa salvaje y su crecimiento se recupera en presencia de este elemento cuando se adiciona  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  o  $Fe^{2+}$ .<sup>28</sup> Un mutante en el gen *cueO* de una cepa de *E. coli* uropatógena acumula hierro con una eficiencia mayor comparada con su cepa parental, lo que le permite una mayor colonización del tracto urinario, a pesar de ser más sensible al peróxido de hidrógeno.<sup>93</sup>

CueO ha sido relacionado con otros procesos. Así, la expresión del gen *cueO* se indujo fuertemente en respuesta a la exposición a plata y se especuló que en esas condiciones CueO oxida a los iones Ag(I).<sup>94</sup> Sin embargo, esto ha de verificarse experimentalmente, ya que la inducción de la expresión de *cueO* pudiera deberse a una activación por el regulador CueR, el que se activa en presencia de iones Ag(I). Además, en un mutante *cueO* de *E. coli*, la expresión de genes asociados con la autoagregación aumentó, mientras que la de los relacionados con la motilidad disminuyó.<sup>95</sup> La represión de la expresión de genes relacionados con la motilidad y la quimiotaxis en presencia de concentraciones elevadas de cobre se reportó previamente.<sup>30</sup> En un mutante *cueO*, la concentración intracelular de cobre debe ser mayor, de manera que estos genes deben estar reprimidos de modo similar.

### Sistema Cus

El sistema Cus (*Cu-Sensing*) es el otro elemento de la homeostasis de cobre en *E. coli* y es codificado por el *loci cus* que contiene dos operones adyacentes que se transcriben en direcciones opuestas. Un operón codifica para los genes *cusRS* que forman un sistema regulador de dos componentes. CusS es un sensor histidina-quinasa localizado probablemente en la membrana citoplasmática que detecta concentraciones elevadas de cobre en el periplasma y CusR actúa como un regulador de respuesta que activa la transcripción de los genes adyacentes *cusCFBA*, luego de ser fosforilado por CusS.<sup>41,46,60,76,96</sup> El determinante *cus* es inducido por el cobre y en una menor extensión por la plata. CusCFBA confiere además, resistencia a la plata en *E. coli*<sup>60,94,97</sup> y las formas iónicas transportadas por este sistema son Cu(I) y Ag(I).<sup>98,99</sup>

Los productos génicos CusCBA son homólogos a la familia de transportadores tripartitos constituidos por una proteína integral de membrana citoplasmática, una de fusión de membranas y otra de membrana externa homóloga a TolC, los que bombean sus sustratos al exterior celular usando el gradiente de protones de la membrana interna como fuente de energía y han sido

involucrados en la exportación de iones metálicos, xenobióticos y medicamentos.<sup>100</sup>

Las proteínas del sistema CusCFBA han sido caracterizadas funcionalmente.<sup>96</sup> CusC es una lipo-proteína de membrana externa con homología a la proteína TolC de respuesta al estrés.<sup>46,96</sup> CusC no es esencial, pero sí necesaria para que el sistema CusCFBA confiera una completa tolerancia al cobre.<sup>96</sup> CusB, por otra parte, pertenece a la familia de proteínas de fusión de las membranas, típicamente anclada en la membrana interna con un dominio periplasmático grande.<sup>101</sup> Las proteínas de fusión de membranas son agrupadas también en la familia de proteínas periplasmáticas de flujo<sup>102</sup> o proteínas periplasmáticas adaptadoras.<sup>103,104</sup> Generalmente se considera que esta proteína tiene como función unir componentes presentes en la membrana externa e interna. Esta función ha sido sustentada por experimentos donde se ha demostrado una interacción directa entre este componente y las proteínas de membrana interna y externa.<sup>105</sup> En el caso de CusB, esencial para el sistema CusCFBA en la resistencia al cobre,<sup>96</sup> se demostró recientemente que es capaz de unir Cu(I) y Ag(I) *in vitro*, a través de tres residuos de metionina conservados (M21, M36 y M38).<sup>106</sup> Estas metioninas son importantes también para la tolerancia a cobre *in vivo*, lo que sugiere un importante papel para la unión de Cu(I) por CusB en la resistencia a cobre conferida por el sistema CusCFBA.<sup>106</sup>

CusA es la bomba central del sistema CusCBA y es esencial para el funcionamiento de este.<sup>96</sup> CusA pertenece a la superfamilia de proteínas RND (*Resistance-nodulation-cell division*), la que fue primeramente descrita como un grupo de proteínas bacterianas transportadoras involucradas en la resistencia a metales (*Ralstonia metallidurans*), en la nodulación (*Mesorhizobium lotii*) y en la división celular (*E. coli*).<sup>107</sup> Esta superfamilia incluye siete familias de proteínas que pueden ser encontradas en todos los reinos de la vida.<sup>108</sup> Las RND son proteínas integrales de membrana y transportan diferentes sustratos utilizando la energía del gradiente de concentración de la membrana citoplasmática, a través del antiporte de protones (a la vez que sale el sustrato entra un protón).<sup>109</sup> Los miembros de la familia de transportadores RND relacionados con el flujo de metales pesados son muy específicos para sus sustratos y poseen la habilidad de diferenciar entre iones monovalentes y divalentes.<sup>108</sup> En CusA, esta especificidad está dada por la presencia de los aminoácidos alanina-399, aspártico-405 y glutámico-412 en su IV segmento transmembranoso.<sup>3</sup> Adicionalmente, las metioninas conservadas en posición 573, 623 y 672, presentes en el segundo lazo periplasmático de CusA, son absolutamente necesarias para conferir resistencia a cobre en *E. coli*.<sup>96</sup>

La presencia de la proteína CusF es una característica única del sistema CusCFBA y homólogos de ella solo se han encontrado en transportadores multi-subunitarios relacionados con la resistencia a cobre.<sup>96</sup> CusF es necesaria para que el sistema CusCBA confiera resistencia completa a cobre<sup>96</sup> y el transcripto de *cusF* es el más expresado en respuesta a un exceso de Cu(II)<sup>34</sup> y Zn(II).<sup>110</sup> Una caracterización inicial de CusF demostró que era una proteína periplasmática, capaz de unir *in vitro* un ión Cu(II) por molécula e interactuar con CusC y CusB *in vitro*.<sup>96</sup> La caracterización de CusF unido a Cu(II) demostró que un ion cobre (II) es unido en una coordinación tipo 2 típica.<sup>111</sup> Sin embargo, la estructura cristalina tridimensional de CusF y CusF unida a Cu(I) sugiere que el Cu(I) es unido en condiciones anaerobia por CusF

a través de los residuos conservados de histidina-36 y las metioninas 47 y 48, los que están agrupados en la estructura tridimensional.<sup>112</sup> De hecho, una mutación de la metionina 47 ó 48 afecta la resistencia a cobre *in vivo*.<sup>96</sup> Posteriormente, se demostró que *in vitro* CusF une con una gran afinidad un ion Cu(I) o Ag(I), pero no Cu(II) e incluso la afinidad por el ion plata es mayor.<sup>99</sup> CusF usa un nuevo sitio de reconocimiento para los metales, donde el ion Cu(I) es unido por los residuos conservados de histidina-36, las metioninas 47 y 48 y el triptófano 44.<sup>113</sup>

Se había sugerido que CusF pudiera actuar como una chaperona periplasmática de metales que entregara los iones metálicos al sistema CusCBA;<sup>98,99,111-114</sup> sin embargo, solo un estudio *in vitro* reciente demostró que CusF puede actuar como una chaperona de metales al interactuar específicamente con la proteína CusB, solo en presencia de Cu(I), transfiriéndole los iones Cu(I).<sup>98</sup> De esta manera, CusF pudiera tener un doble papel en la protección al daño inducido por el cobre en el periplasma, por un lado secuestrando este elemento y por otro, potenciando su entrega al sistema CusCBA para su exportación.

La estructura de la proteína de membrana externa TolC, la que está relacionada con CusC, se determinó recientemente. Esta proteína se asocia en un trímero que forma un canal trans-periplasmático embebido en la membrana externa.<sup>104,115,116</sup> La determinación de la estructura de los otros componentes de estos sistemas ha permitido identificar cómo se integran y funcionan globalmente.<sup>117</sup> Por homología con los sistemas de transporte de drogas, se propone un modelo en el que CusA, B y C interactúan para formar un canal que se extiende por el periplasma y conecta el citoplasma y el espacio extracelular transportando los iones Cu(I)<sup>98,99</sup> a través de la membrana externa desde el periplasma hacia el exterior celular.<sup>96</sup>

### Expresión de los sistemas Cue y Cus

Los sistemas *cus* y *cue* confieren tolerancia a cobre en *E. coli* y aunque parcialmente redundantes, se requieren en condiciones diferentes.<sup>41</sup> Así, el sistema Cue, que incluye a CopA y CueO, es el componente primario de la resistencia a cobre en aerobiosis y Cus es un sistema secundario. Aunque no esencial para la tolerancia a ese elemento en aerobiosis, cuando este sistema es mutado en una célula con el regulador del sistema Cue inactivo, se aumenta la sensibilidad a cobre.<sup>41</sup> De esta manera, el sistema Cus es necesario en condiciones aerobias solo cuando las concentraciones de cobre saturan la capacidad de exportación del sistema Cue o si este sistema no es totalmente funcional. En condiciones anaerobias, cuando la toxicidad del cobre aumenta y CueO no es activa, el sistema Cus es también necesario para la tolerancia a este elemento, ya que un mutante en el sistema Cus exhibe una gran sensibilidad a cobre en estas condiciones.<sup>41</sup>

El diferente papel desempeñado por esos sistemas en las distintas condiciones de cultivo en *E. coli*, se corresponde con su patrón de expresión diferente, el que responde a su vez, a la regulación por los sistemas de sensores citosólico (CueR) y periplasmático (CusRS). Así, la regulación por CueR y CusRS responden a la disponibilidad de cobre y oxígeno en el citoplasma y periplasma, respectivamente. En ausencia de cobre, en condiciones aerobias y anaerobias, el regulón *cue* es expresado moderadamente; sin embargo, el loci *cus* se expresa escasamente. El sistema *cus*, por otra parte, no se transcribe hasta que se alcanza una mayor concentración de cobre y muestra una inducción de 800 veces.

Así, el Cue es el sistema primario de eflujo de cobre y el Cus se activa solo cuando Cue se satura. En aerobiosis, el sistema *cue* es activado para conferir tolerancia a cobre a concentraciones moderadas y elevadas, mientras que el *cus*, se activa tan solo a concentraciones de cobre casi letales.<sup>41</sup>

El patrón de expresión es diferente en condiciones anaerobias. Así, los niveles de expresión del sistema *cue* en ausencia de cobre son mayores que en condiciones aerobias, lo que sugiere concentraciones intracelulares de cobre mayores en estas condiciones. Sin embargo, la mitad de la inducción máxima del promotor de *cueO* ocurre a una concentración mayor de cobre en anaerobiosis que aerobiosis; pero la mitad de la inducción máxima del promotor de *cusC* ocurre a una concentración menor de cobre en estas condiciones que en las aerobias, lo que sustenta su mayor importancia en estas condiciones.<sup>41</sup>

Estudios iniciales sugirieron que en condiciones aerobias, a concentraciones de cobre externas bajas e intermedias, el periplasma pudiera funcionar como un compartimiento de almacenamiento de cobre en *E. coli*. Cuando las concentraciones ambientales de cobre aumentan más allá de la cuota celular esencial, el sistema *cue* es el primero en ser inducido. Este es medianamente inducido y limpia el citoplasma del exceso de cobre, dejando a las células con un *pool* periplasmático de cobre disponible localmente. Si la capacidad de detoxificación de cobre del sistema *cue* comienza a saturarse, el sistema *cus* se activa y transporta los iones cobre desde el periplasma al espacio extracelular. Coincidentemente, estudios recientes sugieren que el citoplasma procarionótico opera en condiciones de privación de cobre y todas las enzimas conocidas dependientes de cobre en *E. coli* se encuentran en la envoltura celular.<sup>8,41,79,118-120</sup> Se ha sugerido que los iones cobre citoplasmáticos disponibles, unidos o libres, son detectados por los sensores Cu(I) y rápidamente transportados a la envoltura celular para su incorporación en las enzimas o expulsión.<sup>57</sup>

En anaerobiosis, la célula puede tolerar niveles de estrés bajos a moderados sin inducir ningún sistema, aunque en estas condiciones, se observa un incremento significativo de la acumulación de cobre.<sup>41</sup>

En aerobiosis, la expresión de los genes *cueO* y *copA* se induce a una concentración menor de cobre que la de *cusC*. En anaerobiosis, esta situación se revierte y *cusC* se activa antes, mientras que el punto de inducción de cobre para *cueO* se hace mayor.<sup>41</sup> La localización independiente de los dos sensores de los sistemas puede explicar la regulación aerobia y anaerobia. En aerobiosis el cobre en el ambiente oxidante del periplasma puede existir en el estado Cu(II), pero las reductasas de membrana y la cadena transportadora de electrones deben convertir una fracción del cobre a Cu(I). Como los iones Cu(I) son más fáciles de mover a través de la bicapa lipídica, puede ser la forma tomada por la célula en el citoplasma.<sup>41</sup> El ultrasensible sensor citoplasmático CueR, se activa probablemente por bajas concentraciones de Cu(I) en este compartimiento, activando la transcripción de *cueO* y *copA* para eliminar los iones Cu(I) libres presentes.<sup>41</sup>

El sensor periplasmático CusS, aunque presente en el ambiente oxidante del periplasma, debe responder a los iones Cu(I), ya que responde a los iones Ag(I). Mientras CopA y CueO son capaces de exportar y oxidar el Cu(I), CusS no se activa y el sistema *cus* no se induce. Cuando el nivel de cobre ambiental aumenta, CueR estimula la transcripción hasta un límite de 12 veces. Expuesto a concentraciones extremadamente elevadas de cobre, el sistema CueO-CopA es saturado, lo que lleva a una

acumulación de cobre en el periplasma.<sup>41</sup> Este exceso de Cu(I) luego activa al sensor periplasmático CusS, el que a su vez, induce al sistema *cus* y el exceso de cobre es transportado fuera de la célula.

En condiciones anaerobias, el poder oxidante del compartimiento periplasmático se reduce, lo que unido a la pérdida de actividad dependiente de oxígeno de CueO, conduce a un aumento en la concentración periplasmática de Cu<sup>+</sup>. Se ha propuesto que esta condición dispara la expresión del locus *cus* a concentraciones de cobre externas más bajas en condiciones anaerobias.<sup>41</sup>

### Sistemas de resistencia a cobre codificados en plasmidios

Además de los sistemas Cue y Cus que son codificados en el cromosoma, en *E. coli* existen otros sistemas codificados en plasmidios que confieren una resistencia adicional a cobre.<sup>121</sup> Los operones de resistencia a cobre han sido caracterizados en *E. coli*, *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* y *Xanthomonas campestris*.<sup>122</sup> Los genes de estos determinantes de resistencia a cobre son muy homólogos y tienen probablemente una función similar.

El plasmidio conjugativo pRJ1004 confiere resistencia a cobre y fue aislado de una cepa de *E. coli* de la flora intestinal de puercos alimentados con una dieta suplementada con sulfato de cobre como un promotor del crecimiento.<sup>123</sup> El determinante de resistencia a cobre especificado por este plasmidio involucra al cluster de genes *pco*, el que contiene siete genes: *pcoABCDRSE*.<sup>124</sup> La resistencia a cobre en *P. syringae* pv. *Tomato*, por otro lado, está dada por el determinante *cop*, que contiene seis genes, *copABCDRS*, organizado en dos operones: *copABCD* y *copRS*. Esta organización se encuentra también en el determinante *pco*, pero con un gen adicional, *pcoE*, cuesta abajo.<sup>124-126</sup> En todos los casos, se ha demostrado que la resistencia a cobre es inducible.<sup>127,128</sup> El sistema regulador de dos componentes CopRS (PcoRS en *E. coli*) induce la transcripción del operón *copABCD*, donde PcoR actúa como un activador transcripcional que se une al ADN y CopS parece ser una histidina-quinasa periplasmática que detecta el cobre.<sup>129,130</sup> El gen *pcoE* se transcribe desde un promotor independiente, bajo el control de PcoRS.<sup>131</sup> Experimentos de transporte con <sup>64</sup>Cu sugieren que un mecanismo de extrusión, dependiente de energía, estaba asociado con los genes de resistencia a cobre del plasmidio pRJ1004.<sup>124</sup> Sin embargo, la disminución de acumulación de cobre observada pudiera también deberse a una menor entrada de cobre y no necesariamente a un mecanismo de eflujo adicional.<sup>3</sup>

Resultados de estudios recientes han logrado dilucidar las funciones de algunos componentes de los sistemas involucrados en la resistencia a cobre. Se ha propuesto otro modelo a través del cual el determinante *pco* confiere resistencia a cobre.<sup>3</sup> PcoA es una proteína periplasmática y componente central del determinante *pco*. Pertenece a la familia de oxidasas multicobre<sup>132,133</sup> y sustituye funcionalmente a CueO en *E. coli*, lo que indica que estas proteínas tienen una función similar.<sup>132,134</sup> Al igual que CueO, PcoA tiene un motivo arginina-arginina en su N-terminal y es probablemente translocada por el sistema TAT con cobre unido a su sitio activo.<sup>3</sup> PcoA tiene actividad oxidasa y pudiera, por analogía con CueO, funcionar en la desintoxicación de cobre oxidando al Cu(I) a la forma menos tóxica Cu(II) u oxidando a los sideróforos catecoles, tales como la enterobactina, que pueden secuestrar al cobre o ambos.

PcoB es una proteína de 33 kDa, probablemente de membrana externa. En una cepa de *E. coli* sensible a cobre, *pcoA* y *pcoB* juntos confieren una mayor resistencia

a cobre comparado con *pcoA* solo, lo que indica que ellos pueden interactuar, pero la función de PcoB no ha sido dilucidada aún. PcoC y PcoD son solo necesarios para la máxima resistencia a cobre y se sugirió que pudieran funcionar juntos en la entrada de cobre. PcoC es una proteína periplasmática de 12 kDa,<sup>132,134</sup> que une cobre y forma dímeros.<sup>132,134-136</sup> PcoC une Cu(I) y Cu(II) a la vez<sup>137</sup> y PcoA es capaz de oxidar el Cu(I) unido a ella.<sup>133</sup> PcoC pudiera actuar además como una metalochaperona y regular la captura de cobre por PcoD, una proteína integral de membrana de 34 kDa, ya que en *Bacillus subtilis* existe una proteína que parece ser una fusión de dos proteínas, una homóloga a PcoC y otra a PcoD.<sup>3</sup>

PcoE, la que es transcrita desde un promotor independiente, es una pequeña proteína periplasmática que es requerida para observar una resistencia total al cobre y debe funcionar como chaperona. Está relacionada con SilE, que es una proteína de unión a plata del sistema de resistencia a plata codificado por un plasmidio en *Salmonella*<sup>138</sup> y con CusF.

### SISTEMAS HOMEOSTÁTICOS DEL COBRE PRESENTES EN *VIBRIO CHOLERAE*

La primera secuencia del genoma de una cepa de *V. cholerae* (N16961) se publicó en 2000<sup>139</sup> y actualmente, el número de genomas secuenciados o en proceso de secuenciación de cepas de *V. cholerae* es de 15 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom\\_table.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi)), incluyendo aislados ambientales y clínicos. La secuenciación del genoma de un organismo permite realizar estudios de expresión global a nivel del transcriptoma y proteoma en diferentes condiciones de cultivo,<sup>140</sup> así como evaluar la conservación de sistemas genéticos involucrados en diferentes procesos descritos en otros microorganismos.<sup>141</sup>

En un reciente estudio proteómico de una cepa de *V. cholerae*, se identificaron dos proteínas hipotéticas, codificadas por los genes VC2216 y VCA0261/0260, sobreexpresadas en anaerobiosis respecto a aerobiosis en medio mínimo.<sup>142</sup> Para determinar la posible función de estas proteínas, sus secuencias aminoácidas predichas se alinearon con la base de dominios conservados del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)<sup>143</sup> encontrándose que la proteína codificada por los genes VCA0261-0260 alineó significativamente ( $e^{-23}$ ) con el cluster del grupo de ortólogos 4455, que representa proteínas de unión a cobre no caracterizadas y el producto génico de VC2216 alineó significativamente con el grupo de ortólogos 3019, que incluye a proteínas de unión a metales.

El gen VCA0260 es homólogo a un gen de *Pseudomonas fluorescens* cuyo producto génico está relacionado con la resistencia a cobre en este microorganismo.<sup>144</sup> Los genes solapados VCA0260 y VCA0261 de *V. cholerae* N16961 constituyen un único gen y la proteína única que codifican está relacionada con la tolerancia al cobre en *V. cholerae*.<sup>145</sup> En aerobiosis y a una concentración de cobre elevada (1,5 mmol/L), la contribución de esta proteína a la resistencia a este metal es importante, pero en anaerobiosis, su contribución no es tan evidente.<sup>145</sup> El gen que codifica para una proteína hipotética similar a VCA0261/0260 en *Pseudomonas aeruginosa* fue el más expresado en células crecidas en presencia de un exceso de cobre, aunque la disrupción de este gen solo resultó en una pequeña reducción de la tolerancia al cobre en el mutante,<sup>146</sup> similar a lo observado en *V. cholerae*.<sup>145</sup> Será interesante determinar cuál es la función molecular de la proteína codificada por el gen VCA0261/0260, que permita explicar su papel en la tolerancia a cobre y adicionalmente, analizar la posible implicación de los

genes adyacentes a VCA0261/0260, codificados en la misma cadena y transcritos en el mismo sentido, los cuales codifican para proteínas hipotéticas (VCA0258, VCA0259 y VCA0262) y reguladores transcripcionales (VCA0256-VCA0257 y VCA0264).<sup>139</sup> Estos genes (desde VCA0254 a VCA0264) deben formar un operón, de acuerdo con un análisis realizado con un programa que predice la existencia de operones en los genomas bacterianos. Además, los reguladores transcripcionales predichos en este operón son homólogos a reguladores dependientes de metales, lo que apunta a un posible papel de los genes incluidos en el operón en la tolerancia a metales.<sup>139</sup>

El gen VC2216, por otro lado, está solapado por cuatro nucleótidos con el gen VC2215, lo que sugiere una posible relación funcional entre sus productos génicos. El de VC2215 es homólogo a CopA de *E. coli* (69 % similar) y una anotación reciente de las proteínas de *V. cholerae* N16961 en la base de datos SWISS-PROT asignó el nombre de CopA al producto génico de VC2215 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9KPZ7>).

La proteína CopA de *V. cholerae* posee 915 aminoácidos y una predicción de topología empleando el programa TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) sugiere que posee 9 segmentos transmembranosos (STM) potenciales (STM-1: 263-285; STM-2: 292-314; STM-3: 329-348; STM-4: 355-377; STM-5: 472-491; STM-6: 512-534; STM-7: 549-571; STM-8: 854-873; STM-9: 878-900) contrario a los ocho segmentos transmembranosos que caracterizan a las ATP-asas tipo-P-1B-1.<sup>68</sup> Sin embargo, el análisis de la secuencia de CopA de *V. cholerae* y la comparación con las secuencias conservadas en CopA de *E. coli* y *A. fulgidus*, sugiere que la asignación del posible quinto segmento transmembrano (472-491) en la proteína de *V. cholerae* debe ser incorrecta, ya que el fragmento peptídico largo donde se encuentran los sitios conservados de fosforilación (<sub>598</sub> aspártico-lisina-treonina-glicina-treonina) y de unión de ATP (<sub>795</sub> glicina-aspártico-glicina-isoleucina-asparagina), así como la secuencia conservada <sub>636</sub> histidina-prolina estarían presentes en el periplasma. De este modo, CopA debe poseer tan solo ocho segmentos transmembranosos y en común con las ATPasas tipo-P-1B-1 posee en la región N-terminal citoplasmática tres dominios de unión a metales (<sub>19</sub> glicina-leucina-asparagina-cisteína-metionina-glicina-cisteína, <sub>82</sub> glicina-leucina-asparagina-cisteína-glicina-arginina-cisteína y <sub>180</sub> glicina-metionina-tirosina-cisteína-alanina-serina-cisteína) y un dominio fosfatasa (<sub>449</sub> tirosina-glicina-glutámico) en el segmento citoplasmático que une los segmentos transmembranosos cuarto y quinto. En los segmentos transmembranosos sexto, séptimo y octavo (sin tener en cuenta el quinto predicho por el programa de análisis de topología) se encuentran las secuencias conservadas <sub>554</sub> cisteína-prolina-cisteína, <sub>860</sub> tirosina-asparagina y <sub>889</sub> metionina-x-x-x-serina, respectivamente, las que forman parte del sitio de unión a cobre en el dominio de translocación durante el transporte hacia el periplasma.<sup>147</sup> Una mutación del gen VC2215 (*copA*) en *V. cholerae* trae aparejada una significativa disminución de la tolerancia al cobre en aerobiosis y anaerobiosis, (manuscrito en preparación), lo que sugiere que CopA de *V. cholerae* transporta el exceso de cobre fuera del citoplasma.

El gen VC2216, por otro lado, adyacente a VC2215, cuya proteína se encontró sobre-expresada en anaerobiosis,<sup>142</sup> es importante para la tolerancia al cobre en estas condiciones y no en aerobiosis (manuscrito en preparación), lo que apunta a que existan otros productos génicos más importantes en la tolerancia a cobre en aerobiosis en *V.*

*cholerae*. Estos resultados pudieran explicar por qué el gen que codifica para la proteína hipotética homóloga a VC2216 en *P. aeruginosa* no se detectó sobre-expresado en condiciones de estrés de cobre.<sup>146</sup>

Un análisis adicional del genoma de *V. cholerae* El Tor N16961 para determinar la presencia de otras proteínas homólogas a la de los sistemas de tolerancia a cobre descritos en *E. coli*, utilizando el programa BLASTP, arrojó que el sistema Cue está medianamente conservado en esta cepa. Además de CopA, se encontró como homólogo a CueR al regulador transcripcional codificado por el gen VC0974 (CueR, según una anotación reciente en la base de datos SWISS-PROT (<http://www.expasy.org/uniprot/P0C6D2>), pero no se identificó ninguna proteína que fuera homóloga a CueO, usando incluso el programa PSI-BLAST, que permite identificar proteínas relacionadas lejanamente.<sup>148,149</sup>

De acuerdo con un alineamiento de secuencia basado en la estructura de CueR de *E. coli* con otros homólogos se predice que la región N-terminal de la hélice de dimerización tenga la secuencia conservada serina-x-x-valina (lisina/arginina) (donde x es cualquier aminoácido) y la cavidad del sitio de unión de metales posea la secuencia conservada cisteína-x-glicina-4x-aspártico-cisteína seguida inmediatamente por una prolina, la que es el primer residuo en una hélice.<sup>57</sup> En el caso de CueR de *V. cholerae* se conserva la secuencia serina-x-x-valina (lisina/arginina) (<sub>77</sub> serina-alanina-alanina-valina-arginina) en la región N-terminal de la hélice de dimerización y la secuencia cisteína-x-glicina-4x-aspártico-cisteína (<sub>112</sub> cisteína-prolina-glicina-aspártico-glutamina-glicina-serina-aspártico-cisteína) en la cavidad del sitio de unión al cobre, donde se encuentran las cisteínas conservadas 112 y 120 importantes para la unión a cobre en CueR de *E. coli*.<sup>57</sup>

El sistema Cus, por otro lado, tampoco se conserva en *V. cholerae*. En este microorganismo no existe ningún ortólogo de CusA (<http://biocyc.org/ECOLI/select-org-prefs?object=EG11024&request=NEW-IMAGE>) aunque existen seis loci que codifican para homólogos de los sistemas de eflujo tripartitos que contienen a proteínas de la familia de transportadores RND.<sup>139</sup> Estos sistemas fueron analizados recientemente y se identificaron los sustratos transportados por tres de ellos (VexAB, VexCD y VexIJK).<sup>150</sup> El alineamiento de la secuencia aminoacídica de las proteínas perteneciente a la familia de transportadores RND de los otros tres sistemas (VexF-VC0629, VexH-VC0914 y VexM-VCA0638) con CusA revela que solo VexF (VC0629) posee en su posible cuarto segmento transmembrano la secuencia conservada relacionada con la unión de cobre <sub>430</sub> alanina-x(5)-aspártico-x(6)-glutámico, donde x es cualquier aminoácido. Sin embargo, en el producto génico de VexF no se conserva ninguna de las metioninas presentes en el segundo fragmento periplasmático largo de CusA, las cuales demostraron ser importantes para la función de esta en *E. coli*.<sup>96</sup> Coincidentemente, en *Salmonella* se ha descrito la ausencia de homólogos del sistema CusCFBA,<sup>151</sup> pero en este microorganismo, se ha determinado la presencia de la oxidasa multicobre CuiD, la que tiene una función fundamental en la resistencia a cobre en el periplasma en condiciones aerobias y anaerobias.<sup>151,152</sup> Debido a la ausencia de una oxidasa multicobre en el genoma de *V. cholerae*, será interesante determinar experimentalmente si alguna de las proteínas de la familia de transportadores RND de este microorganismo es importante para la resistencia a cobre. Recientemente, ha sido reportado que un sistema de eflujo tripartito de la familia RND que media la tolerancia al oro en *Salmonella*, también es capaz de conferir resistencia a varios medicamentos,<sup>153</sup> lo que



sugiere una amplia variedad de sustratos transportados por un mismo sistema, no debiendo descartarse la posible implicación en la resistencia al cobre en *V. cholerae* de los sistemas de la familia RND relacionados con la exportación de fármacos y detergentes. Debido a la no identificación de ningún homólogo a CueO por métodos bioinformáticos y aún cuando el nivel de homología entre el sistema CusCFBA y los transportadores multi-componentes presentes en *V. cholerae* es bajo, ya que no se conservan los residuos aminoácidos identificados como importantes en el transporte de cobre en *E. coli* en CusA, será interesante determinar si alguno de estos sistemas confiere resistencia a cobre.

## CONCLUSIONES

En los años recientes, se han realizado progresos considerables en el entendimiento de los mecanismos básicos del manejo de cobre en *E. coli* en las diferentes concentraciones de oxígeno y compartimientos celulares. Se ha establecido que el sistema Cue, compuesto por la ATPasa CopA, que expulsa el exceso de Cu(I) del citoplasma y por la oxidasa multicobre CueO, involucrada en la desintoxicación de Cu(I) en el periplasma, es el sistema primario de homeostasis del cobre y es importante en aerobiosis frente a concentraciones de cobre bajas y moderadas. El sistema multi-componentes CusCFBA de extrusión de cobre periplasmático, por otro lado, es un sistema secundario crucial cuando el sistema Cue es saturado y en condiciones anaerobias cuando CueO es inactiva. La relativa división de funciones de estos sistemas indica la importancia de que existan mecanismos que actúen separadamente en el citoplasma y el periplasma; así como a las diferentes concentraciones de oxígeno para lograr una protección total contra la toxicidad del cobre. Sin embargo, en *E. coli* no se ha identificado ninguna proteína encargada específicamente de la transportación de cobre a través de la membrana externa, así como tampoco los componentes involucrados en la entrada de cobre a través de la membrana citoplasmática. Tampoco se ha descrito ninguna chaperona implicada en el tráfico de cobre citoplasmático, que evite la presencia de iones cobre libres en el citoplasma y su potencial efecto tóxico.

En el caso de *V. cholerae*, los estudios relacionados con la tolerancia al cobre son escasos. Estudios iniciales sugieren que existe, al igual que en *E. coli*, una división de funciones en las proteínas encargadas de su homeostasis. La proteína VCA0261/0260 es importante en aerobiosis, pero la proteína codificada por VC2216 es más importante en anaerobiosis. Por otro lado, en este microorganismo se conserva el sistema Cue parcialmente, ya que están presentes la ATPasa CopA y el regulador CueR; pero no se ha identificado ninguna proteína que sea homóloga a CueO. Por esta razón, será relevante determinar qué proteínas son las encargadas de la resistencia al cobre en el periplasma. En este sentido, aunque la homología entre el sistema CusCFBA y los sistemas transportadores multicomponentes presentes en *V. cholerae* es baja, será interesante investigar si alguno de estos transportadores confiere resistencia a cobre e igualmente determinar cuál es la función molecular de las proteínas codificadas por los genes VC2216 y VCA0261/0260 y su localización celular, que permitan explicar su papel en la tolerancia al cobre.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 2008; 4(3):176-185.

2. Crichton RR, Pierre JL. Old iron, young copper: from Mars to Venus. *Biomaterials* 2001;14(2):99-112.
3. Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27(2-3):197-213.
4. Rosen BP. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; 133(3):689-693.
5. Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* 2002; 6(2):171-180.
6. Pena MM, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 1999; 129(7):1251-1260.
7. Abramson J, Riistama S, Larsson G, Jasaitis A, Svensson-Ek M, Laakkonen L *et al.* The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat Struct Biol* 2000; 7(10):910-917.
8. Pesce A, Capasso C, Battistoni A, Folcarelli S, Rotilio G, Desideri A *et al.* Unique structural features of the monomeric Cu,Zn superoxide dismutase from *Escherichia coli*, revealed by X-ray crystallography. *J Mol Biol* 1997; 274(3):408-420.
9. Wilmot CM, Hajdu J, McPherson MJ, Knowles PF, Phillips SE. Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis. *Science* 1999; 286(5445):1724-1728.
10. Roh JH, Takenaka Y, Suzuki H, Yamamoto K, Kumagai H. *Escherichia coli* K-12 copper-containing monoamine oxidase: investigation of the copper binding ligands by site-directed mutagenesis, elemental analysis and topa quinone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212(3):1107-1114.
11. Weissman Z, Berdicevsky I, Cavari BZ, Kornitzer D. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(7):3520-3525.
12. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62(4):1301-1314.
13. Faruque SM, Nair GB, Mekalanos JJ. Genetics of stress adaptation and virulence in toxigenic *Vibrio cholerae*. *DNA Cell Biol* 2004; 23(11):723-741.
14. Krumschnabel G, Manzl C, Berger C, Hofer B. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 209(1):62-73.
15. Arciello M, Rotilio G, Rossi L. Copper-dependent toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells involves mitochondrial damage. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327(2):454-459.
16. Rau MA, Whitaker J, Freedman JH, Di Giulio RT. Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 137(4):335-342.
17. Saleha BB, Ishaq M, Danadevi K, Padmavathi P, Ahuja YR. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. *Food Chem Toxicol* 2004; 42(12):1931-1936.
18. Sheline CT, Choi DW. Cu<sup>2+</sup> toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases *in vitro* and *in vivo*. *Ann Neurol* 2004; 55(5):645-653.
19. Gunther MR, Hanna PM, Mason RP, Cohen MS. Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study. *Arch Biochem Biophys* 1995; 316(1):515-522.
20. Gorren AC, Schrammel A, Schmidt K, Mayer B. Decomposition of S-nitrosoglutathione in the presence of copper ions and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1996; 330(2):219-228.
21. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186:1-85.
22. Franke SI, Pra D, Da Silva J, Erdtmann B, Henriques JA. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO<sub>4</sub> and CuSO<sub>4</sub> in mouse blood cells *in vivo*. *Mutat Res* 2005; 583(1):75-84.

23. Hiniker A, Collet JF, Bardwell JC. Copper stress causes an *in vivo* requirement for the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J Biol Chem* 2005; 280(40):33785-33791.
24. Suwalsky M, Ungerer B, Quevedo L, Aguilar F, Sotomayor CP. Cu<sup>2+</sup> ions interact with cell membranes. *J Inorg Biochem* 1998; 70(3-4):233-238.
25. Avery SV, Howlett NG, Radice S. Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(11):3960-3966.
26. Kershaw CJ, Brown NL, Constantinidou C, Patel MD, Hobman JL. The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology* 2005; 151(Pt 4):1187-1198.
27. Macomber L, Rensing C, Imlay JA. Intracellular copper does not catalyze the formation of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007; 189(5):1616-1626.
28. Tree JJ, Kidd SP, Jennings MP, McEwan AG. Copper sensitivity of cueO mutants of *Escherichia coli* K-12 and the biochemical suppression of this phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(4):1205-1210.
29. Kimura T, Nishioka H. Intracellular generation of superoxide by copper sulphate in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 1997; 389(2-3):237-242.
30. Kershaw CJ, Brown NL, Constantinidou C, Patel MD, Hobman JL. The expression profile of *Escherichia coli* K-12 in response to minimal, optimal and excess copper concentrations. *Microbiology* 2005; 151(Pt 4):1187-1198.
31. Yamamoto K, Ishihama A. Transcriptional response of *Escherichia coli* to external copper. *Mol Microbiol* 2005; 56(1):215-227.
32. Jung IL, Oh TJ, Kim IG. Abnormal growth of polyamine-deficient *Escherichia coli* mutant is partially caused by oxidative stress-induced damage. *Arch Biochem Biophys* 2003; 418(2):125-132.
33. Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. *Plant Physiol* 1997; 113(4):1177-1183.
34. Egler M, Grosse C, Grass G, Nies DH. Role of the extracytoplasmic function protein family sigma factor RpoE in metal resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2005; 187(7):2297-2307.
35. Yamamoto K, Ogasawara H, Ishihama A. Involvement of multiple transcription factors for metal-induced spy gene expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2008; 133(2):196-200.
36. DiGiuseppe PA, Silhavy TJ. Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. *J Bacteriol* 2003; 185(8):2432-2440.
37. Matuszewska E, Kwiatkowska J, Kuczynska-Wisnik D, Laskowska E. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA/B are involved in resistance to oxidative stress induced by copper. *Microbiology* 2008; 154(Pt 6):1739-1747.
38. Veinger L, Diamant S, Buchner J, Goloubinoff P. The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem* 1998; 273(18):11032-11037.
39. Mogk A, Deuerling E, Vorderwulbecke S, Vierling E, Bukau B. Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation. *Mol Microbiol* 2003; 50(2):585-595.
40. Mogk A, Schlieker C, Friedrich KL, Schonfeld HJ, Vierling E, Bukau B. Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J Biol Chem* 2003; 278(33):31033-31042.
41. Outten FW, Huffman DL, Hale JA, O'Halloran TV. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2001; 276(33):30670-30677.
42. Rouch D, Camakaris J, Lee CC. Copper transport in *E. coli*. In: Hamer DH, Winge DR, editors. *Metal ion homeostasis; Molecular Biology and chemistry*. New York: Alan R. Liss, 1989: pp.469-477.
43. Fong ST, Camakaris J, Lee BT. Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 1995; 15(6):1127-1137.
44. Gupta SD, Lee BT, Camakaris J, Wu HC. Identification of cutC and cutF (nlpE) genes involved in copper tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; 177(15):4207-4215.
45. Rogers SD, Bhavne MR, Mercer JF, Camakaris J, Lee BT. Cloning and characterization of cutE, a gene involved in copper transport in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1991; 173(21):6742-6748.
46. Munson GP, Lam DL, Outten FW, O'Halloran TV. Identification of a copper-responsive two-component system on the chromosome of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 2000; 182(20):5864-5871.
47. Gupta SD, Wu HC, Rick PD. A *Salmonella typhimurium* genetic locus which confers copper tolerance on copper-sensitive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1997; 179(16):4977-4984.
48. Outten FW, Outten CE, Hale J, O'Halloran TV. Transcriptional activation of an *Escherichia coli* copper efflux regulon by the chromosomal MerR homologue, cueR. *J Biol Chem* 2000; 275(40):31024-31029.
49. Lutkenhaus JF. Role of a major outer membrane protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1977; 131(2):631-637.
50. Rapisarda VA, Chehin RN, De Las RJ, Rodriguez-Montelongo L, Farias RN, Massa EM. Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. *Arch Biochem Biophys* 2002; 405(1):87-94.
51. Rodriguez-Montelongo L, Volentini SI, Farias RN, Massa EM, Rapisarda VA. The Cu(II)-reductase NADH dehydrogenase-2 of *Escherichia coli* improves the bacterial growth in extreme copper concentrations and increases the resistance to the damage caused by copper and hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys* 2006; 451(1):1-7.
52. Petersen C, Moller LB. Control of copper homeostasis in *Escherichia coli* by a P-type ATPase, CopA, and a MerR-like transcriptional activator, CopR. *Gene* 2000; 261(2):289-298.
53. Stoyanov JV, Hobman JL, Brown NL. CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Mol Microbiol* 2001; 39(2):502-511.
54. Stoyanov JV, Brown NL. The *Escherichia coli* copper-responsive copA promoter is activated by gold. *J Biol Chem* 2003; 278(3):1407-1410.
55. Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL. The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27(2-3):145-163.
56. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 1999; 284(5415):805-808.
57. Changela A, Chen K, Xue Y, Holschen J, Outten CE, O'Halloran TV *et al*. Molecular basis of metal-ion selectivity and zeptomolar sensitivity by CueR. *Science* 2003; 301(5638):1383-1387.
58. Chen K, Yuldashewa S, Penner-Hahn JE, O'Halloran TV. An atypical linear Cu(I)-S<sub>2</sub> center constitutes the high-affinity metal-sensing site in the CueR metalloregulatory protein. *J Am Chem Soc* 2003; 125(40):12088-12089.
59. Rensing C, Fan B, Sharma R, Mitra B, Rosen BP. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(2):652-656.
60. Franke S, Grass G, Nies DH. The product of the *ybdE* gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions. *Microbiology* 2001; 147(Pt 4):965-972.
61. Stoyanov JV, Magnani D, Solioz M. Measurement of cytoplasmic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 2003; 546(2-3):391-394.
62. Lutsenko S, Kaplan JH. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* 1995; 34(48):15607-15613.
63. Palmgren MG, Axelsen KB. Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1365(1-2):37-45.

64. Gatti D, Mitra B, Rosen BP. *Escherichia coli* soft metal ion-translocating ATPases. *J Biol Chem* 2000; 275(44):34009-34012.
65. Rensing C, Ghosh M, Rosen BP. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 1999; 181(19):5891-5897.
66. Solioz M, Vulpe C. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci* 1996; 21(7):237-241.
67. Rensing C, Ghosh M, Rosen BP. Families of soft-metal-ion-transporting ATPases. *J Bacteriol* 1999; 181(19):5891-5897.
68. Arguello JM, Eren E, Gonzalez-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biomol* 2007; 20(3-4):233-248.
69. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 1993; 3(1):7-13.
70. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993; 5(4):327-337.
71. Bayle D, Wangler S, Weitzenegger T, Steinhilber W, Volz J, Przybylski M *et al.* Properties of the P-type ATPases encoded by the copAP operons of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter felis*. *J Bacteriol* 1998; 180(2):317-329.
72. Fan B, Rosen BP. Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *J Biol Chem* 2002; 277(49):46987-46992.
73. Fan B, Grass G, Rensing C, Rosen BP. *Escherichia coli* CopA N-terminal Cys(X)(2)Cys motifs are not required for copper resistance or transport. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286(2):414-418.
74. Wu CC, Rice WJ, Stokes DL. Structure of a copper pump suggests a regulatory role for its metal-binding domain. *Structure* 2008; 16(6):976-985.
75. Gonzalez-Guerrero M, Arguello JM. Mechanism of Cu<sup>+</sup>-transporting ATPases: soluble Cu<sup>+</sup> chaperones directly transfer Cu<sup>+</sup> to transmembrane transport sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(16):5992-5997.
76. Grass G, Rensing C. Genes involved in copper homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; 183(6):2145-2147.
77. Grass G, Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286(5):902-908.
78. Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem Rev* 1996; 96(7):2563-2606.
79. Roberts SA, Weichsel A, Grass G, Thakali K, Hazzard JT, Tollin G *et al.* Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(5):2766-2771.
80. Roberts SA, Wildner GF, Grass G, Weichsel A, Ambrus A, Rensing C *et al.* A labile regulatory copper ion lies near the T1 copper site in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Chem* 2003; 278(34):31958-31963.
81. Kataoka K, Komori H, Ueki Y, Konno Y, Kamitaka Y, Kurose S *et al.* Structure and function of the engineered multicopper oxidase CueO from *Escherichia coli*-deletion of the methionine-rich helical region covering the substrate-binding site. *J Mol Biol* 2007; 373(1):141-152.
82. Galli I, Musci G, Bonaccorsi di Patti MC. Sequential reconstitution of copper sites in the multicopper oxidase CueO. *J Biol Inorg Chem* 2004; 9(1):90-95.
83. Li X, Wei Z, Zhang M, Peng X, Yu G, Teng M *et al.* Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 354(1):21-26.
84. Graubner W, Schierhorn A, Bruser T. DnaK plays a pivotal role in Tat targeting of CueO and functions beside SlyD as a general Tat signal binding chaperone. *J Biol Chem* 2007; 282(10):7116-7124.
85. Stanley NR, Findlay K, Berks BC, Palmer T. *Escherichia coli* strains blocked in Tat-dependent protein export exhibit pleiotropic defects in the cell envelope. *J Bacteriol* 2001; 183(1):139-144.
86. Berks BC, Sargent F, De Leeuw E, Hinsley AP, Stanley NR, Jack RL *et al.* A novel protein transport system involved in the biogenesis of bacterial electron transfer chains. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1459(2-3):325-330.
87. Stanley NR, Palmer T, Berks BC. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2000; 275(16):11591-11596.
88. Wexler M, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, Robinson C *et al.* TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity. No requirement for TatD family proteins in sec-independent protein export. *J Biol Chem* 2000; 275(22):16717-16722.
89. Berks BC, Sargent F, Palmer T. The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 2000; 35(2):260-274.
90. Grass G, Thakali K, Klebba PE, Thieme D, Muller A, Wildner GF *et al.* Linkage between catechol siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; 186(17):5826-5833.
91. Kim C, Lorenz WW, Hoopes JT, Dean JF. Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* yacK gene. *J Bacteriol* 2001; 183(16):4866-4875.
92. Singh SK, Grass G, Rensing C, Montfort WR. Cuprous oxidase activity of CueO from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004; 186(22):7815-7817.
93. Tree JJ, Ulett GC, Ong CL, Trott DJ, McEwan AG, Schembri MA. Trade-off between iron uptake and protection against oxidative stress: deletion of cueO promotes uropathogenic *Escherichia coli* virulence in a mouse model of urinary tract infection. *J Bacteriol* 2008; 190(20):6909-6912.
94. Wu MY, Suryanarayanan K, van Ooij WJ, Oerther DB. Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. *Water Sci Technol* 2007; 55(8-9):413-419.
95. Tree JJ, Ulett GC, Hobman JL, Constantinidou C, Brown NL, Kershaw C *et al.* The multicopper oxidase (CueO) and cell aggregation in *Escherichia coli*. *Environ Microbiol* 2007; 9(8):2110-2116.
96. Franke S, Grass G, Rensing C, Nies DH. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2003; 185(13):3804-3812.
97. Lok CN, Ho CM, Chen R, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Proteomic identification of the Cus system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin. *J Proteome Res* 2008; 7(6):2351-2356.
98. Bagai I, Rensing C, Blackburn NJ, McEvoy MM. Direct Metal Transfer between Periplasmic Proteins Identifies a Bacterial Copper Chaperone. *Biochemistry* 2008.
99. Kittleson JT, Loftin IR, Hausrath AC, Engelhardt KP, Rensing C, McEvoy MM. Periplasmic metal-resistance protein CusF exhibits high affinity and specificity for both CuI and AgI. *Biochemistry* 2006; 45(37):11096-11102.
100. Paulsen IT, Park JH, Choi PS, Saier MH, Jr. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 156(1):1-8.
101. Dinh T, Paulsen IT, Saier MH, Jr. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 1994; 176(13):3825-3831.
102. Johnson JM, Church GM. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol* 1999; 287(3):695-715.
103. Andersen C, Hughes C, Koronakis V. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13(4):412-416.
104. Koronakis V, Andersen C, Hughes C. Channel-tunnels. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11(4):403-407.
105. Touze T, Eswaran J, Bokma E, Koronakis E, Hughes C, Koronakis V. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol Microbiol* 2004; 53(2):697-706.

106. Bagai I, Liu W, Rensing C, Blackburn NJ, McEvoy MM. Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system. *J Biol Chem* 2007; 282(49):35695-35702.
107. Saier MH, Jr., Tam R, Reizer A, Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11, 841-847. 1994.
108. Tseng TT, Gratwick KS, Kollman J, Park D, Nies DH, Goffeau A *et al.* The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1999; 1(1):107-125.
109. Rensing C, Pribyl T, Nies DH. New functions for the three subunits of the CzcCBA cation-proton antiporter. *J Bacteriol* 1997; 179(22):6871-6879.
110. Lee LJ, Barrett JA, Poole RK. Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *J Bacteriol* 2005; 187(3):1124-1134.
111. Astashkin AV, Raitsimring AM, Walker FA, Rensing C, McEvoy MM. Characterization of the copper(II) binding site in the pink copper binding protein CusF by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Inorg Chem* 2005; 10(3):221-230.
112. Loftin IR, Franke S, Roberts SA, Weichsel A, Heroux A, Montfort WR *et al.* A novel copper-binding fold for the periplasmic copper resistance protein CusF. *Biochemistry* 2005; 44(31):10533-10540.
113. Xue Y, Davis AV, Balakrishnan G, Stasser JP, Staehlin BM, Focia P *et al.* Cu(I) recognition via cation- $\pi$  and methionine interactions in CusF. *Nat Chem Biol* 2008; 4(2):107-109.
114. Loftin IR, Franke S, Blackburn NJ, McEvoy MM. Unusual Cu(I)/Ag(I) coordination of *Escherichia coli* CusF as revealed by atomic resolution crystallography and X-ray absorption spectroscopy. *Protein Sci* 2007; 16(10):2287-2293.
115. Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 2000; 405(6789):914-919.
116. Koronakis V, Eswaran J, Hughes C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* 2004; 73:467-489.
117. Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, Hughes C, Koronakis V. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol* 2004; 14(6):741-747.
118. Abramson J, Riistama S, Larsson G, Jasaitis A, Svensson-Ek M, Laakkonen L *et al.* The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nat Struct Biol* 2000; 7(10):910-917.
119. Wilmot CM, Hajdu J, McPherson MJ, Knowles PF, Phillips SE. Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis. *Science* 1999; 286(5445):1724-1728.
120. Roh JH, Takenaka Y, Suzuki H, Yamamoto K, Kumagai H. *Escherichia coli* K-12 copper-containing monoamine oxidase: investigation of the copper binding ligands by site-directed mutagenesis, elemental analysis and topa quinone formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212(3):1107-1114.
121. Brown NL, Rouch DA, Lee BT. Copper resistance determinants in bacteria. *Plasmid* 1992; 27(1):41-51.
122. Cha JS, Cooksey DA. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(20):8915-8919.
123. Tetaz TJ, Luke RK. Plasmid-controlled resistance to copper in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1983; 154(3):1263-1268.
124. Brown NL, Barrett SR, Camakaris J, Lee BT, Rouch DA. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004. *Mol Microbiol* 1995; 17(6):1153-1166.
125. Cooksey DA. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1994; 14(4):381-386.
126. Silver S. Bacterial resistances to toxic metal ions--a review. *Gene* 1996; 179(1):9-19.
127. Mellano MA, Cooksey DA. Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 1988; 170(9):4399-4401.
128. Rouch D, Camakaris J, Lee BT, Luke RK. Inducible plasmid-mediated copper resistance in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1985; 131(4):939-943.
129. Mills SD, Jasalavich CA, Cooksey DA. A two-component regulatory system required for copper-inducible expression of the copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 1993; 175(6):1656-1664.
130. Mills SD, Lim CK, Cooksey DA. Purification and characterization of CopR, a transcriptional activator protein that binds to a conserved domain (cop box) in copper-inducible promoters of *Pseudomonas syringae*. *Mol Gen Genet* 1994; 244(4):341-351.
131. Rouch DA, Brown NL. Copper-inducible transcriptional regulation at two promoters in the *Escherichia coli* copper resistance determinant pco. *Microbiology* 1997; 143(Pt 4):1191-1202.
132. Huffman DL, Huyett J, Outten FW, Doan PE, Finney LA, Hoffman BM *et al.* Spectroscopy of Cu(II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli* pco copper resistance operon. *Biochemistry* 2002; 41(31):10046-10055.
133. Djoko KY, Xiao Z, Wedd AG. Copper resistance in *E. coli*: the multicopper oxidase PcoA catalyzes oxidation of copper(I) in Cu(I)Cu(II)-PcoC. *ChemBiochem* 2008; 9(10):1579-1582.
134. Lee SM, Grass G, Rensing C, Barrett SR, Yates CJ, Stoyanov JV *et al.* The Pco proteins are involved in periplasmic copper handling in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 295(3):616-620.
135. Wernimont AK, Huffman DL, Finney LA, Demeler B, O'Halloran TV, Rosenzweig AC. Crystal structure and dimerization equilibria of PcoC, a methionine-rich copper resistance protein from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem* 2003; 8(1-2):185-194.
136. Djoko KY, Xiao Z, Huffman DL, Wedd AG. Conserved mechanism of copper binding and transfer. A comparison of the copper-resistance proteins PcoC from *Escherichia coli* and CopC from *Pseudomonas syringae*. *Inorg Chem* 2007; 46(11):4560-4568.
137. Zhang L, Koay M, Maher MJ, Xiao Z, Wedd AG. Intermolecular transfer of copper ions from the CopC protein of *Pseudomonas syringae*. Crystal structures of fully loaded Cu(I)Cu(II) forms. *J Am Chem Soc* 2006; 128(17):5834-5850.
138. Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nat Med* 1999; 5(2):183-188.
139. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ *et al.* DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 2000; 406(6795):477-483.
140. Schoolnik GK, Yildiz FH. The complete genome sequence of *Vibrio cholerae*: a tale of two chromosomes and of two lifestyles. *Genome Biol* 2000; 1(3):REVIEWS1016.
141. Canovas D, Cases I, de L, V. Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* 2003; 5(12):1242-1256.
142. Marrero K, Sanchez A, Rodriguez-Ulloa A, Gonzalez LJ, Castellanos-Serra L, Paz-Lago D *et al.* Anaerobic growth promotes synthesis of colonization factors encoded at the *Vibrio* pathogenicity island in *Vibrio cholerae* El Tor. *Res Microbiol* 2009; 160(1):48-56.
143. Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M *et al.* CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(Database issue):D192-D196.
144. Tom-Petersen A, Hosbon C, Nybroe O. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiol Ecol*. 2001; 38:59.
145. Marrero K, Duany N, Sánchez A, González LJ, Suzarte E, Ledón T *et al.* Estudio de los genes VCA0260 y VCA0261 de *Vibrio cholerae* y de la proteína única que codifican. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2007; 38(2):124-131.

146. Teitzel GM, Geddie A, De Long SK, Kirisits MJ, Whiteley M, Parsek MR. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2006; 188(20):7242-7256.
147. Mandal AK, Yang Y, Kertesz TM, Arguello JM. Identification of the transmembrane metal binding site in Cu<sup>+</sup>-transporting PIB-type ATPases. *J Biol Chem* 2004; 279(52):54802-54807.
148. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(17):3389-3402.
149. Jones DT, Swindells MB. Getting the most from PSI-BLAST. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(3):161-164.
150. Bina XR, Provenzano D, Nguyen N, Bina JE. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect Immun* 2008; 76(8):3595-3605.
151. Espariz M, Checa SK, Audero ME, Pontel LB, Soncini FC. Dissecting the *Salmonella* response to copper. *Microbiology* 2007; 153(Pt 9):2989-2997.
152. Lim SY, Joe MH, Song SS, Lee MH, Foster JW, Park YK *et al.* CuiD is a crucial gene for survival at high copper environment in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Cells* 2002; 14(2):177-184.
153. Pontel LB, Audero ME, Espariz M, Checa SK, Soncini FC. GolS controls the response to gold by the hierarchical induction of *Salmonella*-specific genes that include a CBA efflux-coding operon. *Mol Microbiol* 2007; 66(3):814-825.