

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL c-di-GMP
EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA
RESISTENCIA A CADMIO EN *Cupriavidus*
metallidurans CH34

PABLO ALVIZ GAZITÚA

2018

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL c-di-GMP
EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA
RESISTENCIA A CADMIO EN *Cupriavidus*
metallidurans CH34

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias
mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Pablo Alviz Gazitúa

Directores de Tesis:

Dr. Nicolás Guiliani Guerin & Dr. Michael Seeger
Pfeiffer

Santiago- Chile

2018

CARACTERIZACIÓN DE LA VÍA DEL c-di-GMP EN LA
FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS Y LA RESISTENCIA A
CADMIO EN *Cupriavidus metallidurans* CH34

Tesis entregada a la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias mención Microbiología,
Facultad de Ciencias

Por

Pablo Alviz Gazitúa

Julio 2018

Directores de Tesis: Dr. Nicolás Guliani, Dr. Michael Seeger

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Pablo Andrés Alviz Gazitúa

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de defensa de Tesis rendido el 3 de Julio de 2018.

Directores de Tesis:

Dr. Nicolás Guliani

Dr. Michael Seeger

Comisión evaluadora de la Tesis:

Dr. Roberto Vidal

Dr. Omar Orellana

Dr. Claudio Vásquez

Dr. Claudio Martínez

“Quien llora miseria, no merece riqueza”

BIOGRAFÍA



Nací un 16 de Junio de 1982 en Recoleta, Santiago de Chile. Y crecí en la Villa los Presidentes siendo vecino del lugar donde realicé mi doctorado.

Allí crecí con mi vieja, licenciada en Filosofía, exonerada de esta Universidad en la dictadura. Tuvo que trabajar en lo que fuera, superar esa frustración, no transmírmelo miedo y sacarme adelante.

Estudié en el Colegio San Ignacio, donde hice grandes amigos que aún conservo. Luego me fui a Valparaíso a estudiar Bioquímica. Entre medio descubrí la música, y estudié trompeta. Hoy me siento muy orgulloso de conocer y disfrutar de la ciencia y la música la vez, feliz de que estén en mi vida.

Luego de titularme estudié un Master en Agrobiología Ambiental en la Universidad del País Vasco, experiencia que me permitió sentir pasión por la ciencia cuando esta cerca de la tierra.

De vuelta el Doctor Nicolás Guiliani me ofreció trabajo y entrar al Doctorado que hoy termino en conjunto con el Doctor Michael Seeger.

Durante esta formación he crecido de forma exponencial, hoy me siento capaz de emprender y llevar cabo cualquier desafío profesional que me proponga.

Agradecido de vivir una experiencia tan transformadora.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el privilegio de recibir una educación hasta este nivel, y las múltiples herramientas que me ha entregado. Deseo con utilizarlas con creatividad y pasión para materializar soluciones que mejoren la vida de todos los seres. Que sea entretenido y siempre desde el amor. Veo este anhelo como parte de la madurez profesional que este doctorado me ha entregado.

Sin embargo siento que lo más importante aprendido en el doctorado poco tiene que ver con ciencia.

Más con la resolución de una actitud hacia el mundo y su incertidumbre, con la única certeza de dar amor de forma insistente y tozuda, como un tronco en el naufragio que de vez en cuando nos vemos los seres humanos.

Tiene que ver con saber recibir amor, cariño y compañerismo del bueno. Y así también, con entregarlo.

Tiene que ver con enterrar la queja como lugar y no amargarse por lo que no se depende de uno cambiar. Con sentir lo heroico que es pararse un rato para ver la abundancia que nos rodea y agradecer.

Tiene que ver con querer vivir alegre y realizado en lugar de triste y resentido.

Agradezco a todas las personas que me han entregado todo eso en este periodo. A mi vieja, a María José, a Paula, a Rafael y Alejandra en Calgary, a Cesar y su familia por apañarme siempre en Viña, a Carlos, a Manuel, a Sulei, a la Pepa y a Rodrigo Vial.

Agradezco la autonomía y formación rigurosa que recibí por trabajar con el Dr. Nicolás Guiliani, como también le agradezco entregarme un espacio para trabajar en un proyecto propio y su apoyo económico.

Agradezco al Doctor Seeger compartirme su frenética pasión la ciencia, su liderazgo y creer en mí.

Agradezco al Doctor Raymond Turner por mostrarme que se puede hacer buena ciencia sin estrés y tocando la trompeta.

Agradezco a la música por no dejarme en este tiempo y seguir silbando adentro mío.

Agradezco a los animales que me acompañaron, a Blanquita y Manolo, a Rula y Arturo y especial a mi gata Julieta por entregarme ternura que sana.

Agradezco también a todas las personas pusieron su granito de arena, al doctor Francisco Chávez por dejarme usar su campana, a las secretarias de la escuela de post grado y a los miembros de la comisión por su buena disposición.

FIN

ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Función de los “metales pesados” en el ambiente.....	2
1.1.1 El cadmio como problema ambiental y objeto de estudio	2
1.1.2 Cadmio en Chile.....	3
1.2 La biorremediación como una alternativa eficiente y costo efectiva para la descontaminación	4
1.3 <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 como modelo de estudio y biocatalizador en la biorremediación de metales pesados	4
1.4 Biopelículas: estructuras de resistencia y biocatalizadores en la biorremediación de metales pesados	6
1.5 C-di-GMP como segundo mensajero regulador de la formación de biopelículas	7
1.5.1 Metabolismo del c-di-GMP	10
1.5.2 Receptores macromoleculares de c-di-GMP actúan como efectores de esta vía de señalización	16
1.5.3 Mecanismos de especificidad regulatoria en la vía de transducción de señales mediada por c-di-GMP	18
1.6 Planteamiento del problema	23
1.7 Hipótesis y Objetivos.....	24
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Cepas y medios de cultivo	25
2.2 Herramientas bioinformáticas	25
2.2.1 Búsqueda de componentes genéticos asociados a la vía del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34	25
2.2.2 Análisis del contexto génico de ORFs asociados a la vía del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34	27
2.2.3 Análisis de homología entre secuencias aminoacídicas codificadas en los genomas de <i>C. metallidurans</i> CH34 y los genomas de <i>E. coli</i> K12 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1	27

2.3 Exposición a cadmio de células plantónicas y biopelículas	28
2.4.1 Extracción de RNA y retrotranscripción	30
2.4.2 PCR de transcripción reversa	31
2.4.3 Determinación de abundancia de transcritos mediante qPCR de transcripción reversa...	34
2.5 Cuantificación de c-di-GMP en extractos nucleotídicos de biopelículas y células plantónicas de <i>C. metallidurans</i>	35
2.6 Clonamiento molecular del gen <i>wrf2.2</i>	36
2.6.1 Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación de cepas de <i>E. coli</i> S17.1 λ pir.	36
2.6.2 Vectores de expresión	37
2.6.3 Construcción del plasmidio pJBTC19: <i>wrf2.2</i>	37
2.6.4 Conjugación biparental de <i>C. metallidurans</i>	39
2.7 Ensayos fenotípicos	41
2.7.1 Ensayos en agar Rojo Congo.....	41
2.7.2 Ensayos con tinción Cristal Violeta	42
2.8 Determinaciones de susceptibilidad a cadmio en “Calgary Biofilm Device”	43
2.8.1 Cultivos de biopelículas y células plantónicas	43
3. RESULTADOS	48
3.1 Determinar la presencia de componentes de la vía del c-di-GMP en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	48
3.1.1 Predicción de funcionalidad en diguanilato ciclasas codificadas en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34	48
3.1.2 Predicción de funcionalidad en fosfodiesterasas tipo EAL codificadas en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34	49
3.1.3 Predicción de funcionalidad en proteínas híbridas codificadas en genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.	51
3.1.4 Predicción de funcionalidad en fosfodiesterasas tipo HD-GYP codificadas en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	53
3.1.5 Posibles efectores en la vía del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34.....	53
3.2 Efecto de la presencia de cadmio sobre la formación de biopelículas y la vía del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34.....	61
3.2.1 Efecto de cadmio sobre el contenido de EPS en biopelículas cultivadas en su presencia	61
3.2.2 Efecto de cadmio en la formación de biopelículas en <i>C. metallidurans</i> CH34.....	61
3.2.3. Caracterización de macrobiopelículas generadas por cepas de <i>C. metallidurans</i> carentes de plasmidios asociados a la resistencia a metales pesados.	63

3.2.4 Comparación de la susceptibilidad a cadmio entre células plantónicas y biopelículas de <i>C. metallidurans</i> CH34	63
3.3 Efecto de la exposición a cadmio sobre los niveles de c-di-GMP en células plantónicas y biopelículas.....	65
3.4 Efecto de la exposición a cadmio en transcritos involucrados en la vía del c-di-GMP <i>C. metallidurans</i> CH34.....	68
3.4.1 Análisis del contexto génico en los genes involucrados en la vía del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34	68
3.4.2 Análisis de los dominios accesorios identificados	70
3.4.3 Búsqueda de homología entre proteínas asociadas al metabolismo del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34, <i>E. coli</i> K12 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1	73
3.4.4 Análisis de identidad y conservación entre las proteínas codificadas en <i>RMET_RS30310</i> y <i>RMET_RS31035</i>	76
3.5 Efecto del cadmio en la abundancia de transcritos asociados a la vía del c-di-GMP.....	78
3.5.1 Análisis semi cuantitativo de un sub conjunto de transcritos asociados a la vía del c-di-GMP en presencia de cadmio por RT-PCR	78
3.5.2 Análisis cuantitativo de transcritos asociados a la vía del c-di-GMP en células plantónicas y biopelículas expuestas a cadmio	80
3.5.3 Evaluación de la actividad fodiesterasa codificada por el gen <i>urf2</i> mediante complementación en <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>rocR</i>	85
3.5.4 Efecto de la sobreexpresión del gen <i>urf2.2</i> en la formación de biopelículas y la susceptibilidad a cadmio en <i>C. metallidurans</i> CH34.....	86
3.5.4.4 Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la susceptibilidad cadmio de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	93
3.5.4.5 Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP, en los niveles intracelulares de este segundo mensajero en presencia de cadmio	93
4. DISCUSIÓN.....	98
4.1 Relaciones entre componentes de la vía del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34 y sus fenotipos característicos.	98
4.2 Asociaciones entre fenotipos de <i>C. metallidurans</i> CH34 asociados a la formación de biopelículas y las respuestas descritas en la vía del c-di-GMP frente a cadmio.....	101
4.3 Relaciones entre estilo de vida y susceptibilidad a cadmio en <i>C. metallidurans</i> CH34....	105
4.4 Evaluación de Urf2 como determinante en la respuesta y sobrevida a cadmio en <i>C. metallidurans</i> CH34.....	107
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....	111
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
7. ANEXO.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía de señalización del c-di-GMP en la regulación del estilo de vida bacteriano.....	9
Figura 2. Conformación activa e inactiva de homodímeros de dominios GGDEF.....	11
Figura 3. Representación lineal de los aminoácidos determinantes en la funcionalidad de dominios involucrados en el metabolismo del c-di-GMP.....	13
Figura 4. Diseño experimental para la exposición a cadmio de células plantónicas y biopelículas de <i>C. metallidurans</i>	29
Figura 5. Plasmidios utilizados en la sobreexpresión de genes en <i>C. metallidurans</i> y <i>P. aeruginosa</i>	38
Figura 6. Esquema general del cultivo de biopelículas en el sistema “Calgary Biofilm Device”.....	45
Figura 7. Parámetros de una curva de caída exponencial.....	47
Figura 8. Alineamiento global de las secuencias aminoacídicas PelD de <i>P. aeruginosa</i> y <i>C. metallidurans</i> CH34.....	56
Figura 9. Contexto génico del ORF <i>RMET_RS21490</i> codificante para el efector PelD presente en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	57
Figura 10. Alineamiento múltiple entre secuencias de dominios PilZ codificados en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	58
Figura 11. Resumen de la distribución de ORFs predichos con dominios activos en la vía del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34.....	60
Figura 12. Efecto del cadmio sobre el contenido de EPS en macrobiopelículas de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	62

Figura 13. Efecto del cadmio sobre la formación de biopelículas de <i>C. metallidurans</i> CH34.	62
Figura 14. Fenotipos en agar LB Rojo Congo de <i>C. metallidurans</i> CH34 y cepas derivadas.....	64
Figura 15. Comparación de la susceptibilidad a cadmio entre células plantónicas y biopelículas de <i>C. metallidurans</i> CH34.	66
Figura 16. Efecto de la exposición a cadmio en los niveles celulares de c-di-GMP en células plantónicas y biopelículas..	67
Figura 17. Conjunto de ORFs asociados al metabolismo del c-di-GMP con contextos génicos destacados en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.	69
Figura 18. Arquitectura de dominios de enzimas predichas como catalíticamente activas en el metabolismo del c-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34.	72
Figura 19. Alineamiento global entre las secuencias aminoacídicas codificadas en <i>RMET_RS30310 (urf2.1)</i> y <i>RMET_RS31035 (urf2.2)</i>	77
Figura 20. RT-PCR a partir de las muestras obtenidas desde células plantónicas y sésiles bajo el diseño experimental expuesto.	82
Figura 21. Efecto de la exposición a cadmio en transcritos involucrados en la vía del c-di-GMP y en la resistencia a metales pesados.....	84
Figura 22. Efectos de la complementación de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta rocR$ con el ORF <i>urf2.2</i>	87
Figura 23. Efecto de la expresión heteróloga de la diguanilato ciclasa PleD* en la presencia de sustancias exopoliméricas de la cepa <i>C. metallidurans</i> AE104.	89
Figura 24. Efecto de la expresión heteróloga de la diguanilato ciclasa PleD* en la formación de biopelículas de la cepa de <i>C. metallidurans</i> AE104.....	90
Figura 25. Fenotipos de cepas transformadas de <i>C. metallidurans</i> CH34..	92

Figura 26. Formación de biopelículas en cepas transformadas de <i>C. metallidurans</i> CH34 transformadas..	92
Figura 27. Efectos de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la presencia de EPS y su resistencia a cadmio en macrobiopelículas de <i>C. metallidurans</i> CH34.	94
Figura 28. Efectos de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la susceptibilidad a cadmio en células platónicas y biopelículas de <i>C. metallidurans</i> CH34.	95
Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP, en niveles intracelulares de este segundo mensajero en presencia de cadmio.	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de los partidores utilizados.....	32
Tabla 2. Cepas y genotipos utilizados.....	40
Tabla 3. Predicción de la funcionalidad catalítica de dominios GGDEF codificados en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	50
Tabla 4. Predicción de la funcionalidad catalítica de dominios EAL codificados en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	50
Tabla 5. Predicción de actividad DGC y PDE, en proteínas híbridas codificadas en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.	52
Tabla 6. Predicción de la capacidad de unión a c-di-GMP en dominios PilZ codificados en el genoma de <i>C. metallidurans</i> CH34.	58
Tabla 7. Análisis de homología en proteínas asociadas al metabolismo del c-di-GMP en <i>C. metallidurans</i> CH34, con proteínas codificadas en los genomas de <i>E. coli</i> K12 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	74
Tabla 8. Subconjunto de ORFs asociados al metabolismo del c-di-GMP candidatos a jugar un rol en la respuesta a cadmio y la formación de biopelículas de <i>C. metallidurans</i> CH34.	79
Tabla 9. Efecto de la exposición a cadmio en células plantónicas y biopelículas sobre la abundancia de 18 transcritos asociados a la vía del c-di-GMP por RT-PCR.	81

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

Bsc: Complejo de síntesis de celulosa

CBD: Calgary Biofilm Device

c-di-GMP: Diguanosin monofosfato cíclico

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España

DGC: Diguamilato ciclasa

EPS: Sustancias exopoliméricas

GTP: Guanosin trifosfato

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas

I: Identidad entre secuencias

IC: Intervalo de confianza

IUPAC: Unión internacional de química pura y aplicada

Is: Sitio de inhibición secundario

Ip: Sitio de inhibición primario

MBC: Mínima concentración bactericida

MBEC: Mínima concentración de erradicación de biopelículas

MIC: Concentración mínima inhibitoria

NCBI: Centro Nacional de Información para la Biotecnología de E.E.U.U

ORF: Marco de lectura abierto

PDE: Fosfodiesterasa

pGpG: diguanosin difosfato linear

S: Similitud entre secuencias

RESUMEN

El cadmio es un metal pesado altamente tóxico para los sistemas biológicos. El estudio de microorganismos para la biorremediación de metales pesados, ha destacado a *Cupriavidus metallidurans* CH34, β -proteobacteria aislada desde instalaciones metalúrgicas, como modelo de resistencia a estos elementos. La biorremediación *ex situ* de metales pesados es comúnmente llevada a cabo en biorreactores de lecho fijo, donde los metales pesados en solución se concentran en la biomasa de comunidades de microorganismos adheridos a superficies llamadas “biopelículas”. El efecto de los metales pesados sobre la formación de biopelículas en *C. metallidurans* CH34 no ha sido descrito. Durante las últimas décadas, la vía de señalización mediada por un dinucleótido cíclico llamado “c-di-GMP” ha sido establecida como central en la regulación del estilo de vida bacteriano. La interacción de c-di-GMP con distintos receptores macromoleculares promueve del estilo de vida comunitario. Pese al rol fundamental de las biopelículas en los procesos de biorremediación, el efecto de los metales pesados sobre esta vía de señalización en bacterias ha sido poco estudiado. El objetivo de esta tesis es determinar el efecto del cadmio sobre la vía del c-di-GMP y la formación de biopelículas en *C. metallidurans* CH34.

El cadmio inhibió la formación de biopelículas de *C. metallidurans* CH34. Esto se correlaciona con la descripción de una baja en los niveles de c-di-GMP tras la exposición a este metal pesado, concomitante con un aumento en la abundancia de un transcrito del gen *urf2* de los operones de resistencia a mercurio Tn4378 (*urf2.1*) y Tn4380 (*urf2.2*), que codifica una potencial fosfodiesterasa. Ensayos de complementación con el gen *urf2.2* de la cepa mutante nula *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$, carente de la fosfodiesterasa RocR, restituyeron la formación de biopelículas y concentración intracelular de c-di-GMP a niveles de la cepa silvestre. Estos resultados constituyen la primera evidencia de funcionalidad catalítica de la fosfodiesterasa codificada por el gen *urf2*, por lo que se denominó fosfodiesterasa Mrp (metal regulated phosphodiesterase). De forma coherente con la respuesta inhibitoria de formación de biopelículas mediada por la disminución de los niveles de c-di-GMP en *C. metallidurans*, niveles elevados de este segundo mensajero generados por una diguanilato ciclasa activa expresada en forma heteróloga, incrementaron la formación de biopelículas y la susceptibilidad a cadmio.

ABSTRACT

Cadmium is a highly toxic heavy metal for biologic systems. *Ex situ* heavy metal bioremediation is commonly carried out in fixed bed bioreactors in which heavy metals in solution are removed by adhered microbial communities in biofilms. *Cupriavidus metallidurans* CH34 is a model strain for heavy metal resistance and bioremediation. However, the effect of heavy metals on *C. metallidurans* CH34 biofilm formation has not been described. The signaling pathway mediated by the cyclic dinucleotide c-di-GMP is central in bacterial lifestyle regulation. c-di-GMP promotes biofilm lifestyle through the interaction with different receptors. Despite of the central role of biofilms on the bioremediation process, the effect of heavy metals over this signaling pathway has been poorly studied. Thus, the objective of this study was to assess the effect of cadmium on the c-di-GMP pathway and biofilm formation in *C. metallidurans* CH34.

Cadmium exerted an inhibitory effect on *C. metallidurans* CH34 biofilm formation concomitant with a decrease of c-di-GMP levels. After cadmium exposure an increase in the transcription of the gene *urf2* that codes for a phosphodiesterase and is located in the mercury resistance operons Tn4378 (*urf2.1*) and Tn4380 (*urf2.2*) was observed. Complementation assays with the *urf2.2* gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$ mutant null strain that is defective in RocR phosphodiesterase, restored biofilm formation and c-di-GMP intracellular concentration at wild type levels. This is the first evidence of catalytic functionality of the *urf2* gene encoded phosphodiesterase, which was named Mrp por metal regulated phosphodiesterase. In agreement with the biofilm formation inhibition mediated by a c-di-GMP drop in *C. metallidurans*, high levels of this second messenger generated by an active diguanylate cyclase that was heterologously expressed, increased the biofilm formation and cadmium susceptibility of this bacterium.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Función de los “metales pesados” en el ambiente

Los metales pesados como cobre, níquel, zinc, selenio y cobalto cumplen funciones biológicas en bajas concentraciones, pero son perjudiciales a concentraciones elevadas. Otros metales como cadmio, plomo, arsénico y mercurio, no poseen función biológica conocida, siendo altamente tóxicos a niveles bajos de concentración (Nies, 2016).

1.1.1 El cadmio como problema ambiental y objeto de estudio

Entre los metales pesados, el cadmio es considerado uno de los elementos más tóxicos, principalmente debido a su larga vida media en el organismo, consecuencia de su acumulación en el sistema excretor urinario (Wu y cols., 2017).

La acumulación de este metal en humanos y microorganismos se atribuye principalmente a su ingreso vía sistema de transporte de cationes divalentes con función biológica como magnesio, manganeso y calcio. Las bases moleculares que gobiernan su captación están aún poco conocidas (Nies y cols., 1999; Begg y cols., 2015). De igual forma y a pesar de la vasta cantidad de estudios que avalan la toxicidad de este elemento, los mecanismos por los que esta se ejerce no se conocen bien. Estos estudios dan cuenta de una fuerte afinidad de este metal pesado por tioles celulares, interacción que tiene como consecuencia la denaturalización de proteínas, daños en la membrana e interacción con el metabolismo del calcio y del zinc (Nies y cols., 1999; Harrison y cols., 2007; Begg y cols., 2015). Estudios más recientes han establecido el efecto deletéreo de cadmio sobre la acumulación celular de manganeso, cofactor de la enzima superóxido dismutasa, que resulta en un incremento a la

susceptibilidad a especies reactivas de oxígeno generadas durante el metabolismo aeróbico (Begg y cols., 2015).

La liberación de cadmio ha aumentado en más de 1000 veces desde comienzos del siglo veinte hasta alcanzar las 20000 toneladas por año. Lo anterior debido a su uso industrial principalmente en la fabricación de baterías, y su uso como estabilizante de polímeros (Vallee & Ulmer, 1972; Begg y cols., 2015). Sus actuales niveles de liberación al ambiente sobrepasan los asociados a su ciclo biogeoquímico, que al no ser sujeto de degradación, se acumula en ecosistemas marinos y terrestres. Aunque el nivel máximo de exposición a cadmio recomendado de $< 1 \mu\text{g}/\text{día}$ (WHO, 2011), en la actualidad el riesgo de exposición a este metal pesado, alcanza hasta $30 \mu\text{g}/\text{día}$, como contaminante regular de alimentos (Begg y cols., 2015), constituyendo actualmente uno de los principales problemas para la salud pública (WHO, 2011)

1.1.2 Cadmio en Chile

A nivel geológico los depósitos de cadmio se co-localizan con depósitos de zinc y en menor medida con cobre (Butterman y Plachy, 2000), de lo que resulta que el cadmio sea uno de los principales sub productos de esta actividad minera y uno de los contaminantes ambientales relevantes en nuestro país (Vivanco, 2012). Habiendo crecido la producción chilena de zinc 30%, entre los años 2007 y 2016 (COCHILCO, 2016), se considera de vital importancia la implementación de políticas de manejo y descontaminación de cadmio (Vivanco, 2012).

1.2 La biorremediación como una alternativa eficiente y costo efectiva para la descontaminación

La remoción de metales pesados, es actualmente un desafío para la gestión ambiental. Los procesos más comunes para remediación de metales pesados desde sitios contaminados incluyen procesos fisicoquímicos que han mostrado ser poco selectivos, de alto costo y productores de lodos tóxicos (Malik y cols., 2004).

Es en este contexto que emerge la “Biorremediación”, como una tecnología que utiliza organismos, y/o microorganismos, para la descontaminación de matrices ambientales, tecnología que ha mostrado ser costo efectiva y eficiente para dicho propósito (Mosa y cols., 2016; Rojas et al. 2011). La biorremediación de metales pesados se ejerce vía acumulación en la biomasa, o cambios en el estado de oxidación del metal a formas menos tóxicas. Variados microorganismos nativos o genéticamente modificados han mostrado la capacidad de transformar o quelar metales pesados (Dixit y cols., 2015).

1.3 *Cupriavidus metallidurans* CH34 como modelo de estudio y biocatalizador en la biorremediación de metales pesados

C. metallidurans CH34 es una β -proteobacteria, de la familia Burkholderiaceae, quimilotoautotrofa facultativa, aislada originalmente desde tanques de sedimentación de zinc (Mergeay y cols., 1985). Desde entonces esta bacteria ha sido aislada reiteradamente desde suelos con alta presencia de metales y baja disponibilidad de nutrientes (Nies, 2016). Este microorganismo se caracteriza por tolerar elevadas concentraciones de metales pesados como Cu^+ , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , CrO_4^{-2} , Pb^{+2} , Ag^+ , Au^+ , Au^{+3} , HAsO_4^{-2} , AsO_2^- , Hg^{+2} , Cs^+ , Bi^{+3} , Tl^+ , SeO_3^- , SeO_4^- y Sr^{+2} , propiedad que se asocia a lo menos con 24 agrupamientos genéticos distribuidos en cuatro replicones: dos cromosomas CHR1 (3,9 Mb), CHR2 (2,6 Mb) y dos plasmidios de gran tamaño pMOL28 (171 Kb) y pMOL30 (234 Kb) (Janssen y cols. 2010). Pese a la ubicua distribución de dichos agrupamientos en

su genoma, estos se concentran en tres islas genómicas ubicadas al interior de los plasmidios pMOL28 y pMOL30, lo que es coherente con la significativa disminución en la concentración mínima inhibitoria (MIC) a metales pesados en cepas carentes de uno o ambos plásmidos (Tabla 2).

Estas características han sido la base para la clasificación de *C. metallidurans* CH34 como modelo para entender los mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en bacterias (Mergeay y cols., 2003; Diels y cols., 2009; Rojas et al. 2011; Nies 2016). Así en este modelo, se han dilucidado los mecanismos de detoxificación citoplasmática de Cu^+ , Cu^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} y Zn^{+2} , mediante la acción concertada de sistemas de eflujo (Nies, 1999). Tal y como los sistemas de eflujo funcionan como mecanismos de resistencia para ciertos metales pesados, también se han caracterizado sistemas de detoxificación basados en cambios de especiación mediante reacciones de óxido reducción a formas menos tóxicas. Tal es el caso del sistema de reducción del ion mercurico (Hg^{2+}) a mercurio metálico (Hg^0) codificado en dos operones *merRTPADEurf2*, localizados en los transposones Tn4378 y Tn4380 en este genoma (Nies y cols., 1999; Janssen y cols., 2010). Básicamente, la maquinaria de resistencia a mercurio alojada en estos operones se centra en la acción de MerA, una flavoenzima de localización citosólica, que utiliza al ion mercúrico como ligando de puentes disulfuro presentes en su sitio activo, donde es reducido a mercurio metálico a partir de poder reductor obtenido de NADPH (Boyd & Barkay, 2012). Por su localización citosólica la acción de MerA, es dependiente de la maquinaria de transporte codificada en este operón. Por otro lado, la proteína periplasmática MerP que transfiere Hg^{+2} a la proteína MerT, que a su vez lo transfiere a MerA en el citosol. La expresión de la maquinaria alojada en este operón se encuentra bajo el control del represor transcripcional MerR y el co regulador MerD (Rojas et al. 2011; Boyd & Barkay, 2012). Pese a la especificidad asignada a esta maquinaria de detoxificación, existen antecedentes que apoyan su rol en la respuesta cruzada con otros metales. Antecedentes transcriptómicos obtenidos en *C. metallidurans* CH34 señalan aumentos de abundancia de hasta 5,95 veces en transcritos asociados a los operones de resistencia a mercurio, en presencia de cadmio y plomo (Monsieurs y cols., 2011).

La descripción de estos mecanismos de resistencia, ha motivado la utilización de esta bacteria en ensayos de biorremediación de metales pesados. En estos ensayos, los mecanismos de detoxificación se acoplan a la adsorción extracelular de los metales a componentes de su matriz exopolimérica presente en estructuras multicelulares adheridas a superficies, denominadas “biopelículas”, que permiten su inmovilización (Valls y cols., 2000; Diels y cols., 2009; Rojas y cols., 2011; Biondo y cols., 2012).

1.4 Biopelículas: estructuras de resistencia y biocatalizadores en la biorremediación de metales pesados

Las bacterias en la naturaleza se encuentran asociadas a dos estilos de vida distintos: uno platónico, en el que se mueven en medio líquido como células individuales, y otro “sésil”, en el que se encuentran estrechamente unidas entre sí formando estructuras denominadas "biopelículas", las que están presentes en todo tipo de interfaces y superficies (aceite/agua/aire).

Las biopelículas han emergido como atractivos biocatalizadores en distintos procesos industriales, tradicionalmente llevados a cabo vía enzimas inmovilizadas o células platónicas. Las biopelículas, ofrecen como ventajas principales, la prescindencia de una purificación enzimática, y la posibilidad de realizar los bioprocesos de manera continua, disminuyendo de este modo considerablemente los costos operacionales (Halan y cols., 2012). Estas ventajas han motivado su utilización en la biorremediación de metales pesados (Singh y cols., 2006; Edwards & Kjellerup 2013; Mangwani y cols., 2017). En este proceso, las sustancias exopoliméricas (EPS) generadas por las biopelículas adsorben, vía interacciones electrostáticas, los iones metálicos a nivel de grupos funcionales ácidos presentes en polisacáridos, aminoácidos y DNA extracelular que constituyen la matriz extracelular. Existen evidencias de que dicha adsorción asiste a procesos de biomineralización (Pal & Paul 2008; Reith y cols., 2009; Fairbrother y cols., 2013). Las biopelículas son aceptadas como

un estilo de vida bacteriano con menor susceptibilidad a la toxicidad de los metales pesados respecto de su contraparte plantónica (Teitzel y Parsek 2003; Priester y cols., 2006; Harrison y cols., 2007; Sarkar y Chakraborti 2008; Yadav y cols., 2013; Perrin y cols., 2009; Cologgi y cols., 2014; Navarrete y De la Fuente 2014; Chua y cols., 2015; Cusick y cols., 2017). Sin perjuicio de lo anterior, también existen evidencias de efectos inhibitorios de los metales pesados sobre la formación de biopelículas (Morgan y cols., 2006; Basu Roy y cols., 2012; Vega y cols., 2014, Shamim y cols., 2014; Thornhill y cols., 2017).

Si bien los trabajos mencionados relacionan la exposición bacteriana a metales pesados con efectos sobre la formación de biopelículas, los mecanismos moleculares tras estas respuestas son poco conocidos. Al respecto, es posible rescatar indicios del fenotipo de “dispersión inducida de biopelículas” descrito en *Pseudomonas aeruginosa* (Morgan y cols., 2006), en respuesta a la exposición a mercurio, mediada por la fosfodiesterasa BdlA, enzima hidrolítica de un dinucleótido cíclico conocido como “c-di-GMP” (diguanosín monofosfato cíclico). Sin embargo, otro antecedente lo entrega el incremento en los niveles de c-di-GMP en *P. aeruginosa*, en presencia de telurito, cuya consecuencia es la promoción de la formación de biopelículas (Chua y cols., 2015).

1.5 C-di-GMP como segundo mensajero regulador de la formación de biopelículas

El c-di-GMP fue descubierto en 1985 por el grupo de investigación liderado por Moshe Benziman, como un activador alostérico dentro de la maquinaria de síntesis de celulosa en *Gluconobacter xylinus* (Ross y cols., 1985), una alfa-proteobacteria que forma biopelículas sobre fruta en descomposición. Estos resultados fueron confirmados más tarde, por análisis de marcaje radioactivo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (Ross y cols., 1986). Dichos estudios, revelaron en este activador, una estructura cíclica de dos riboguanosinas unidas por enlaces 3'-5'. Las actividades de síntesis y degradación de c-di-GMP fueron identificadas tempranamente y se

atribuyeron a proteínas ubicadas en la membrana de *G. xylinus* (Ross y cols., 1987). La identificación de productos intermediarios de las reacciones catalizadas por estas enzimas, permitieron definir a la actividad diguanilatociclasa (DGC) como responsable de la síntesis del c-di-GMP, y a la actividad fosfodiesterasa (PDE) como responsable de su degradación (Ross y cols., 1987). Posteriormente al observar que la síntesis de celulosa en *Agrobacterium tumefaciens* también fue dependiente de c-di-GMP (Amikam & Benziman, 1989), se sugirió la presencia transversal de esta molécula en diferentes especies bacterianas productoras de este exopolisacárido. Desde entonces, la progresiva disponibilidad de genomas bacterianos en bases de datos ha permitido establecer la presencia ubicua de genes que codifican diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas (Tal y cols., 1998; Galperin y cols., 2001; Römling y cols., 2013), siendo a la fecha el c-di-GMP reconocido como un segundo mensajero universal en el reino bacteriano. Además la producción de celulosa en *G. xylinus* y *A. tumefaciens*, otros fenotipos fueron comunicados como regulados por c-di-GMP, p.ej. la formación de biopelículas en *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa* (Simm y cols., 2007) y *Vibrio cholerae* (Tischler & Camili, 2004), y la regulación del ciclo celular en *Caulobacter crescentus* (Paul y cols., 2004). De ahí en adelante, el número de publicaciones acerca del c-di-GMP ha incrementado exponencialmente. Así, actualmente existe consenso respecto del rol central del c-di-GMP en la regulación de la formación de biopelículas (Figura 1) en el reino procariota (Kader y cols., 2006; Merrit y cols., 2007; Pesavento y cols., 2008; Newel y cols., 2011).



Figura 1. Vía de señalización del c-di-GMP en la regulación del estilo de vida bacteriano. El c-di-GMP es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP por diguanilato ciclasas. Esta molécula es degradada por fosfodiesterasas. Es común encontrar en estas enzimas dominios accesorios que controlan sus actividades enzimáticas en respuesta a señales ambientales o intracelulares, cuya consecuencia es la regulación del estilo de vida de la bacteria. La acumulación del intermediario pGpG inhibe la actividad del dominio EAL, siendo degradado por oligoribonucleasas tipo "Orn". Los receptores de c-di-GMP ejecutan la formación de biopelículas dependiendo de su unión a este segundo mensajero. Se cuentan entre ellos, dominios GGDEF y EAL degenerados sin actividad catalítica, pero con capacidad de unión al segundo mensajero. Los dominios PilZ lo hacen mediante motivos específicos. Se suman a los dominios proteicos estructuras tipo "Riboswitch" en mRNAs con capacidad de unir c-di-GMP en su extremo 5'-UTR regulando así la traducción de genes involucrados en estos fenotipos.

1.5.1 Metabolismo del c-di-GMP

1.5.1.1 Diguanylatas

Las diguanylatas permiten la síntesis de c-di-GMP a partir de 2 moléculas de GTP y magnesio (Ross y cols., 1987). Estudios bioquímicos y genéticos determinaron que su región activa corresponde al dominio proteico “GGDEF” (Ausmees y cols., 2001; Paul y cols., 2004; Ryjenkov y cols., 2005), llamado así debido a uno de sus motivos más conservados: Gly-Gly-Asp-Glu-Phe (Hecht & Newton, 1995). Estudios estructurales han revelado que el motivo GGDEF se ubica en un “ β hairpin” que es parte fundamental del sitio activo (sitio A) dada a su participación en la unión de una molécula de GTP y dos iones Mg^{2+} (Wassman y cols., 2007; De y cols., 2008). Estas enzimas actúan como dímeros o tetrámeros (De y cols., 2009), lo que permite el encuentro de cada monómero cargado con una molécula de GTP y la condensación de estas en la molécula de c-di-GMP (Figura 2). La actividad diguanylato ciclasa está sujeta a una inhibición no competitiva por producto (Paul y cols., 2004; Christen y cols., 2006), lo que establece una concentración límite de c-di-GMP y previene el gasto de GTP. Cada dominio GGDEF contiene dos sitios de inhibición: primario (Ip) y secundario (Is). Un dímero de moléculas de c-di-GMP intercaladas une el Ip de un monómero con el Is del otro, impidiendo la formación del sitio activo y con ello la síntesis de c-di-GMP (Wassman y cols., 2007). El sitio Ip del dominio GGDEF comprende el motivo RxxD, que se encuentra ubicado 5 aminoácidos río arriba del motivo GGDEF (Paul y cols., 2004; Wassman y cols. 2007) y está conservado en la mayoría de las potenciales diguanylatas (Christen y cols., 2006). A la fecha las diguanylatas mejor caracterizadas son PleD de *C. crescentus* y dos proteínas homólogas WspR de *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*. Análisis de funcionalidad basados en técnicas de mutación sitio dirigida y estudios estructurales, han determinado los motivos aminoacídicos importantes en esta actividad catalítica (Paul y cols., 2004;

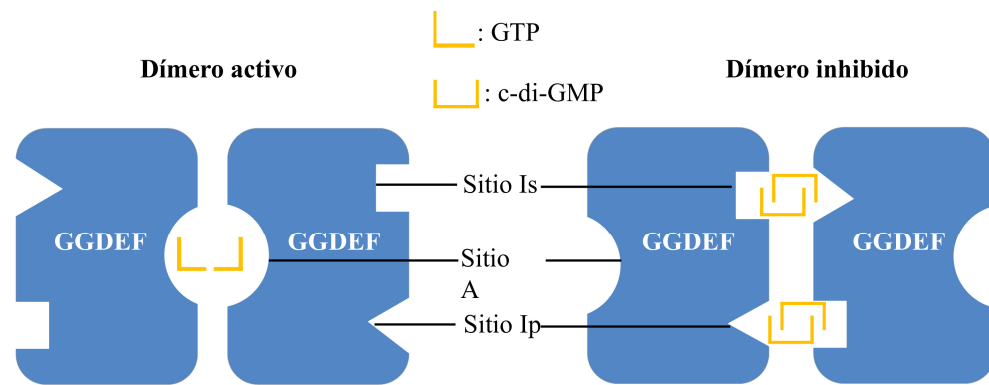


Figura 2. Conformación activa e inactiva de homodímeros de dominios GGDEF. La conformación catalíticamente competente corresponde a un homodímero antiparalelo de dominios GGDEF enfrentados por los sitios de unión a GTP de cada monómero. Un dímero intercalado de c-di-GMP provoca el enfrentamiento de los dominios GGDEF a través de los sitios Ip e Is, ubicados en la cara contraria del sitio de unión de GTP, bloqueando la formación del dímero catalíticamente competente (Adaptada de Wassmann y cols., 2007).

Wassmann y cols., 2007; De y cols., 2009) dentro del sitio activo y los sitios de inhibición alostérica (Figura 2). En PleD, los grupos fosfato del sustrato análogo utilizado (GTP α S), muestran una interacción física directa con los aminoácidos Lys 442, Arg 446 y uno de los iones Mg²⁺, coordinado por los aminoácidos Glu 370 (del motivo GGDEF) y Asp 327 .

La base nitrogenada es coordinada por los aminoácidos Asn 335 y Asp 344, mientras que Lys 442 estaría involucrada en la salida de pirofosfato. El sitio de inhibición primario (Ip) está conformado por los aminoácidos Arg 359, Asp 362 y Arg 390, que interactúan directamente con las bases nitrogenadas del c-di-GMP. El sitio de inhibición secundario (Is), formado por los aminoácidos Arg 313 y Arg 316, interactúa con el Ip a través de dímeros de c-di-GMP cambiando la conformación del sitio A (Figura 3), impidiendo con ello la formación del dímero activo responsable de la actividad diguanilato ciclasa (De y cols., 2009).

1.5.1.2 La degradación de c-di-GMP se ejerce mediante la actividad fosfodiesterasa

La degradación de c-di-GMP es mediada por familias de fosfodiesterasas, no filogenéticamente relacionadas, distinguidas por la posesión de dos dominios característicos llamados “EAL” y “HD-GYP”.

Tal como se hizo con el estudio del dominio GGDEF en diguanilato ciclasas, análisis bioquímicos y genéticos realizados en el dominio EAL de la fosfodiesterasa TBD1265 de *Thiobacillus denitrificans* (Tchigvintsev y cols., 2010) identificaron 10 aminoácidos esenciales para su actividad catalítica (Figura 3).

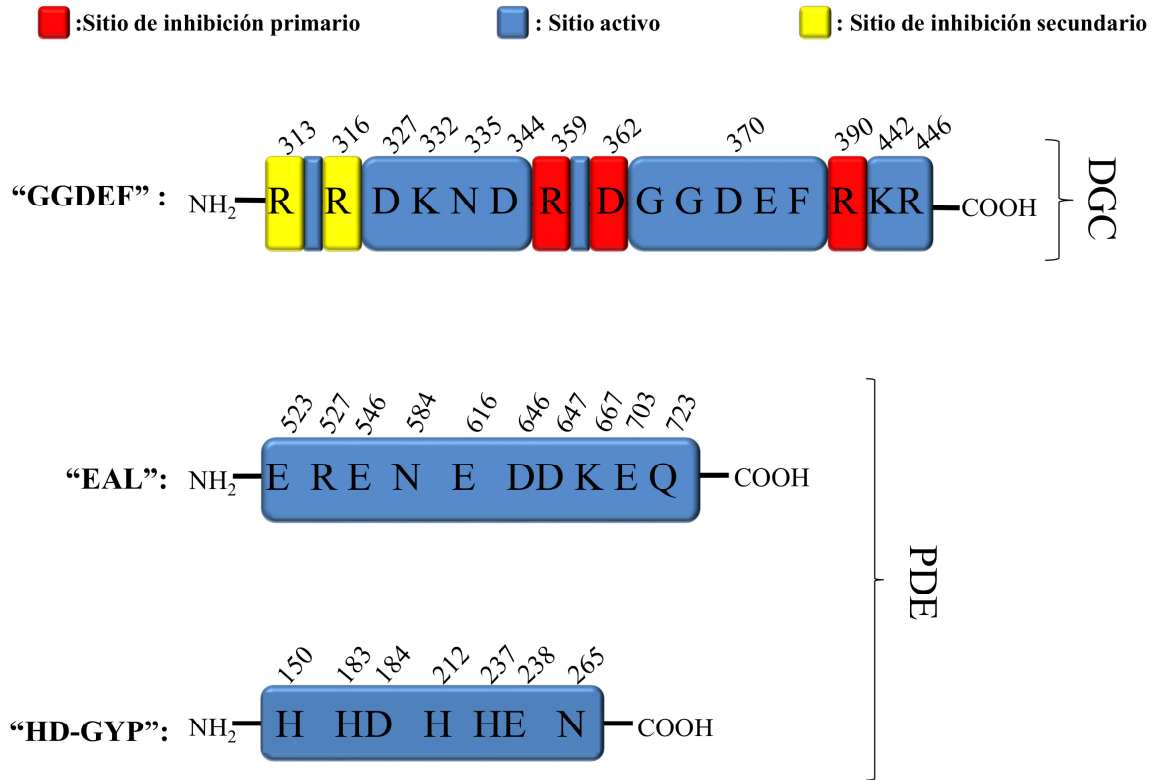


Figura 3. Representación lineal de los aminoácidos determinantes en la funcionalidad de dominios involucrados en el metabolismo del c-di-GMP. La actividad diguanilato ciclasa (DGC) se ejerce mediante el dominio GGDEF. Este se compone de un sitio activo y dos sitios de inhibición por producto. El sitio activo (azul) lo integran 7 aminoácidos, el sitio de inhibición primario (rojo) lo integran 3 aminoácidos y el sitio de inhibición secundario lo integran 2 aminoácidos. La actividad fosfodiesterasa (PDE) es llevada a cabo por dominios EAL, cuyo sitio activo lo integran 10 aminoácidos, y dominios HD-GYP cuyo sitio activo lo integran 7 aminoácidos.

Estudios bioquímicos y genéticos determinaron que la región responsable de la actividad fosfodiesterasa corresponde al dominio proteico "EAL" (Tal y cols., 1998; Chang y cols., 2001; Schmidt y cols. 2005; Bobrov y cols., 2005), llamado así debido a uno de sus motivos más conservados: Glu-Ala-Leu (Tal y cols., 1998). Este dominio presenta un plegamiento tipo barril trifosfato isomerasa ("TIM barrel"), donde el sitio activo corresponde a un bolsillo formado por cerca de 10 aminoácidos que en su conjunto coordinan la molécula de c-di-GMP y uno o dos iones Mg^{2+} (Rao y cols., 2008; Barends y cols., 2009; Tchigvintsev y cols., 2010). En él, los residuos (Glu 523, Arg 527, Glu 546, Asn 584, Glu 616, Asp 646, Asp 647, Lys 667, Glu 703 y Gln 723) integran el sitio activo de estas enzimas, al conformar una red electrostática con dos iones Mg^{2+} y una molécula de agua, favoreciendo el ataque nucleofílico de un ion hidroxilo sobre un enlace éster de esta molécula. Los iones metálicos interactúan directamente con uno de los fosfatos del c-di-GMP, mientras que el otro fosfato lo hace con Arg 527. El residuo Gln 723 interactúa con Glu 523, Glu 616 y Lys 667 estabilizando la conformación del dominio. La función del residuo Glu 546 no es muy clara, sin embargo su cadena lateral ha sido propuesta para la interacción con una de las guaninas del c-di-GMP (Tchigvintsev y cols., 2010).

Producto de la actividad hidrolítica del dominio EAL sobre un enlace éster del c-di-GMP (Ross y cols., 1987) genera la apertura de esta molécula, produciendo el dinucleótido lineal pGpG (Figura 1).

A diferencia de los dominios GGDEF, que funcionan estrictamente como dímeros, los dominios EAL han mostrado conservar su actividad en forma de monómeros (Schmidt y cols., 2005). Sin embargo, en vista de que la mayoría de dominios EAL en las PDEs caracterizadas forman dímeros u oligómeros de mayor orden (Barends y cols., 2009; Römling y cols., 2013), y que el estado dimérico ha mostrado ser clave en la activación por señales ambientales (Römling y cols. 2013), se ha asumido que este estado es la unidad funcional del dominio EAL involucrada en la actividad fosfodiesterasa *in vivo*.

Por otro lado, respecto de la familia de fosfodiesterasas HD-GYP, las evidencias bioquímicas son mucho más escasas, debido principalmente a las dificultades para la cristalización que han presentado este tipo de proteínas (Lovering y cols., 2011; Römling y cols., 2013). Un avance importante sobre esta dificultad técnica, se obtuvo de la estructura cristalográfica de la fosfodiesterasa tipo HD-GYP Bd1817 de *Bdellovibrio bacteriovorus* (Lovering y cols., 2011). Dicho trabajo permitió identificar siete aminoácidos (His 150, His 183, Asp 184, His 212, His 237, Glu 238 y Asn 265) determinantes en la interacción con los enlaces fosfato del c-di-GMP, que en coordinación con dos cationes metálicos de Fe ⁺² o Mn ⁺², permiten el ataque de un ión hidroxilo derivado de una molécula de agua resultando en la hidrólisis del enlace fosfodiéster del dinucleótido (Figura 3). En la formación de esta red de interacción binuclear His 183, His 150 y Asn 265 interaccionan con uno de los iones metálicos mientras que los aminoácidos His 237 y Glu 238 lo hacen con el segundo. Entre ambos núcleos de interacción, se ubica Asp 184 mediando la interacción entre la molécula de agua y el grupo fosfato del enlace fosfodiéster. A diferencia del dominio EAL, la actividad fosfodiesterasa en el dominio HD-GYP degrada la molécula de c-di-GMP a dos moléculas de GMP (Crossman y cols., 2017).

1.5.1.3 Las Oligoribonucleasas “Orn”: Un nuevo integrante del modelo

La actividad fosfodiesterasa del dominio EAL degrada c-di-GMP hasta el intermediario lineal pGpG, mientras que la actividad del dominio HD-GYP lo hace directamente a dos moléculas de GMP. Los dominios EAL son los representantes mayoritarios de la actividad fosfodiesterasa en los genomas bacterianos, pero este modelo dejaba sin responder como pGpG no se acumula y es llevado hasta GMP en bacterias con genomas carentes de dominios HD-GYP.

Este vacío fue llenado con la descripción de la oligoribonucleasa Orn en *P. aeruginosa* (Cohen y cols., 2015), que hidroliza oligonucleótidos de 2 - 5 bases de longitud, incluyendo el intermediario pGpG (Figura 1). En este estudio se determinó el rol inhibitorio de pGpG sobre la actividad EAL, el cuál es prevenido por la actividad de Orn. De esta manera la actividad de Orn conforma una regulación adicional sobre la degradación del c-di-GMP, que de paso abre la posibilidad a un eventual rol de pGpG en el citoplasma.

1.5.1.4 Proteínas híbridas GGDEF/EAL

Paradójicamente es común encontrar diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas que incluyen dominios GGDEF y EAL en una misma cadena polipeptídica. Aunque se ha demostrado la capacidad de algunas de esas proteínas para ejercer ambas actividades (Kumar & Chatterji, 2008), la mayoría de los estudios apuntan a la naturaleza mutuamente excluyente entre ellas y sujeta a señales intra o extracelulares (Tal y cols., 1998; Christen y cols., 2006; Gomelsky y cols., 2009).

1.5.2 Receptores macromoleculares de c-di-GMP actúan como efectores de esta vía de señalización

La identificación de las enzimas involucradas en la síntesis y degradación del c-di-GMP dio paso a interrogantes sobre los mecanismos moleculares por los que esta molécula promueve sus fenotipos asociados. Existe consenso que la molécula de c-di-GMP posee afinidad por distintos receptores macromoleculares, pudiendo actuar de forma simultánea en todas las etapas que rigen la manifestación de un fenotipo, mediante interacción con factores de transcripción, estructuras secundarias de mRNAs y sitios de regulación alostérica de enzimas (Orr y cols., 2016). Estas interacciones han mostrado estar condicionada por dominios y motivos característicos, sin embargo,

éstos no han podido ser predichos por análisis de secuencias, principalmente debido a la capacidad que esta molécula ha mostrado para unirse a diversas clases de proteínas sin similitud de secuencia.

En este contexto, esta sección se restringirá a los receptores proteicos más documentados en la literatura y sobre los cuales se han establecido los mecanismos de interacción con la molécula de c-di-GMP. Estos corresponden a los dominios GGDEF/EAL “degenerados” y dominios PilZ (Figura 1).

1.5.2.1 Dominios catalíticamente inactivos actúan como efectores de la vía del c-di-GMP

Proteínas con un dominio GGDEF catalíticamente inactivo, han sido descritas como efectoras de la vía del c-di-GMP. Estos dominios son inactivos como diguanilato ciclasas, al carecer de aminoácidos importantes del sitio activo, pero sin embargo conservan el sitio primario de inhibición alostérica intacto que puede unir c-di-GMP. Los ejemplos más documentados de proteínas efectoras con este tipo de dominios son la proteína PopA involucrada en el ciclo celular de *C. crescentus* (Duerig y cols., 2009), la proteína CdgG que controla la rugosidad de macrobiopelículas de *V. cholerae* (Beyhan y Yildiz., 2010) y PelD de *P. aeruginosa* (Lee y cols., 2007). PelD es un componente del operón responsable de la biosíntesis del polisacárido “Pel”, en el cuál la molécula de c-di-GMP ejerce como activador alostérico al interactuar con el dominio GGDEF degenerado de dicho componente (Römling y cols., 2013). Lo mismo sucede con versiones degeneradas del dominio EAL, catalíticamente inactivas, pero capaces de unir c-di-GMP. El ejemplo más estudiado es la proteína FimX en cuya región carboxi terminal es posible encontrar un dominio EAL inactivo con alta afinidad por c-di-GMP, interacción que resulta determinante en la polimerización del pili tipo IV, aparato proteico extracelular involucrado en el desplazamiento (“twitching”) y adherencia en superficies (Jain y cols., 2017). Otro ejemplo es la

proteína híbrida GGDEF-EAL LapD, cuya interacción con c-di-GMP vía su dominio EAL degenerado, promueve la secreción funcional de la adhesina LapA (Römling y cols., 2013). Pese a los avances de los últimos años en el conocimiento de este tipo de interacción, los motivos aminoacídicos que la permiten son aún desconocidos.

1.5.2.2 El dominio PilZ como receptor proteico de c-di-GMP

El reconocimiento del c-di-GMP por el dominio PilZ, está basado en “dedos de arginina”, que componen los motivos “c-di-GMP switch”: RxxxR y D/NzSxxG, separados entre sí por 20 a 30 aminoácidos en su estructura primaria, pero en estrecha proximidad dentro de la estructura terciaria (Amikam y cols., 2006; Ko y cols., 2010; Habazettl y cols., 2011). Uno de los dominios PilZ más estudiados se encuentra en la enzima BscA, miembro de la maquinaria de biosíntesis de celulosa, en la que PilZ determina su actividad glicosiltransferasa al interactuar con una molécula de c-di-GMP (Ross y cols., 1985; Jenal y cols., 2017). Otro caso documentado, lo constituye el dominio PilZ presente en la proteína YcgR, el que al unir c-di-GMP establece una conformación que interfiere en la rotación de motor flagelar (Römling y cols., 2013)

1.5.3 Mecanismos de especificidad regulatoria en la vía de transducción de señales mediada por c-di-GMP

1.5.3.1 El modelo de “módulos de control”

La emergencia de tecnologías de secuenciación automatizada durante la década pasada, reveló una inusitada abundancia de dominios GGDEF y EAL en genomas bacterianos (Tatusov y cols., 2000; Galperin y cols., 2001). Así es como estudios bioinformáticos han predicho 72 dominios

GGDEF/EAL/HD-GYP en *V. cholerae* (Galperin y cols., 2001), 41 en *P. aeruginosa* (Galperin y cols., 2001) y 19 en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Simm y cols., 2004).

En este contexto, el mantenimiento de una concentración determinada de c-di-GMP en el citoplasma en presencia de numerosas diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas activas simultáneamente ha constituido una interrogante. Se suma a lo anterior la capacidad de esta vía de señalización para actuar sobre distintos fenotipos tales como motilidad flagelar, progresión en el ciclo celular o expresión de factores de virulencia, incluso actuando en ellos de forma simultánea (Hengge, 2009). Lo anterior se puede explicar con el modelo de “módulos de control”, propuesto a partir de estudios en *E. coli*, que integran la restricción espacio temporal de cada actividad (Hengge, 2009). Estos módulos se componen por diguanilato ciclasas y/o fosfodiesterasas que modularían la concentración de c-di-GMP entorno a un efector particular vía interacciones proteicas entre sus componentes (Hengge 2009; Römling y cols., 2013; Dahlstrom & O’Toole 2017). De esta manera, la actividad simultánea de diferentes módulos de control daría origen a cascadas de regulación que operarían en paralelo.

Los hallazgos de interacción entre proteínas componentes de la vía estarían apoyando este modelo. Un ejemplo es la interacción directa de la fosfodiesterasa RpfG con varias proteínas con dominio GGDEF en *Xanthomonas axonopodis* pv citri, (Andrade y cols., 2006). Se han detectado interacciones entre la diguanilato ciclasa HmsT, la fosfodiesterasa HmsP, la glicosiltransferasa HmsR y su factor asociado HmsS, todos asociados a la membrana interna y necesarios para la excreción de exopolisacáridos y formación de biopelículas (Bobrov y cols., 2005). Se ha sugerido la interacción directa entre el efector con dominio PilZ, Alg44, y la glicosiltransferasa responsable de la síntesis de alginato, Alg8, en la cara interna de la membrana plasmática de *P. aeruginosa* (Oglesby y cols., 2008). Otro ejemplo es la relación entre la diguanilato ciclasa DosC y la fosfodiesterasa DosP de *E. coli*, ambas proteínas que en asociación a una polinucleótido fosforilasa (PNPase) forman un complejo degradosoma, cuya actividad se ve aumentada por unión a c-di-GMP

(Tuckerman y cols., 2011). Por último, el reciente establecimiento de la interacción directa entre la diguanilato ciclasa GcbB de *P. fluorescens* y el efector integral de membrana LapD, como requisito para secreción de la adhesina LapA, ha apoyado fuertemente este modelo (Dahlström y cols., 2015).

Junto con explicar las observaciones ya señaladas, el modelo de módulos de control permite explicar la ausencia de una correlación directa entre perfiles expresión de componentes de la vía y niveles celulares de c-di-GMP (Gomelsky, 2010; Sarenko y cols., 2017), así como también explica la descripción de cambios fenotípicos asociados a c-di-GMP, que no han sido acompañados de cambios en los niveles celulares de este segundo mensajero (Hister y cols., 2005; Kulasekara y cols., 2005; Simm y cols., 2007). Sin embargo, la heterogeneidad de concentraciones de c-di-GMP al interior del citoplasma, aún está lejos de ser comprobada experimentalmente (Hengge, 2016).

Actualizaciones a este modelo la entregan estudios recientes en *E. coli* que describen una red de interacciones promiscuas entre distintos componentes de esta vía de señalización, que resultan en organizaciones jerárquicas entorno a reguladores maestros de la producción de matrix extracelular (Hengge 2016; Sarenko y cols., 2017; Dahlstrom y cols., 2017). Así este modelo ha permitido acuñar el concepto de “interactoma” entre componentes de la vía del c-di-GMP, que estaría determinado por concentraciones y relaciones estequiométricas entre los distintos participantes de cada módulo. Se incorporan a éste, la existencia de diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas que actuarían como “jugadores solitarios” no comprometidos en interacción alguna (Sarenko y cols., 2017).

1.5.3.2 Diferencias de afinidad entre los efectores de c-di-GMP

De forma complementaria al modelo de módulos de control, la existencia de diferencias de afinidad por c-di-GMP de hasta mil veces en efectores de esta vía, ha permitido postular a dichas diferencias como un mecanismo de discriminación jerárquica, que permitiría la activación de efectores específicos (Römling y cols., 2013). Ejemplo de ello, es el efecto de la delección de YhjH, fosfodiesterasa en *S. enterica* serovar Typhimurium, mutación que eleva los niveles de c-di-GMP a concentraciones suficientes para inhibir su motilidad vía interacción con la proteína YcgR, pero no para activar al síntesis de celulosa mediante la interacción con BscA, un efector con una afinidad 40 veces menor (Römling y cols., 2013).

1.5.3.3 Transcripción diferencial de genes involucrados en la vía del c-di-GMP

Un importante mecanismo que participa en la conformación de las redes de señalización mediadas por c-di-GMP es la transcripción diferencial de genes de proteínas involucradas en el metabolismo de este segundo mensajero. Muestra de ello, es el control que ejerce el factor transcripcional RpoS, sobre la transcripción de genes que codifican dominios GGDEF/EAL en *E. coli*. Análisis cuantitativos han revelado que RpoS regula positiva o negativamente 15 de los 28 genes involucrados en el metabolismos de c-di-GMP en esta bacteria (Römling y cols., 2013). De igual forma este fenómeno también ha sido observado en otras especies bacterianas como *S. enterica* (Römling y cols., 2010), *V. cholerae* (Beyhan y Yildiz, 2010). Caso aparte lo constituye el control del factor transcripcional AgfD sobre la diguanilato ciclase AdrA, una de los principales actores en la manifestación del fenotipo “Rojo, Seco y Rugoso” (“Rdar”) en *S. enterica* (Kader y cols., 2006).

1.5.3.4 Regulación de la actividad diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa mediante señales ambientales

Tal como se expuso anteriormente, la presencia de dominios accesorios, comúnmente ubicados en la región N terminal es frecuente en proteínas con actividad diguanilato cilclasa/fosfodiesterasa (Figura 1). Estos dominios han mostrado actuar como sensores de señales ambientales que ejercen control de su actividad enzimática (Galperin y cols., 2004; Römling y cols., 2013). Ejemplo de ello es la actividad fosfodiesterasa de “PDEA1” en *G. xylinus*, cuyo dominio “PAS” (Per-Arnt-Sim), controla su actividad de manera oxígeno dependiente (Chang y cols., 2001). El mismo fenómeno ha sido descrito para la fosfodiesterasa ortóloga DosP de *E. coli* (Tarnawski y cols., 2013), donde el dominio PAS actúa como sensor de oxígeno vía grupos hemo presentes en su estructura (Henry & Crosson 2011). Se han descrito dominios sensores sensibles a ciertos espectros de luz como es el caso del dominio “PHY” que regula la actividad de la diguanilato ciclasa BphG en *R. sphaeroides* (Tarantina y cols., 2006). Más reciente es la descripción de la diguanilato ciclasa DgcZ de *E. coli*, cuya actividad es inhibida en presencia de zinc, metal detectado por su dominio CZB, siendo este el primer caso descrito de un dominio sensor sensible a un metal (Zahringer y cols., 2013).

Si bien se han descrito señales ambientales tales como la presencia de poliaminas (Karatan y cols., 2009), cambios en la concentración de fosfato (Chekabab y cols., 2014) o presencia de antibióticos (Hoffman y cols., 2005) que afectan la actividad de diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas, el espectro de señales ambientales que inciden en estas estas enzimas y los dominios involucrados en su detección se encuentran pobremente descritos (Römling y cols., 2013).

1.6 Planteamiento del problema

La vía del c-di-GMP es un mecanismo de transducción de señales ambientales que regula la formación de biopelículas en bacterias, por lo que el estudio del efecto del cadmio sobre esta vía de señalización, permitirá ahondar en los mecanismos moleculares que operan en la formación de estas estructuras multicelulares en presencia de metales pesados.

En este contexto la identificación de genes determinantes de la formación de biopelículas en *C. metallidurans* CH34, modelo de biorremediación y resistencia a metales pesados, abrirá la posibilidad de realizar modificaciones genéticas que impacten estos atributos.

1.7 Hipótesis y Objetivos

Hipótesis:

“La presencia de cadmio induce cambios en la expresión de genes involucrados en la vía del c-di-GMP que promueven la formación de biopelículas y fomentan la resistencia a este metal en

Cupriavidus metallidurans CH34 “

Objetivo general:

Caracterizar el rol de la vía del c-di-GMP en la formación de biopelículas y resistencia a cadmio en *C. metallidurans* CH34

Objetivos específicos:

- ¹ Determinar la presencia de componentes de la vía del c-di-GMP en el genoma de *C. metallidurans* CH34.
- ² Analizar el efecto de la presencia de cadmio sobre la formación de biopelículas y la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34.
- ³ Analizar el efecto de la modificación de la dosis génica de genes involucrados en la vía del c-di-GMP sobre la formación de biopelículas y la resistencia a cadmio en *C. metallidurans* CH34.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas y medios de cultivo

Las cepas de *C. metallidurans* CH34 , AE128, AE126 y AE104 fueron cultivadas a 30 °C en medio mínimo “Low Phosphate Tris Media” (LPTMS): Tris (6,06 g/L), NaCl (4,68 g/L), NH₄Cl (1,07 g/L), KCl (1,49 g/L), Na₂SO₄ X 10 H₂O (0,98 g/L), MgCl₂ X 6 H₂O (0,20 g/L), CaCl₂ x 2 H₂O (0,03 g/L), Na₂HPO₄ (0,085 g/L), Citrato Fe/NH₄ (0,005 g/L), 1 mL/L de solución de elementos traza SL7 de Biebl y Pfenning (1000X) y succinato 0,3 % (Mergeay y cols., 1985). Las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* fueron cultivadas en medio LB con 5 g/L de NaCl, en caldo super óptimo (SOB) y SOC (SOB + succinato 0,3%). Las cepas de *E. coli* SL17-1 λpir pJBTc19 y pJBTc19:*pleD** fueron donadas por el Doctor Juan San Juan (EEZ-CSIC Granada, España). Las conjugaciones biparentales se efectuaron en medio agar caldo nutritivo 1,5% (NB). El conteo de UFC de *C. metallidurans* se realizó en medio agar TSA 1,5% (Producto de digestión enzimática de Caseína 15 g/L, Producto de digestión enzimática de harina de Soya 5 g/L, NaCl 5 g/L)

2.2 Herramientas bioinformáticas

2.2.1 Búsqueda de componentes genéticos asociados a la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34

La secuencia del genoma de *C. metallidurans* CH34 fue obtenida desde la base de datos de Centro Nacional de Información para la Biotecnología de E.E.U.U (NCBI). Para identificar genes relacionados con la vía del c-di-GMP se extrajeron las secuencias aminoacídicas de dominios arquetípicos GGDEF, EAL y HD-GYP, en los que los determinantes aminoacídicos para cada

actividad catalítica han sido caracterizados por mutagénesis sitio dirigida y cristalografía de rayos X. Este fue el caso del dominio GGDEF de la diguanilatociclasa "PleD" de *C. crescentus* (Malone y cols., 2007; Wassmann y cols., 2007), del dominio EAL presente de la fosfodiesterasa TBD_1265 de *Thiobacillus denitrificans* (Schmidt y cols., 2005; Tchigvintsev y cols., 2010) y del dominio HD-GYP presente en la fosfodiesterasa Bd1817 de *B. bacteriovorus* (Lovering y cols., 2011) (Figura 3). Dichas secuencias aminoacídicas fueron utilizadas como entradas de alineamiento local a través del programa BlastP (Altschul y cols., 1997) en el proteoma de *C. metallidurans* CH34. A partir de estos resultados se seleccionaron un conjunto de ORFs utilizando como límites de corte los valores de $e\text{-value} \leq 4 \times 10^{-6}$; en la búsqueda de dominios GGDEF, $e\text{-value} \leq 2 \times 10^{-7}$ en la búsqueda de dominios EAL y $e\text{-value} \leq 0,03$ en el caso de la búsqueda de dominios HD-GYP.

Los dominios GGDEF, EAL o HD-GYP codificados en cada ORF seleccionado, fueron extraídos de la base de datos de NCBI. Para analizar la conservación de los motivos determinantes de actividad, se realizó un alineamiento global entre dominio utilizando Clustal W (Thompson y cols., 1994), usando como referencia la secuencia de cada dominio arquetípico. El resultado de cada alineamiento fue visualizado con el programa "jalview" (<http://www.jalview.org/>).

El hallazgo del efector PelD se llevó a cabo mediante una búsqueda de anotaciones en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Posterior a su identificación se evaluó la conservación de aminoácidos importantes para su unión al dímero de c-di-GMP (Arg 567, Gli 568, Leu 569, Asp 570, Val 751 y Arg 402) (Lee y cols., 2007; Whitney y cols., 2012) vía alineamiento global con la secuencia aminoacídica PelD de *P. aeruginosa*.

La búsqueda de dominios PilZ, efectores de esta vía, se realizó mediante la búsqueda de ORFs anotados bajo dicha denominación en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Las anotaciones identificadas fueron evaluadas en su capacidad de unir c-di-GMP en base a la conservación de los motivos de unión a c-di-GMP ("RxxxR" y "D/NzSxxG") que conforman el denominado "c-di-GMP switch" (Benach y cols., 2007; Amikam y cols., 2006; Römling y cols., 2013). La presencia de estos

motivos se determinó mediante el alineamiento global de las secuencias aminoacídicas extraídas de cada dominio, con el dominio PilZ activo (Q9HVI1.1) de la proteína PA4608 de *P. aeruginosa*. Para fortalecer esta predicción de actividad, se incluyó en este alineamiento el dominio PilZ inactivo (3DSG_C) (Habazettl y cols., 2011).

Por último, la búsqueda del factor transcripcional Bcam1349, efector de esta vía en *Burkholderia cenocepacia* (Fazli y cols., 2011), se realizó vía alineamiento local. Posteriormente, la secuencia identificada (e-value $\leq 7 \text{ E-}81$) fue sometida a un análisis de conservación vía alineamiento global con la secuencia aminoacídica de Bcam1349.

2.2.2 Análisis del contexto génico de ORFs asociados a la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34

El análisis de contexto génico de cada ORF identificado se realizó en la plataforma <http://mgcv.cmbi.ru.nl> analizando ventanas de 15000 nucleótidos y caracterizando la función asociada a cada uno según categorías COG (Overmans y cols., 2013).

2.2.3 Análisis de homología entre secuencias aminoacídicas codificadas en los genomas de *C. metallidurans* CH34 y los genomas de *E. coli* K12 y *P. aeruginosa* PAO1

El análisis de homología entre proteínas codificadas en *C. metallidurans* CH34 con dominios asociados al metabolismo de c-di-GMP y proteínas de *E. coli* K12 y *P. aeruginosa* PAO1, se efectuó vía un algoritmo de alineamiento local (BlastP). Se definieron secuencias homólogas, alineamientos con identidad $> 30 \%$, abarcando un porcentaje $> 90 \%$ de la secuencia de interés (Brenner y cols., 1998; Pearson 2013). Estos resultados se confirmaron mediante análisis de conservación de arquitecturas de dominios obtenidas desde la plataforma CDART (Geer y cols., 2002).

2.3 Exposición a cadmio de células plantónicas y biopelículas

Los cultivos de biopelículas y células plantónicas de *C. metallidurans* se efectuaron a partir de una suspensión celular de densidad 1×10^8 células/mL en medio LPTMS succinato 0,3 %. Dicha suspensión fue utilizada como inóculo para el cultivo de biopelículas filtrando por vacío 1 mL de suspensión sobre membranas de policarbonato estéril de 25 mm de diámetro y $0,2 \mu\text{M}$ de diámetro de poro (Whatmann 110656). Una vez depositadas las células sobre la membrana, esta se colocó sobre medio agar semisólido 0,8 % LPTMS succinato 0,3 % e incubaba a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en condiciones estáticas por 10, 13 y 16 h. A partir de 1 mL de la misma suspensión de células se inoculó el cultivo plantónico en 9 mL medio LPTMS succinato 0,3% para luego incubarlo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en condiciones de agitación a 150 rpm por 10, 13 y 16 h. Este procedimiento permitió iniciar los cultivos de ambos estilos de vida, a partir de un inóculo con la misma cantidad inicial de células. Transcurridos los tiempos de incubación, la exposición simultánea de ambos estilos de vida al cadmio, se llevó cabo relocalizando la biopelícula desde el medio control a uno con cadmio agregado a una concentración final 2 mM. Las células plantónicas fueron expuestas a cadmio agregando directamente cadmio en solución. La exposición de ambos estilos de vida se realizó durante 45 min. (Figura 4).

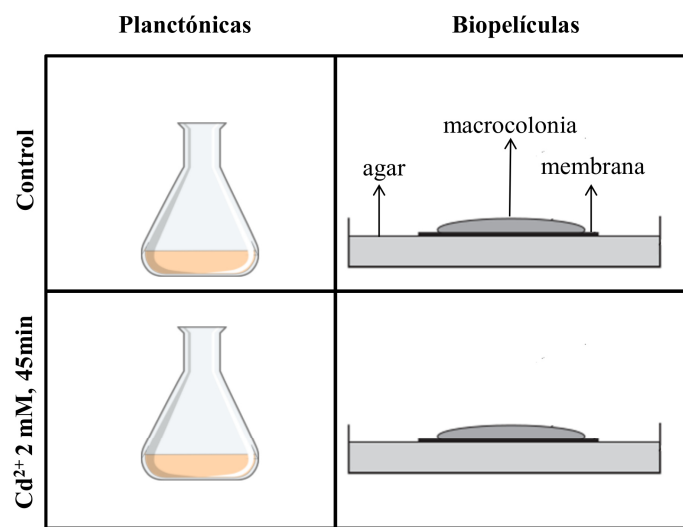


Figura 4. Diseño experimental para la exposición a cadmio de células planctónicas y biopelículas de *C. metallidurans*. El modelo de biopelícula utilizado corresponde a macrobiopelículas formadas sobre filtros de policarbonato.

2.4 Estudios transcriptómicos en células plantónicas y biopelículas de *C. metallidurans* CH34 expuestas a cadmio

2.4.1 Extracción de RNA y retrotranscripción

Concluído el tiempo de exposición definido en la sección 2.3, las membranas colonizadas por las biopelículas fueron inmediatamente colocadas en una mezcla de 10 mL de medio líquido LPTMS 2 mM con 1/5 de volumen de una "stop solution" fría (etanol 95 %, fenol saturado 5 %, pH < 7,0) (Lin Chao y cols., 1991; Bernstein y cols., 2002; Lin y cols., 2008) para fijar los transcriptomas presentes.

Posterior a ello las células fueron recolectadas por centrifugación a 1920 x g por 10 min a 4 °C, luego traspasadas a tubos Eppendorf de 2 mL y centrifugadas nuevamente por 1 min a 6 x g a 4 °C.

Cada sedimento celular fue suspendido en 700 µL de solución de lisis (20 mM acetato de sodio pH 5,5; 1 mM EDTA, 0,5 % SDS, 1 % β-mercaptoetanol), e incubado a 65 °C por 10 min. Los productos de lisis se mezclaron por inversión durante 10 min con 700 µL de fenol ácido precalentado homogenizando ambas fases cada 2 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 16000 x g a 4 °C por 5 min. La fase acuosa obtenida se mezcló por inversión con 700 µL de fenol ácido/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se centrifugó a 16000 x g a 4 °C por 5 min. La fase acuosa obtenida se mezcló con 700 µL de cloroformo y se dejó por 3 min a temperatura ambiente para luego centrifugar a 16000 x g a 4 °C. Por último, la fase acuosa se mezcló con 1 volumen de isopropanol, 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y 1 µL de glicógeno. Para precipitar el RNA, esta mezcla se incubó a -20 °C toda la noche. El RNA precipitado se recuperó por centrifugación a 16000 x g por 30 min a 4 °C, dos lavados con etanol 70 % y suspensión en 50 µL de agua libre de nucleasas. Para eliminar el

DNA genómico remanente, 10 µg de RNA fueron tratados con 2U de DNAsa TURBO (Ambion AM1907) por 1,5 h a 37 °C de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Luego de ello el producto de digestión fue llevado a un volumen de 200 µL y precipitado con 1 volúmen de LiCl 7,5 M durante la noche a -20°C. El RNA precipitado se recuperó por centrifugación a 16000 x g por 20 min. 4 °C. Luego se lavó 2 veces con 1 mL de etanol 70 % y dejó secar a temperatura ambiente por 15 min. Finalmente el RNA se resuspendió en 35 µL para realizar los análisis de integridad en gel de agarosa, cuantificación por espectrofotometría a 260 nm y evaluación de la presencia de DNA genómico por PCR (40 ciclos) de un fragmento del gen *cadA* (175 pb). De no encontrarse indicios de contaminación con DNA genómico se procedió a la síntesis de cDNA a partir de 500 ng de RNA total con 0,5 µg de hexámeros al azar y la transcriptasa inversa IMPROM II (Promega A3800). Cada cDNA obtenido fue diluído 20 veces, usando 1 µL por reacción.

2.4.2 PCR de transcripción reversa

Se estimó la abundancia de un sub conjunto de 20 transcritos prioritarios vía análisis cualitativo de la intensidad de banda de amplicones obtenidos en fase exponencial de la reacción de amplificación determinada entre los 30 y 33 ciclos. Este análisis se llevó a cabo comparando condiciones y estilos de vida en dos replicas biológicas. Como control positivo de exposición a cadmio se usó el amplicón correspondiente al gen *cadA* (*RMET_RS11560*) responsable de la detoxificación de cadmio desde el citoplasma de *C. metallidurans* CH34 (Nies y cols., 2003). Como genes referenciales, se utilizaron *rpoZ* (*RMET_RS04305*) y *gyrB* (*RMET_RS00030*). Cada reacción de PCR fue realizada a una concentración de partidores 0,625 nM usando el “kit” de amplificación “Takara Sapphire RR350”. Los partidores utilizados fueron los mismos utilizados en RT-qPCR descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de los partidores utilizados

ORF	Orientación	Secuencia 5' - 3'	Amplicon (pb)
<i>RMET_RS02985</i>	Fwd	AGCGCGGTTTCGGTGATTT	127
	Rev	TGGTGTTCGATCAACCTGTCT	
<i>RMET_RS05485</i>	Fwd	GTGCATTGCTTGGATGGCTT	145
	Rev	ACGCCTACGCATTTCGTTGT	
<i>RMET_RS05490</i>	Fwd	GCTTGGGTTTCGCAACTCCTT	124
	Rev	ACATGCTGGTGCATTGTGCT	
<i>RMET_RS08460</i>	Fwd	GGAATCATATGCCCAACCGCTAAG	120
	Rev	ACGTATCCGTCAAACCGCAACA	
<i>RMET_RS08465</i>	Fwd	GCCAAGAGTACCGATTGCGT	133
	Rev	ATGTGGATGCGCTGCACTTT	
<i>RMET_RS09375</i>	Fwd	GGAAACAGCGCCTGATCAT	135
	Rev	AATTGCCAGCGTGAAGCAGA	
<i>RMET_RS11180</i>	Fwd	TGGCCATCGCCAATCATGTT	125
	Rev	AGAAAGGCCCGTGATCTGGT	
<i>RMET_RS11270</i>	Fwd	CGCGTTTGGACAGCGAATG	113
	Rev	CGTGCTGAAGCTGGTTTTGC	
<i>RMET_RS11280</i>	Fwd	TGCCGTCGCGTGGAAAGAAT	121
	Rev	TGTCGAATGCGGCAAGCAGA	
<i>RMET_RS11355</i>	Fwd	CCATCGCCGGACATCGTTT	139
	Rev	GCCTCGCTTGGCTTCATACA	
<i>RMET_RS16170</i>	Fwd	TCTGGCTGCATTCGCTGTTT	133
	Rev	CGGATTTCCGCCACGGTAGTT	
<i>RMET_RS19900</i>	Fwd	GCCGACGTCACGATCGATTA	139
	Rev	CGTTTGGGCCAGATTGCTTG	
<i>RMET_RS20545</i>	Fwd	AAGCTTCCGGATTTCGATCGAGTTG	148
	Rev	TTAGCCGCTGCAGTTCGAGATT	
<i>RMET_RS20720</i>	Fwd	GCTGGTCAGATCACGCAACT	127
	Rev	TGGCCAAGCCGCTGAATTT	
<i>RMET_RS22980</i>	Fwd	GTCGATGGCGGTCAACCTTT	115
	Rev	TCGAGCGTCAATCGTCTTGG	

Continuación de la Tabla 1.

<i>RMET_RS24295</i>	Fwd	GCGATCGTTGAATGGCTTGA	132
	Rev	TATGCGAATCCGCTGACGTT	
<i>RMET_RS24820</i>	Fwd	GCGGGCGATCTTCACGTAAT	137
	Rev	CGCTGGAATCGCTGACCAA	
<i>RMET_RS25455</i>	Fwd	GGCTGATAGCAAGCCACGAA	144
	Rev	ACCCCGCGAGTCTGGTAAAT	
<i>RMET_RS26980</i>	Fwd	ACGTTGGCCACGCTGTTT	139
	Rev	TGATTGCCTGCGTCATGACC	
<i>RMET_RS28910</i>	Fwd	GTGCATGGCCAGATGGTTCA	149
	Rev	CGAAAGAACGGCGAGCTGTA	
<i>RMET_RS29325</i>	Fwd	ACGCCTTCGAAAGCCAGTT	123
	Rev	TGGCATGGCCGTGTATGTC	
<i>RMET_RS29670</i>	Fwd	TCCGCCAGGTTAAGCAAACA	127
	Rev	AAGCGAATCGTGCCCTTGT	
<i>RMET_RS30470</i>	Fwd	TCGCGCCTTTATCCATGACA	132
	Rev	ACCGACACTTGCCAAACGTA	
<i>urf2</i>	Fwd	CACGCTCAAGATCGACCAAT	133
	Rev	AAGACTCGCCGATGTTTCCA	
<i>rpoZ</i>	Fwd	CGCGTATTACCGTCGAAGA	123
	Rev	TGTCCTTTGCTCGACCTT	
<i>gyrB</i>	Fwd	AGAAAACGAGGTCGCCAAGA	132
	Rev	GAAACGAGCTTGTCTTGGT	
<i>urf2.2</i>	Fwd	AATAATAAGCTTATGAGCGCTTTCCGG	1050
	Rev	AATAATGAATTCATGCCGCCGCCGGCA	

2.4.3 Determinación de abundancia de transcritos mediante qPCR de transcripción reversa

Para este análisis, cada cDNA obtenido fue diluido 30 veces en agua libre de nucleasas. 1 µL de esta dilución fue utilizado como molde para la reacción. Para ello se utilizó el kit de amplificación Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, 4385612) y el equipo de QPCR “Step One” (Applied Biosystems, 271003314). Los cambios en abundancia de cada transcrito fueron determinados por cuantificación relativa respecto a los genes referenciales *gyrB* y *rpoZ*, en la condición control y experimental (Ecuación).

$$NRQ = \frac{E^{\Delta Ct_{gdi}}}{\sqrt{\Pi_0^f Ct_{gdi}}}$$

Ecuación. Fórmula utilizada para el cálculo de “cantidades relativas normalizadas” de transcritos entre dos condiciones experimentales (NRQ). *E*: Eficiencia de amplificación, *Ct*: ciclo límite donde comienza la fase exponencial de la reacción de amplificación. *f*: número de genes referenciales, *gdi*: gen de interés

Una vez disponibles los datos de Ct (“threshold cycle”) se determinó el número de “cantidades relativas normalizadas” (NRQ: “*Normalized Relative Quantities*”) para cada transcrito. Este parámetro expresa el efecto de un tratamiento experimental en la abundancia de un transcrito específico (Hellemans y cols., 2007). Se consideró como cambio de abundancia significativo NRQs fuera del rango [+1, -1], parámetro evaluado mediante test de t student de una muestra con un IC= 95%.

La eficiencia de amplificación de cada par de partidores, fue determinada a partir de la pendiente de la recta generada entre los Ct obtenidos de la amplificación de cinco diluciones seriadas de 100 ng/ μ L de DNA genómico de *C. metallidurans* CH34. Determinaciones realizadas en duplicado. (Anexo 1).

2.5 Cuantificación de c-di-GMP en extractos nucleotídicos de biopelículas y células plantónicas de *C. metallidurans*

Los sedimentos celulares obtenidos de cultivos bajo las condiciones descritas en la sección 2.3 fueron suspendidos en 300 μ L de buffer de extracción (acetonitrilo/etanol/agua: 2/2/1) e incubados en hielo por 15 min. Posteriormente fueron incubados 10 min a 95 °C y luego centrifugados a 4°C por otros 10 min a 13000 x g. El sobrenadante fue recolectado en tubos “Eppendorf” de 2 mL. El sedimento celular remanente fue nuevamente resuspendido en 200 μ L de buffer de extracción, incubado en hielo por 10 min adicionales y vuelto a centrifugar juntando ambos sobrenadantes. Este tratamiento se repitió con el sedimento celular remanente.

El sobrenadante total obtenido (700 μ L) fue incubado a -20 °C por 16 h y separado de detritos celulares remanentes por centrifugación a 16000 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se deshidrató en “speedvac” a 25°C durante 4 h. Previo a su cuantificación los extractos nucleotídicos fueron solubilizados utilizando un vórtex e incubando a 4°C por 30 min en 200 μ L de agua nanopura. Los extractos fueron cuantificados por HPLC-MS en las dependencias de Biolog (Bremen, Alemania). Los resultados obtenidos fueron normalizados por el contenido de proteínas totales determinado en cada muestra mediante el kit BCA (Thermo, 23227). Todos los análisis se realizaron a partir de tres réplicas biológicas.

2.6 Clonamiento molecular del gen *urf2.2*

2.6.1 Preparación de células electrocompetentes y electrotransformación de cepas de *E. coli*

S17.1 λ pir.

Las cepas de *E. coli* se sembraron en agar LB 1,5% en presencia de concentraciones selectivas de antibióticos: trimetropim (Tp) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y ácido nalidixico (NA) 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la cepa S17.1 λ pir. Luego de su incubación por 16 h a 37 °C se sembró a partir de una colonia aislada, un preinóculo en 5 mL de medio LB bajo las mismas condiciones selectivas a 150 rpm. Transcurridas 16 h de incubación, se inoculó 200 mL al 1 % v/v en LB en presencia de antibióticos y se monitoreó su densidad óptica a 600 nm (OD_{600}) hasta alcanzar valores entre 0,5 y 0,8.

Posterior a ello, el cultivo se colocó en hielo durante 15 min para luego obtener un sedimento celular por centrifugación a 4500 x g por 10 minutos a 4 °C. El sedimento fue lavado cinco veces con una solución de glicerol 10 % enfriada en hielo para finalmente suspenderlo en 150 μL de glicerol 10 %. Para efectuar la electrotransformación se mezcló 50 μL de la suspensión celular obtenida, con 200 ng de vector contenidos en 2,5 μL (80 ng/ μL). La mezcla se colocó en una cubeta de electrotransformación de 0,2 cm y se le aplicó un pulso eléctrico (2,4 kV por 5 milisegundos). Inmediatamente después se agregó a la mezcla 1 mL de medio SOB y se incubó a 37 °C por 1 hora. Transcurrido este tiempo se sembró 100 μL de la mezcla en agar LB en presencia de tetraciclina (Tc) 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y ampicilina (Ap) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las células transformadas se seleccionaron transcurridas 48 h de incubación a 37°C. Las células de *E. coli* transformadas se lisaron en presencia de NaOH y para luego liberar los insertos mediante digestión doble con *EcoRI/XbaI* (Fermentas) por 1 h a 37°C (Anexo 2).

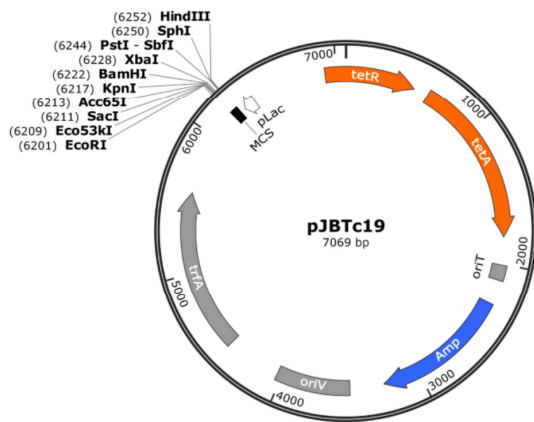
2.6.2 Vectores de expresión

Para la sobreproducción de proteínas en cepas de *C. metallidurans* se utilizó el vector pJBTc19 (Figura 5A), donado por el Laboratorio del Doctor Juan San Juan (Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada, España). Este ha sido utilizado anteriormente como vector de expresión en gamma y beta proteobacterias de vida libre (Blatny et al., 1996, Paul y cols. 2004, Pérez-Mendoza y cols. 2014). Se recibió también por parte de este grupo, la construcción pJBTc19:*pleD** con el inserto “*pleD**” (*Xba*I/*Eco*RI) codificante para una versión constitutivamente activa de la diguanilatociclasa PleD de *C. crescentus* (Paul y cols. 2004), consecuencia de cuatro mutaciones puntuales (Asn/Thr 120, Ala Thr 214, His/Pro 234 y Tyr/Asn 234). Esta construcción (Figura 5B), fue utilizada para elevar los niveles de c-di-GMP de forma constitutiva (Pérez-Mendoza y cols. 2014).

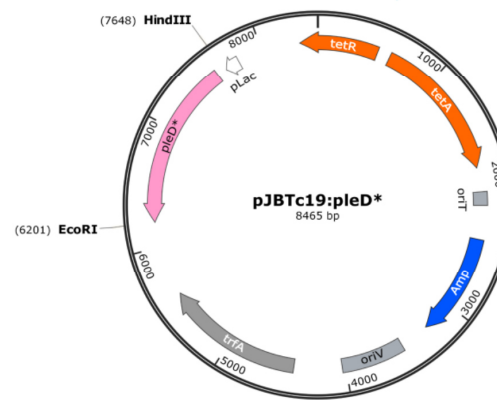
2.6.3 Construcción del plasmidio pJBTc19:*urf2.2*

El DNA genómico de *C. metallidurans* CH34 fue purificado de células suspendidas en 400 µl de solución 0,4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8,0. A esta suspensión se agregó 44 µl de SDS 20 % y 1 µl de solución de RNasa 10 mg/ml y se incubó a 65 °C por 30 min. Una vez enfriada la suspensión a temperatura ambiente, se agregó 300 µl de NaCl 6 M, para luego homogenizar la mezcla en vórtex a máxima velocidad por 30 s. Luego de centrifugar a 16000 x g por 10 min, el sobrenadante por inversión con un volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C por 1 h. Transcurrido dicho período, la muestra se centrifugó a 16000 x g por 10 min a 4 °C y se descartó la fase acuosa. El DNA se lavó con 750 µl de etanol 75 % dos veces y luego de secar al aire por 15 min, fue suspendido en 100 µl de agua nanopura para su análisis de integridad en geles de agarosa y ser cuantificado por espectrofotometría a 260 nm.

A



B



C

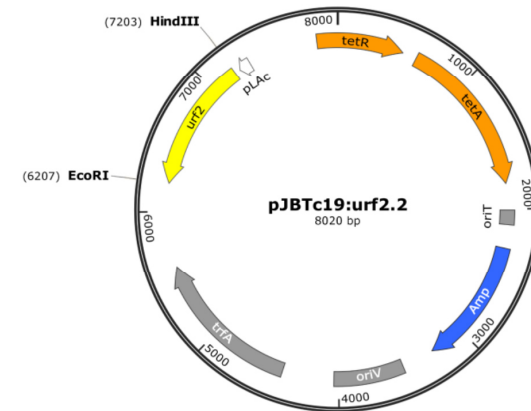


Figura 5. Plasmidios utilizados en la sobreexpresión de genes en *C. metallidurans* y *P. aeruginosa*. A) **pJBTC19:** Vector vacío. B) **pJBTC19:pleD*:** Constructo sobre pJBTC19 con el inserto pleD* *HindIII/EcoRI*. C) **pJBTC19:urf2.2:** Constructo sobre pJBTC19 con el inserto urf2.2 *HindIII/EcoRI*. *tetR*: sitio promotor de *tetA*. *tetA*: Gen de resistencia a Tetraciclina. *Amp*: Gen de resistencia a ampicilina. *MCS*: sitio de multiclonamiento. *CAP*: ORF del factor de transcripción dependiente de AMP cíclico. *oriT*: origen de transferencia. *oriV*: Origen de replicación. *trfA*: ORF de proteína iniciadora de la replicación *oriV*: Origen de replicación. *oriT*: origen de transferencia.

Los partidores diseñados para amplificar la secuencia codificante de “*urf2.2*” se basaron en la secuencia nucleotídica de *RMET_RS30310* (Tabla 1). Se obtuvo un producto de amplificación de *RMET_RS30310* por PCR utilizando la DNA polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen 1253216), con partidores específicos, diseñados para generar un amplicón flanqueado por sitios de restricción *EcoRI/HindIII*. El producto obtenido fue ligado con el vector pGEM-T easy (Promega A1360) y luego introducido por electrotransformación en *E. coli* JM109. La introducción del vector recombinante pGEMT:*urf2.2* en *E. coli* JM109 se confirmó mediante PCR. Posterior a ello, pGEMT:*urf2.2*, se digirió con *EcoRI* y *HindIII* para liberar el inserto con extremos cohesivos que permitiesen la ligación en el vector pJBTc19. Esta ligación fue llevada utilizando ligasa de fago T4 (Promega M1801) utilizando una proporción molar de 2:1 (inserto/vector) bajo las recomendaciones del fabricante. El producto de ligación fue introducido por electrotransformación a *E. coli* JM109. Se seleccionaron colonias transformantes por PCR para su cultivo posterior y extracción del constructo “pJBTc19:*urf2.2*” (Figura 5C) vía Midiprep (Omega D6904). Posteriormente, la presencia del inserto *urf2.2* fue corroborada por secuenciación. Las cepas y genotipos utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 2.

2.6.4 Conjugación biparental de *C. metallidurans*

La cepa dadora de *E. coli* S17.1 λ pir y la cepa receptora de *C. metallidurans* fueron cultivadas hasta su fase exponencial en 5 mL de medio LB Tc 15 μ g/mL, Ap 100 μ g/mL y medio LPTMS succinato 0,3 % respectivamente. Ambos cultivos se concentraron en 1 mL de solución NaCl 0,85 % estéril. Se depositaron por filtración por vacío 200 μ L de la cepa receptora y sobre ella 50 μ L de la cepa dadora sobre membranas de policarbonato (Whatmann 110656). Las membranas inoculadas fueron depositadas sobre medio agar caldo nutritivo e incubadas durante 48 h a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, cada membrana inoculada fue colocada en 1 mL de solución

Tabla 2. Cepas y genotipos utilizados.

Cepas de <i>C. metallidurans</i>	Genotipo
AE104	Δ pMOL30, Δ pMOL28
AE128	Δ pMOL28
AE126	Δ pMOL30-
CH34	pMOL30, pMOL28
CH34 pJBTc19	CH34 transformada con vector vacío pJBTc19
CH34 pJBTc19: <i>pleD</i> *	CH34 transformada con pJBTc19: <i>pleD</i> *
CH34 pJBTc19: <i>urf2.2</i>	CH34 transformada con pJBTc19: <i>urf2.2</i>
Cepas de <i>P. aeruginosa</i>	Genotipo
PAO1	Wild type
PAO1 Δ <i>rocR</i>	Mutante nula del gen <i>rocR</i> derivada de PAO1
PAO1 Δ <i>rocR</i> pJBTc19	PAO1 Δ <i>rocR</i> transformada con vector vacío pJBTc19
PAO1 Δ <i>rocR</i> pJBTc19: <i>urf2.2</i>	PAO1 Δ <i>rocR</i> transformada con vector pJBTc19: <i>urf2.2</i>

NaCl 0,85% estéril y agitada en un vórtex para desprender el césped celular obtenido durante el tiempo de incubación. Se sembró 75 μ L de la suspensión celular en medio agar (1,5%) caldo nutritivo (NB) en presencia de kanamicina (Kan) 1000 μ g/mL, tetraciclina (Tc) 15 μ g/mL y ampicilina (Ap) 100 μ g/mL y se incubó 4 días a 30°C. Para confirmar la efectiva transconjugación de *C. metallidurans*, las colonias obtenidas se replicaron en medio agar selectivo sin kanamicina, las que se inocularon en 10 mL de medio TSB Tc 15 μ g/mL, Ap 100 μ g/mL. Transcurridas 16 h se realizó una extracción plasmidial ("Wizard" Midiprep, Promega A7640) y digestión doble del producto con *EcoRI/XbaI* (Fermentas) por 1 h a 37 °C (Anexo 2).

2.7 Ensayos fenotípicos

2.7.1 Ensayos en agar Rojo Congo

Las cepas de *C. metallidurans* fueron crecidas en medio líquido LPTMS toda la noche. Posteriormente, los cultivos fueron diluidos para obtener una densidad celular equivalente a una $OD_{600} \sim 0,5$. Se sembró 5 μ L de cada suspensión celular, en medios agar LB, sin NaCl y suplementados con Rojo Congo 50 μ g/mL y azul de Comassie 10 μ g/mL (Romero y cols., 2010), de forma de visualizar la retención de Rojo Congo en EPS de matrices extracelulares. Las placas fueron incubadas por 5 días a 30 °C. Las macrobiopelículas formadas fueron visualizadas en una lupa Olympus MVX10.

2.7.2 Ensayos con tinción Cristal Violeta

Las biomasas adheridas fueron cuantificadas desde cultivos de 180 μ L en microplacas de 96 pocillos de fondo redondo (NEST 701101). Una vez descartada la fracción plantónica remanente vía dos lavados sucesivos con agua destilada, la biomasa adherida fue teñida con 200 μ L de solución cristal violeta 0,1 % (MERCK 425555) por 15 min. Posteriormente, las placas fueron lavadas tres veces con agua destilada y secadas a temperatura ambiente por 16 h. El colorante retenido en la biomasa adherida fue solubilizado con 200 μ L de ácido acético 30 % por 15 min. De este volumen, se tomó 150 μ L de cada pocillo para colocarlos en una microplaca de fondo plano (NEST 701001) para realizar la cuantificación del colorante por absorbancia a 595 nm (Stepanovic y cols. 2007; O'Toole y cols. 2011).

2.7.2.1 Formación de biopelículas de *C. metallidurans* CH34 en presencia de cadmio

Las células de *C. metallidurans* CH34 se recolectaron de un cultivo fresco (16 h) de *C. metallidurans* CH34 por centrifugación. El sedimento celular se suspendió en un volumen de medio fresco para obtener una suspensión celular con una densidad inicial $OD_{600} \sim 2,0$. Esta suspensión fue distribuida en cultivos de 180 μ L. El cadmio se agregó adicionando diferentes volúmenes de una solución de cadmio 10 mM estéril. La viabilidad celular en las fracciones plantónicas de cada cultivo se determinó como UFC/mL en medio TSA.

2.7.2.2 Cultivo de biopelículas con cepas de *P. aeruginosa*

Células de *P. aeruginosa* presentes en cultivos frescos (16 h a 30 °C) se recolectaron por centrifugación. El sedimento celular fue luego suspendido en un volumen de medio fresco para obtener una suspensión celular con una densidad inicial $OD_{600} \sim 0,05$. Esta suspensión fue distribuida en cultivos de 180 μ L e incubada 6 h en condiciones de agitación 150 rpm a 30 °C.

2.8 Determinaciones de susceptibilidad a cadmio en “Calgary Biofilm Device”

2.8.1 Cultivos de biopelículas y células plantónicas

Esta actividad se realizó durante la estadía de investigación realizada en el “Biofilm Research Group” del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Calgary, Canadá, que dirige el Doctor Raymond Turner (Junio a Noviembre 2016). Se empezó sembrando 50 μ L de stock de criopreservación (medio LPTMS, glicerol 40 %) directamente a 5 mL de medio LPTMS Hg 2,5 μ M por 16 h. Las células se concentraron en a un volumen de 250 μ L de LPTMS a partir del cual se tomó un inóculo para realizar una siembra en estría a una placa LPTMS sólido Hg 10 μ M, se incubó durante 48 horas a 30°C hasta la obtención de colonias aisladas (Figura 6). A partir de las colonias obtenidas, posteriormente se realizó una suspensión celular con una turbidez equivalente a una solución estándar Mc Farland 1,0 (Thermo R20421). Para inocular, la suspensión celular se diluyó 15 veces antes de colocar en incubación en el sistema CBD (Innovotech 19111) a 30°C y 150 rpm (Ceri y cols., 1999; Harrison y cols., 2010).

2.8.2 Ensayos de susceptibilidad a cadmio de células plantónicas y biopelículas

Transcurridas 24 h de incubación, las biopelículas formadas fueron separadas de la fracción plantónica y utilizadas independientemente como inóculo para su cultivo a través de un gradiente de concentración de cadmio (0,5 a 32 mM) por 24 h. Para cuantificar la sobrevivencia tras la exposición, se determinó el número de ufc/mL presentes en cada fracción (Harrison y cols., 2010) (Figura 6). La mínima concentración bactericida de células plantónicas (MBC) y la mínima concentración de erradicación de biopelículas (MBEC) fueron calculadas bajo la definición de “concentración de compuesto biocida requerida para disminuir el 99,9% de la población control” (Harrison y cols., 2007). Ambos parámetros fueron determinados mediante conteo de colonias viables (ufc/mL) en medio TSA tras la exposición a un gradiente de concentración de cadmio por 20 h. Estas concentraciones biocidas fueron calculadas partir de regresiones no lineales en el software GraphPad Prism v5. Los datos se relativizaron respecto a los valores de la población control ($Y^{\circ} = 100\%$).

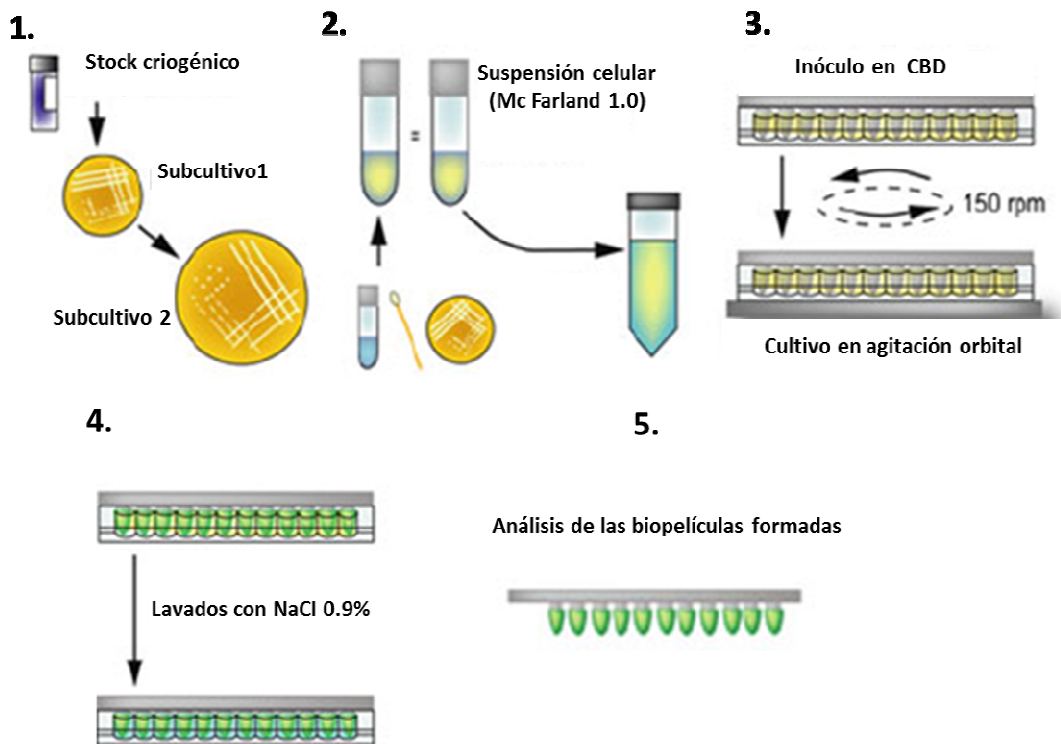
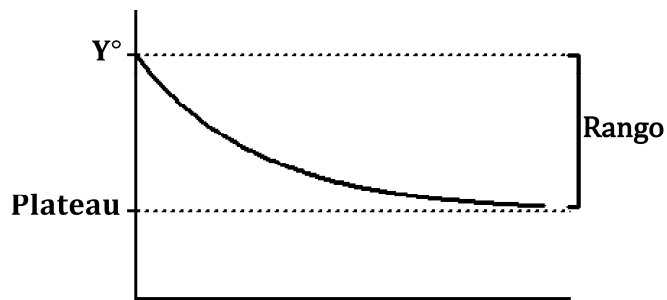


Figura 6. Esquema general del cultivo de biopelículas en el sistema “Calgary Biofilm Device”. Este protocolo consta de cinco pasos básicos. **1:** Siembra del “stock” criogénico en un medio sólido con un agente selectivo. A partir de este primer subcultivo se desarrolla un segundo subcultivo en medio no selectivo para descartar determinantes genéticos de adaptación en los resultados finales. **2:** Preparación de una suspensión celular equivalente a la densidad óptica de un estándar Mc Farland 1.0 (equivalente a 3×10^8 células/mL) a partir del subcultivo 2. **3:** Alcanzada esta densidad, la suspensión se diluyó 30 veces en medio de cultivo distribuyéndose 200 μ L en cada pocillo. Luego la tapa original de la placa fue reemplazada por una cubierta diseñada para insertar una superficie cilíndrica (“peg”) de 44 mm² en cada pocillo de la placa constituyendo así el “Calgary Biofilm Device” (Ceri y cols., 1999). **4:** Transcurrido el tiempo de incubación, las biopelículas formadas se lavaron con NaCl 0,85% para descartar las células planctónicas superficiales. **5:** Obtenidas las biopelículas, fue posible realizar los distintos análisis.

De esta manera se obtuvieron curvas de viabilidad celular cuyos parámetros respondieron a una ecuación de caída exponencial (Figura 7). La interpolación en la ecuación que describió la pérdida de viabilidad en cada cepa y estilo de vida, permitió determinar aquella concentración de cadmio (X) a la que se conservó el 0,01% de la población celular original (Y). Para resguardar la coherencia biológica de estas determinaciones, fue necesario restringir la ecuación a valores positivos ($\text{Plateau} > 0$), evitando así el cálculo de concentraciones biocidas de cadmio negativas.

Como medida de dispersión se tomó en cuenta interpolaciones adicionales, realizadas bajo los extremos del intervalo de confianza (95%) calculado para la constante de cada curva (“K”) (Figura 7). Así fue como se obtuvo tres determinaciones de susceptibilidad por ensayo, número suficiente para establecer promedios, criterios de dispersión y análisis estadísticos en cada cepa y estilo de vida expuesto a cadmio.

$$Y = (Y^\circ - \text{Plateau}) \times e^{-(K \times X)} + \text{Plateau}$$



- Y° = valor de Y cuando $X=0$.
- **Plateau**= valor de Y cuando $X=\infty$
- K = tasa de caída exponencial
- **Rango** = $Y^\circ - \text{Plateau}$
- Restricciones: $Y^\circ=100$, **Plateau** >0 .

Figura 7. Parámetros de una curva de caída exponencial

3. RESULTADOS

3.1 Determinar la presencia de componentes de la vía del c-di-GMP en el genoma de *C. metallidurans* CH34

Para estudiar los componentes genéticos que participarían en la vía de señalización vía c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34, se realizó una búsqueda bioinformática por similitud de secuencias aminoacídicas. Esta se llevó a cabo en base a secuencias aminoacídicas de dominios con funcionalidad conocida: el dominio GGDEF de la DGC PleD de *C. crescentus*, el dominio EAL de la fosfodiesterasa TBD_1265 de *T. denitrificans* y el dominio de la fosfodiesterasa HD-GYP de Bd1817 de *B. bacteriovorus*.

Además se incorporó la búsqueda de genes que codifiquen para efectores de esta vía en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Para ello se realizaron búsquedas por anotación de dominios PilZ y del efector PelD. Además se indagó, por alineamiento de secuencias aminoacídicas, la posesión de proteínas homólogas Bcam1349, factor transcripcional de la maquinaria de síntesis de celulosa en *B. cenocepacia* (Fazli y cols., 2011), cuya afinidad por esta región promotora aumenta por unión a c-di-GMP.

3.1.1 Predicción de funcionalidad en diguanilato ciclasas codificadas en el genoma de *C. metallidurans* CH34

El alineamiento local (BlastP) del dominio GGDEF de PleD con proteínas codificadas en el genoma *C. metallidurans* CH34, mostró 30 alineamientos con un e-value < 0,006; cada uno representante del dominios GGDEF codificado en 30 ORFs distintos (Anexo 3). Entre estas secuencias aminoacídicas se estableció la presencia de un dominio EAL en 12 de ellas,

reubicándolas bajo la categoría de productos génicos híbridos, que incluyen ambos dominios (GGDEF y EAL) en la misma cadena polipeptídica.

Los 18 ORFs restantes mostraron la presencia de un dominio GGDEF como único involucrado en la vía del c-di-GMP. Entre estos se descartó la funcionalidad del dominio GGDEF codificado en *RMET_RS04365*, debido a la sustitución Arg 446 por Tyr 446, residuo determinante en la interacción con los grupos fosfato y la base nitrogenada de la molécula de GTP en el sitio activo de este dominio (Wassmann y cols. 2007). De este modo se predijo la funcionalidad diguanilato ciclasa en 18 proteínas codificadas en el genoma de *C. metallidurans* CH34 (Tabla 3).

3.1.2 Predicción de funcionalidad en fosfodiesterasas tipo EAL codificadas en el genoma de *C. metallidurans* CH34

La búsqueda de dominios EAL codificados en el genoma de *C. metallidurans* CH34 se realizó por análisis de similitud de secuencias aminoacídicas, respecto a la secuencia del dominio EAL presente en la fosfodiesterasa TBD_1265 (PDB:3n3t). Esta búsqueda resultó en 22 alineamientos con un e- value < 0,012; asociados al dominio EAL codificado en 22 ORFs del genoma de *C. metallidurans* (Anexo 2). Al descartar las 12 proteínas híbridas ya mencionadas, se determinó la presencia de un dominio EAL en el producto de 10 ORFs como único dominio involucrado en la vía del c-di-GMP dentro de su estructura (Tabla 4). Al interior de este conjunto, el dominio EAL codificado en *RMET_RS19345* fue predicho como inactivo al exhibir sustituciones Glu 523 Gly, Glu 527 Gly, Gln 584 Ser y Glu 703 Gly, residuos determinantes en la coordinación

Tabla 3. Predicción de la funcionalidad catalítica de dominios GGDEF identificados en el genoma de *C. metallidurans* CH34

ORFs con un dominio GGDEF					
Locus	Replicón	Sitio activo (7 aa)	Sitio Ip ^a (3 aa)	Sitio Is ^b (1 o 2 aa)	Predicción
<i>RMET_RS04365</i>	CHR1	6	0	0	Activo
<i>RMET_RS05490</i>	CHR1	7	3	0	Activo
<i>RMET_RS08460</i>	CHR1	6	1	0	Activo
<i>RMET_RS09375</i>	CHR1	7	3	2	Activo
<i>RMET_RS10905</i>	CHR1	7	3	0	Activo
<i>RMET_RS11180</i>	CHR1	6	2	0	Activo
<i>RMET_RS11270</i>	CHR1	6	0	0	Activo
<i>RMET_RS11355</i>	CHR1	7	0	0	Activo
<i>RMET_RS16170</i>	CHR1	6	3	0	Activo
<i>RMET_RS17815</i>	CHR1	7	1	2	Activo
<i>RMET_RS19450</i>	CHR2	6	0	0	Activo
<i>RMET_RS19900</i>	CHR2	6	1	2	Activo
<i>RMET_RS20545</i>	CHR2	7	3	2	Activo
<i>RMET_RS21415</i>	CHR2	7	3	0	Activo
<i>RMET_RS25835</i>	CHR2	7	0	1	Activo
<i>RMET_RS28515</i>	CHR2	7	0	0	Activo
<i>RMET_RS28900</i>	CHR2	3	0	0	Inactivo
<i>RMET_RS29325</i>	CHR2	7	0	0	Activo

a: Sitio de inhibición primario; b: Sitio de inhibición secundario. Entre paréntesis se describe el número de aminoácidos que constituyen cada sitio.

Tabla 4. Predicción de la funcionalidad catalítica de dominios EAL identificados en el genoma de *C. metallidurans* CH34

ORFs con un dominio EAL			
Locus	Replicón	Sitio activo (10 aa)	Predicción
<i>RMET_RS05485</i>	CHR1	10	Activo
<i>RMET_RS08465</i>	CHR1	9	Activo
<i>RMET_RS19345</i>	CHR2	6	Inactivo
<i>RMET_RS20720</i>	CHR2	10	Activo
<i>RMET_RS21885</i>	CHR2	9	Activo
<i>RMET_RS24820</i>	CHR2	10	Activo
<i>RMET_RS25455</i>	CHR2	9	Activo
<i>RMET_RS26980</i>	CHR2	9	Activo
<i>RMET_RS30310</i>	pMOL30	10	Activo
<i>RMET_RS31035</i>	pMOL28	10	Activo

con uno de los dos iones de Mg^{+2} , necesaria para su actividad catalítica (Tchigvintsev y cols., 2010). En consecuencia, se identificó 9 ORFs que codifican un dominio EAL con características estructurales de una fosfodiesterasa funcional.

3.1.3 Predicción de funcionalidad en proteínas híbridas codificadas en genoma de *C. metallidurans* CH34.

Los análisis bioinformáticos realizados sobre los dominios GGDEF y EAL presente en las 12 secuencias híbridas detectadas, predijeron la bifuncionalidad diguanilo ciclasa/fosfodiesterasa en nueve de ellas (Tabla 5). Las sustituciones Arg 313 His, Asp 327 His, Asn 335 Asp y Arg 359 Glu, sustentaron la predicción del dominio GGDEF codificado en *RMET_RS19120* como catalíticamente inactivo. Por otro lado, las proteínas codificadas en los ORFs *RMET_RS24490* y *RMET_RS29670* fueron predichas como catalíticamente inactivas en base a las sustituciones en ambos dominios. En el caso de *RMET_RS24490* las sustituciones Arg 313 His, Asp 327 His, Asn 335 Asp y Arg 359 Glu en su dominio GGDEF, y las sustituciones Glu 523 Thr, Asn 584 Leu, Glu 616 Val Glu 646 Ser y Glu 703 Arg, en su dominio EAL predijeron la inactividad catalítica de ambos dominios. Similar fue el caso de *RMET_RS29670* cuyas sustituciones Arg 313 Ser, Arg 359 Asp, Asp 370 Gly, y Arg 446 Ala en su dominio GGDEF, y las sustituciones Glu 523 Ala, Arg 527 Pro, Asn 584 Pro, Asp 646 Ser y Glu 703 Thr en su dominio EAL predijeron la inactividad catalítica de ambos dominios (Tabla 3).

En el caso de *RMET_RS29670* la conservación parcial del sitio de inhibición primario en su dominio GGDEF, la conservación parcial del sitio activo de su dominio EAL y su ubicación en el plasmidio pMOL30, asociado a la resistencia a metales, sustentaron la inclusión del producto génico

Tabla 5. Predicción de actividad diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, en proteínas híbridas codificadas en el genoma de *C. metallidurans* CH34.

ORFs con dominios GGDEF y EAL							
		GGDEF			EAL		
Locus	Replicon	Sitio activo (7 aa)	Sitio Ip ^a (3 aa)	Sitio Is ^b (1 o 2 aa)	Predicción	Sitio activo (12 aa)	Predicción
<i>RMET_RS02985</i>	CHR1	7	2	0	Activo	12	Activo
<i>RMET_RS11280</i>	CHR2	4	2	0	Activo	12	Activo
<i>RMET_RS19120</i>	CHR2	3	1	0	Inactivo	12	Activo
<i>RMET_RS20580</i>	CHR2	5	0	0	Activo	11	Activo
<i>RMET_RS24490</i>	CHR2	2	0	0	Inactivo	6	Inactivo
<i>RMET_RS22980</i>	CHR2	7	0	0	Activo	12	Activo
<i>RMET_RS24295</i>	CHR2	7	0	0	Activo	10	Activo
<i>RMET_RS28625</i>	CHR2	7	1	0	Activo	12	Activo
<i>RMET_RS28910</i>	CHR2	6	1	2	Activo	12	Activo
<i>RMET_RS29320</i>	CHR2	6	0	0	Activo	12	Activo
<i>RMET_RS29670</i>	pMOL30	1	1	0	Inactivo	4	Activo
<i>RMET_RS30470</i>	pMOL30	7	2	0	Activo	12	Activo

a: Sitio de inhibición primario, b: Sitio de inhibición secundario

de *RMET_RS29670* como un posible efector de esta vía de señalización en presencia de metales pesados.

En resumen, de las 12 proteínas híbridas codificadas en el genoma de *C. metallidurans* CH34, 9 fueron predichas con dominios GGDEF y EAL activos y sólo una (*RMET_RS19120*) mostró conservación del motivo catalítico presentes en su dominio EAL. Las dos restantes (*RMET_RS24490* y *RMET_RS29670*) fueron predichas como enzimáticamente inactivas en ambos dominios (Tabla 5).

3.1.4 Predicción de funcionalidad en fosfodiesterasas tipo HD-GYP codificadas en el genoma de *C. metallidurans* CH34

El hallazgo de dominios HD-GYP codificados en el genoma de *C. metallidurans* CH34, se realizó mediante búsqueda por similitud respecto a la secuencia aminoacídica del dominio HD-GYP presente en la fosfodiesterasa Bd1817. Esta resultó en un alineamiento con un e- value $\leq 0,003$ que correspondió al dominio HD-GYP codificado en *RMET_RS20080*. La predicción de funcionalidad, basada en la búsqueda de los siete motivos aminoacídicos determinantes en esta actividad catalítica (His 183, Asp 184, His 212, His 237, Glu (His) 238, Asn (Asp) 265, Asn (Arg) 269) estableció la ausencia de His 183, y Asp 184, además de las sustituciones His 212 Pro, His 237 Ser, Glu (His) 238 Gln y Asn (Asp) 265 Glu , sustentando así la predicción de *RMET_RS20080* como un ORF codificante para un dominio HD-GYP catalíticamente inactivo (Anexo 5).

3.1.5 Posibles efectores en la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34

Los análisis descritos permitieron predecir posibles diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas funcionales en *C. metallidurans* CH34, indicando que este microorganismo contaría con los

elementos necesarios para la síntesis y la degradación del c-di-GMP. Como paso siguiente, se analizó la secuencia genómica de *C. metallidurans* CH34 en búsqueda de efectores de esta vía.

Entre los primeros ORFs propuestos como codificantes para efectores de esta vía, se incluyó ORFs codificantes para dominios GGDEF y EAL, predichos como catalíticamente inactivos bajos los criterios de predicción utilizados. Tal fue el caso de las ORFs *RMET_RS04365* y *RMET_RS29670*, que no conservan los aminoácidos de unión a c-di-GMP, característicos en los sitios Ip e Is de este tipo de efectores. Sin bien esto sustentó su descarte como posibles efectores, fueron mantenidas en esta categoría en base a antecedentes ómicos que describen un aumento de 3,2 veces en la expresión de *RMET_RS04365* en el proteoma *C. metallidurans* CH34 frente a la presencia de rocas volcánicas en el medio (Bryce y cols., 2015) y el aumento de abundancia de 2,1 veces del transcrito de *RMET_RS29670* en presencia de cadmio (Monchy y cols., 2007).

Al llevar el foco sobre los dominios EAL inactivos, hasta el momento hay tres efectores conocidos que unen c-di-GMP en su dominio EAL: FimX, LapD y YkuI (Römling y cols., 2013). Dichas proteínas, además de los dominios GGDEF y EAL, poseen otros dominios hacia su extremo amino terminal, involucrados en la transducción de señales vía c-di-GMP. El ORF *RMET_RS19345* codificante para un dominio EAL predicho como inactivo, carece de estas características dado que no posee otros dominios que pudiesen ejercer la transducción de esta unión hacia otros blancos celulares, abarcando su dominio EAL, 516 aa de los 536 aa que constituyen su secuencia aminoacídica. En base a lo anterior y en ausencia de antecedentes de su expresión, se descartó a *RMET_RS19345* como posible efector de esta vía.

Para proseguir en la identificación de efectores de esta vía de señalización en *C. metallidurans* CH34, se efectuaron búsquedas por anotaciones y alineamiento local de secuencia aminoacídicas. El primer efector pesquisado fue PelD, cuyo dominio GGDEF degenerado regula alostéricamente su participación en la biosíntesis del polisacárido PEL en *P. aeruginosa* (Lee y cols., 2007). La búsqueda de anotaciones en el genoma identificó una proteína codificada en

RMET_RS2149 anotada como PelD. Junto con confirmar la relación de homología (I=28,9%; S= 45,8%) el alineamiento global entre ambas secuencias aminoácidas estableció la conservación de 5 de los 6 aminoácidos que determinan la unión al dímero de c-di-GMP en el dominio citoplasmático de este efector (Arg 567, Gli 568, Leu 569, Asp 570, Val 751 y Arg 402) (Whitney y cols., 2012) sólo exhibiéndose la sustitución Ala 568 (Figura 8). Más aún el análisis del contexto génico de *RMET_RS21490* lo ubicó dentro de una organización tipo operón *pelABCD*, característica de esta maquinaria de biosíntesis (Figura 9). Sustentando así la clasificación de la proteína codificada en este ORF (PelD), como efector de la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34.

El segundo efector buscado en *C. metallidurans* CH34 fue el dominio “PilZ” inicialmente caracterizado en la glicosiltransferasa BscA, enzima responsable de la síntesis de celulosa en *G. xylinus* (Amikam y cols., 2006; Morgan y cols., 2014; Jenal y cols., 2017). La búsqueda de anotaciones de dominios PilZ en el genomas de *C. metallidurans* CH34 identificó cuatro ORFs codificantes para dominios PilZ (Tabla 6). Tal como sucede con dominios GGDEF y EAL, es común la existencia de variedades de dominios “PilZ” inactivas en la capacidad de unir c-di-GMP (Römling y cols., 2013). Para analizar la funcionalidad de los dominios PilZ codificados, se analizó la conservación de aminoácidos que componen el motivo de interacción con la molécula de c-di-GMP (“c-di-GMP switch). Se utilizó como referencia en esta predicción las secuencias del dominio PilZ activo (Q9HVI1.1) presente en la proteína PA4608 de *P. aeruginosa* (Guzzo y cols., 2009), y el dominio PilZ inactivo (3DSG_C) presente en la proteína XC1028 de *Xanthomonas campestris* (Habazettl y cols., 2011), ambos dominios con estructura tridimensional resuelta mediante cristalografía en interacción con el segundo mensajero (Figura 10).

```

PelD_(P._aeruginosa_PAO1)/1-455      1 - - - - - MSAHKDFT LAPRASGSVSWVETLVI SALALGLGWFS PDDPLQVNATFPWVI LAPLLGMRYGFVRGLASAA 72
PelD_(C._metallidurans_CH34)/1-487  1 MAKTVETRRQGGIGLGGRYARW LAPAGGGAAAVIEMI VIMAAAMGITWLVLPQNPLLLGMGFPWAWLLPVI LALRYGTLVGVGAVL 87

PelD_(P._aeruginosa_PAO1)/1-455      73 LLVAALFAFRVQGV EAYA QVFAAFIVGVLLCAMLVGEFRDIWERRLERLELANEYRQLRLEDFTRAHHILRISHDRLEQRVAGNDQS 159
PelD_(C._metallidurans_CH34)/1-487  88 ML LGGWFFFD EIGAHS GAFPRMFFMG LLLV L VAGQFGDVWNTRLARARAVNRYLDERLAALTKNHYL LRISHARLENDLLARPTT 173

PelD_(P._aeruginosa_PAO1)/1-455      160 LRSLLGLRQLLREL P - - - GDEAPLDALAE TVLALLAQYGSRLIAGLYRVR YDRTPEPQPLATLGEMPALDADDLLVRTCLERGELV 243
PelD_(C._metallidurans_CH34)/1-487  174 LRDTLSQLRAVALQDAMNGGKSGPL - AGAQPMLQVVAQACQVEGAALYACDGERV - VPNAVASIGPAFEIDVNDPLVRHCLETRALA 258

PelD_(P._aeruginosa_PAO1)/1-455      244 SVRQELLERGEQRAHSALQVCVPLVDTDGRI LALLAVEQMPFFVFNERTFSL LAI LAGHVADLLQSDRLA - - - - - 313
PelD_(C._metallidurans_CH34)/1-487  259 HLRSTGLQQDAQTRYVAV - - - APVLAGSDRLIGVLVVERMPFLSLTYENLQMLMVL MGYADGVEHARAT - - - - - 325

PelD_(P._aeruginosa_PAO1)/1-455      314 - - - - - LQLADIDAQRF SQYLKRSLLDARDHGL - - - PACLYAFELTDARYG - - - - - EEVQC LLE - - - 363
PelD_(C._metallidurans_CH34)/1-487  326 - - - - - HGIQEMAPAIPYAFALDYARLSRLRHETGIQS - - - SVVALVFDLDEARDA - - - - - LFEQVV 378

PelD_(P._aeruginosa_PAO1)/1-455      364 * * * * GSQRGLDVQLRLRNDEGRVLLVLLPLTSAEGSQGYLQRLRLI LFAERFGQARELES LGVRI RQYELDAGNDRQALGHFLFNEC - - - 446
PelD_(C._metallidurans_CH34)/1-487  379 RSRRALDVAVPVRNAH - HRAMLTLMPLSDAQAVSAYLVR IEDMLRAQFGT - - DFSSAHIGVYTL SVPAGEAEEALMR - LLHRCQLDGL 461

PelD_(P._aeruginosa_PAO1)/1-455      447 - - - - - GLNDQQVAI - - - - - 455
PelD_(C._metallidurans_CH34)/1-487  462 ASTITAVQADGTRDASVASAGPARAG 487

```

Figura 8. Alineamiento global de las secuencias aminoácidas PelD de *P. aeruginosa* y *C. metallidurans* CH34. Se destacan con asterisco rojo los residuos determinantes en la unión al dímero de c-di-GMP.

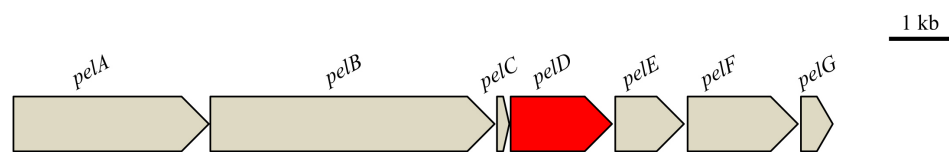


Figura 9. Contexto génico del ORF *RMET_RS21490* codificante para el efector PelD presente en el genoma de *C. metallidurans* CH34. En rojo se destaca *RMET_RS21490*.

Tabla 6. Predicción de la capacidad de unión a c-di-GMP en dominios PilZ codificados en el genoma de *C. metallidurans* CH34.

ORF codificante	Mejor hit de Blast (e-value)	Conservación del "c-di-GMP switch" RxxxR, DxSxxG	Predicción
<i>RMET_RS05745</i>	flagellar brake protein, <i>Cupriavidus</i> sp. HMR-1 (0)	RxxxR, DxSxxG	Activo
<i>RMET_RS08705</i>	cellulose synthase, <i>Cupriavidus</i> sp. SHE (0)	RxxxR, DxSxxG	Activo
<i>RMET_RS09140</i>	pilus assembly protein, <i>Cupriavidus</i> sp. SHE (8 e ⁻⁹³)	n.d./AxxG	Inactivo
<i>RMET_RS11325</i>	cellulose synthase, <i>Cupriavidus</i> sp. SHE (0)	RxxxR S/GxxG	Activo

n. d.: no detectado

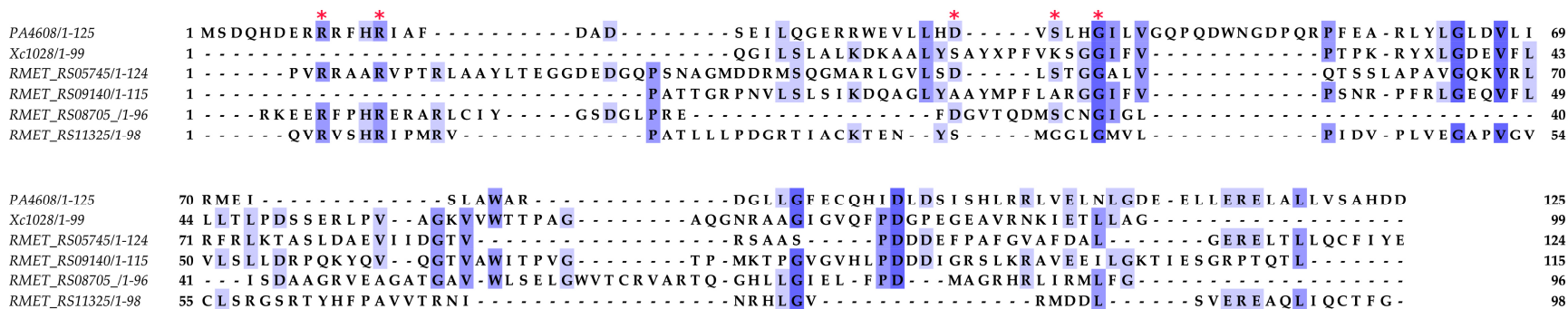


Figura 10. Alineamiento múltiple entre secuencias de dominios PilZ codificados en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Como referencia se utilizaron el dominio PilZ activo de PA4608 y el dominio PilZ inactivo de XC1028. Se destacan en asterisco los aminoácidos que componen el sitio unión a c-di-GMP ("c-di-GMP switch").

La conservación exhibida de los motivos (RxxxR y D/NzSxxG), determinantes en la unión a c-di-GMP, apoya fuertemente esta capacidad en las proteínas codificadas en *RMET_RS05745* y *RMET_RS08705*, al verse conservada la totalidad de los motivos de unión al dinucleótido (Tabla 6). Diferente es el caso de la proteína codificada por *RMET_RS11325*, cuya conservación se mostró parcial en dichos motivos, por lo que su capacidad de unir c-di-GMP sería más incierta. Sin embargo la conservación del su contexto génico dentro del operón responsable de la síntesis de celulosa respaldaría su funcionalidad como proteína homóloga de BscA. *RMET_RS09140* exhibió una baja conservación de los motivos de unión a c-di-GMP, infiriéndose por ello su incapacidad de unir c-di-GMP y por lo tanto su inactividad como efector de esta vía de señalización (Tabla 6).

Dada la proximidad filogenética de *C. metallidurans* y *B. cenocepacia*, y pertenencia a la familia Burkholderiaceae, se incorporó a la búsqueda una proteína homóloga del factor transcripcional Bcam1349 dentro del genoma de *C. metallidurans* CH34, determinante en la formación de biopelículas en *B. cenocepacia* (Fazli y cols., 2011). Una búsqueda vía alineamiento local identificó una secuencia codificada en *RMET_RS18290* (I= 53 %, e value = 7 e -21). El alineamiento global entre ambas secuencias aminoacídicas reveló un alto grado de conservación (I= 47 %, S= 63,2 %) sustentando así la clasificación de la proteína codificada en *RMET_RS18290* como posible efector de la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34 (Anexo 6).

En resumen, el análisis sobre la conservación de motivos aminoacídicos determinantes en la actividad de cada dominio, permitió la identificación de 36 proteínas (17 GGDEF, 9 EAL, 10 GGDEF-EAL) potencialmente activas en la síntesis y degradación de este segundo mensajero (Figura 11). A este grupo se le sumó tres efectores candidatos con dominios PilZ, uno en posesión de dominios GGDEF/EAL con sitios activos degenerados, una proteína homóloga del efector PelD y otra homóloga del factor transcripcional Bcam1349.

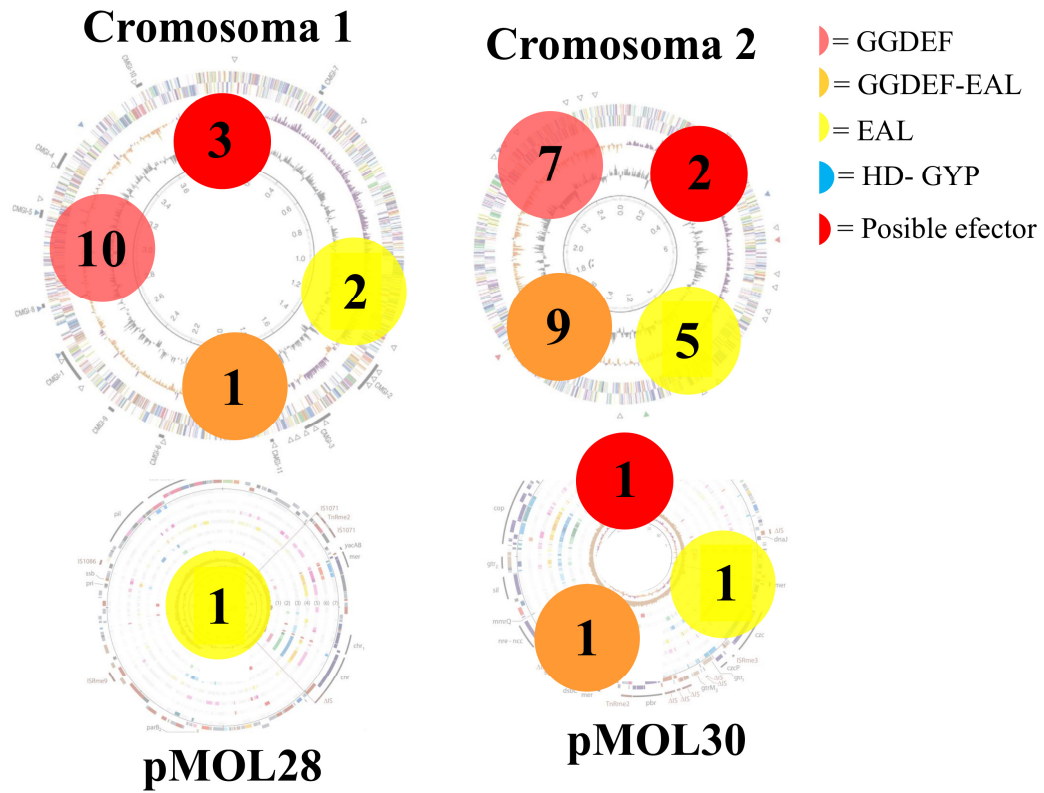


Figura 11. Resumen de la distribución de ORFs predichos con dominios activos en la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34.

El ORF codificante para un dominio HD-GYP (*RMET_RS09120*) en el genoma de *C. metallidurans* CH34, fue descartado de análisis posteriores, dada la ausencia de conservación en motivos determinantes para su actividad fosfodiesterasa.

3.2 Efecto de la presencia de cadmio sobre la formación de biopelículas y la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34

3.2.1 Efecto de cadmio sobre el contenido de EPS en biopelículas cultivadas en su presencia

Para conocer de forma cualitativa la influencia de cadmio sobre el contenido de EPS en las biopelículas de *C. metallidurans* CH34, se sembró suspensiones celulares sobre medios sólidos suplementados con Rojo Congo a diferentes concentraciones del metal. El desarrollo de “macrobiopelículas” sobre la superficie de este medio permitió la tinción de las EPS generadas con Rojo Congo. De esta manera fue posible establecer un efecto inhibitorio, y dosis dependiente, del cadmio sobre el contenido de EPS de macrobiopelículas de *C. metallidurans* CH34 (Figura 12).

3.2.2 Efecto de cadmio en la formación de biopelículas en *C. metallidurans* CH34

Se montó un ensayo para cuantificar la formación de biopelículas en etapas tempranas (O' Toole y Kolter 1998) de *C. metallidurans* CH34 a diferentes concentraciones de cadmio. Para descartar un sesgo por muerte celular en la interpretación de estos resultados, se determinó la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en la fracción plantónica como medida de viabilidad celular. El resultado obtenido replicó el efecto inhibitorio y dosis dependiente de cadmio sobre la formación de biopelículas descrito en la sección 3.2.1 (Figura 13).

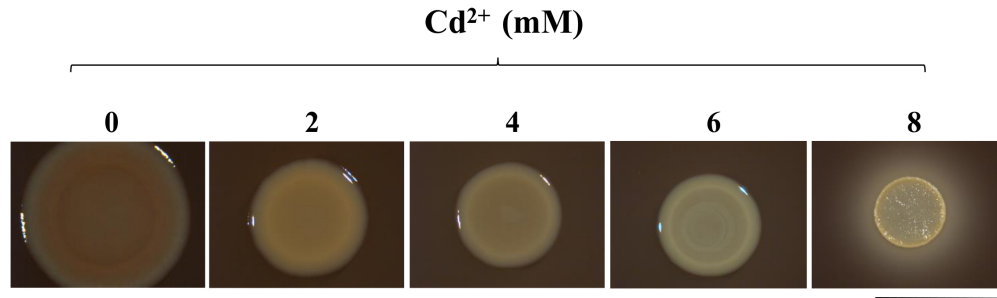


Figura 12. Efecto del cadmio sobre el contenido de EPS en macrobiopelículas de *C. metallidurans* CH34. Coloración proporcional al contenido de EPS presente en cada matriz. Cultivos en medio LB libre de NaCl suplementados con Rojo Congo. Incubaciones de 5 días a temperatura ambiente en oscuridad. Imagen representativa de tres experimentos independientes. Barra: 1 cm.

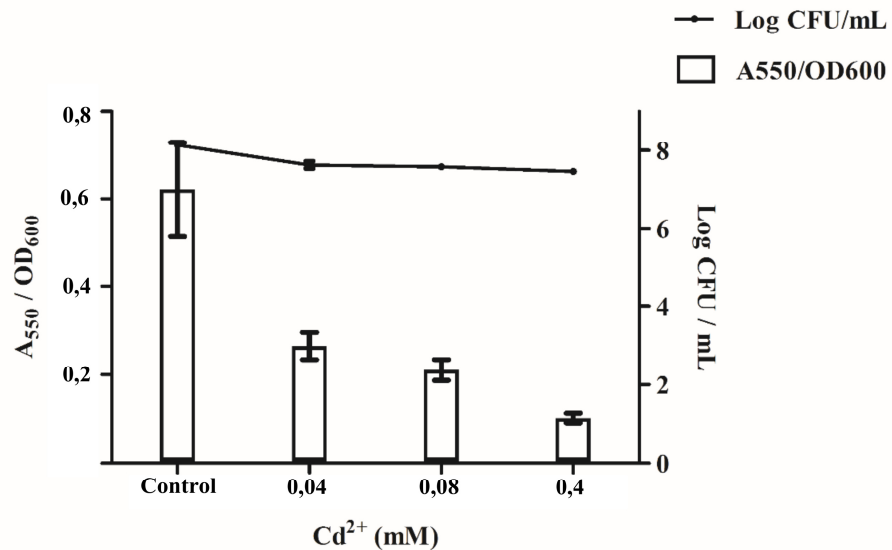


Figura 13. Efecto del cadmio sobre la formación de biopelículas de *C. metallidurans* CH34. Las barras corresponden a datos de absorbancia obtenidos a partir de la resolubilización del colorante Cristal Violeta retenido en la biomasa adherida. Las líneas corresponden a datos de viabilidad celular de la fracción plantónica de cada cultivo. Resultados de incubaciones estáticas por 15 h a 30 °C. Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes ± dS.

El cadmio no tuvo efecto significativo en la viabilidad celular de *C. metallidurans* CH34 dentro del rango de concentraciones evaluado (Figura 13), dando cuenta de la existencia de un proceso fisiológico de inhibición en la formación de biopelículas en presencia de cadmio en el medio.

3.2.3. Caracterización de macrobiopelículas generadas por cepas de *C. metallidurans* carentes de plasmidios asociados a la resistencia a metales pesados.

Con el objetivo de conocer el efecto de la pérdida de los plasmidios pMOL28 y pMOL30, se caracterizó las macrobiopelículas en cepas curadas de *C. metallidurans* de uno o ambos plasmidios (Tabla 2). Para ello, suspensiones celulares de cada cepa fueron sembradas en medio sólido suplementado con Rojo Congo. Las macrobiopelículas de la cepa AE104, curada de pMOL28 y pMOL30, mostraron un fenotipo carente de EPS y con una mayor proporción de espacios vacíos en su interior, indicando con ello diferencias cualitativas en la composición de su matriz exopolimérica (Figura 14).

3.2.4 Comparación de la susceptibilidad a cadmio entre células platónicas y biopelículas de *C. metallidurans* CH34

Los resultados presentados en las secciones 3.2.1 y 3.2.2 mostraron un efecto inhibitorio de cadmio sobre el estilo de vida sésil, formador de biopelículas.

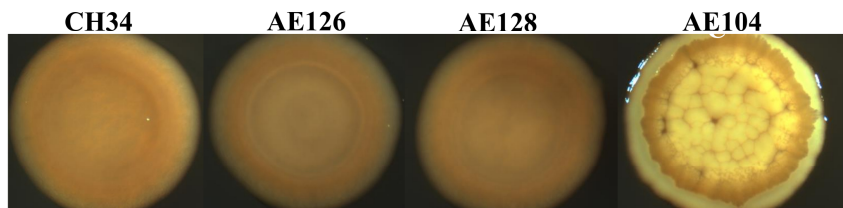


Figura 14. Fenotipos en agar LB Rojo Congo de *C. metallidurans* CH34 y cepas derivadas. Las macrobiopelículas se documentaron a los 5 días de crecimiento a 30°C en medio LB agar Rojo Congo.

Convencionalmente las biopelículas son consideradas estructuras de resistencia al efecto tóxico de los metales pesados. En vista de los resultados anteriores se comparó la susceptibilidad a cadmio entre células plantónicas y biopelículas de *C. metallidurans* CH34. Estos ensayos se llevaron a cabo en el sistema “Calgary Biofilm Device” (Ceri y cols., 1999, Harrison y cols., 2010), diseñado originalmente para la susceptibilidad a compuestos antimicrobianos entre la fracción plantónica y sésil de un mismo cultivo (Figura 6). No se observó diferencias significativas de susceptibilidad a cadmio entre células plantónicas y biopelículas de *C. metallidurans* CH34 (Figura 15).

3.3 Efecto de la exposición a cadmio sobre los niveles de c-di-GMP en células plantónicas y biopelículas

Una vez establecida la presencia de componentes de una vía de señalización de c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34 mediante predicciones *in silico* y determinados los efectos fenotípicos de la presencia de cadmio en la formación de biopelículas en esta bacteria se procedió a determinar el efecto de la presencia del cadmio en los niveles intracelulares de c-di-GMP. Para ello se obtuvieron extractos nucleotídicos de células sometidas al mismo modelo experimental establecido en 3.2, en los que se determinó la concentración de c-di-GMP por HPLC-MS.

Se estableció que tanto células plantónicas como biopelículas de *C. metallidurans* CH34 expuestas a cadmio 2 mM, disminuyeron de forma significativa los niveles intracelulares de c-di-GMP, resultado que se correlaciona con el efecto inhibitorio de este metal pesado sobre la formación de biopelículas de esta bacteria descrito en las secciones 3.2.1 y 3.2.2 (Figura 16).

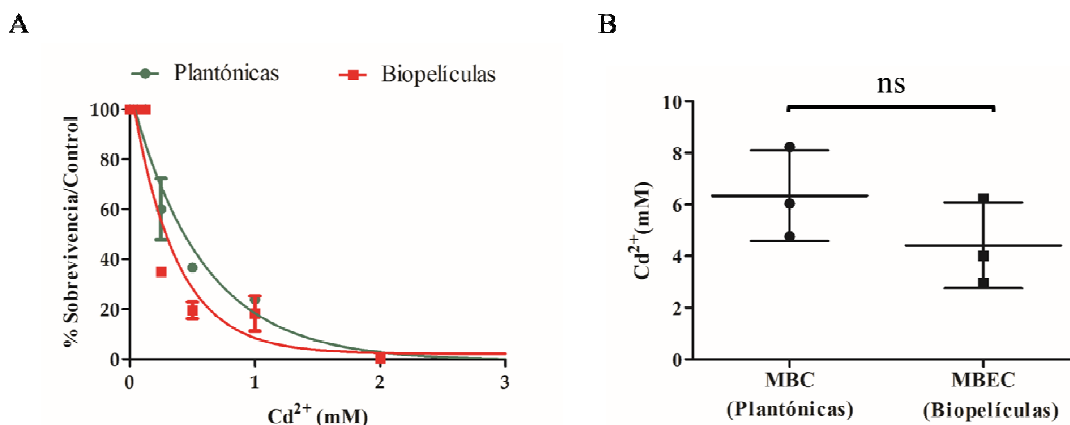


Figura 15. Comparación de la susceptibilidad a cadmio entre células plantónicas y biopelículas de *C. metallidurans* CH34. A) Se evaluó el número de UFC recuperadas desde cada fracción en cultivos con 20 h de incubación a diferentes concentraciones de cadmio. Se muestran los valores promedio de tres experimentos independientes \pm dS. Valores normalizados respecto a la condición control. Los datos experimentales obtenidos fueron sometidos a una regresión no lineal, obteniendo así dos curvas de caída exponencial (líneas). B) Parámetros de susceptibilidad a cadmio obtenidos de interpolaciones al 0,01 % de sobrevivencia, bajo los parámetros de la ecuación de cada curva exponencial obtenida. Se muestran los valores calculados dentro de un intervalo de confianza del 95 % definido por las variaciones entre los parámetros que describieron cada curva exponencial. La significancia de las diferencias entre los valores de MBC y MBEC obtenidos fue evaluada mediante test de t de student. ns: no significativa.

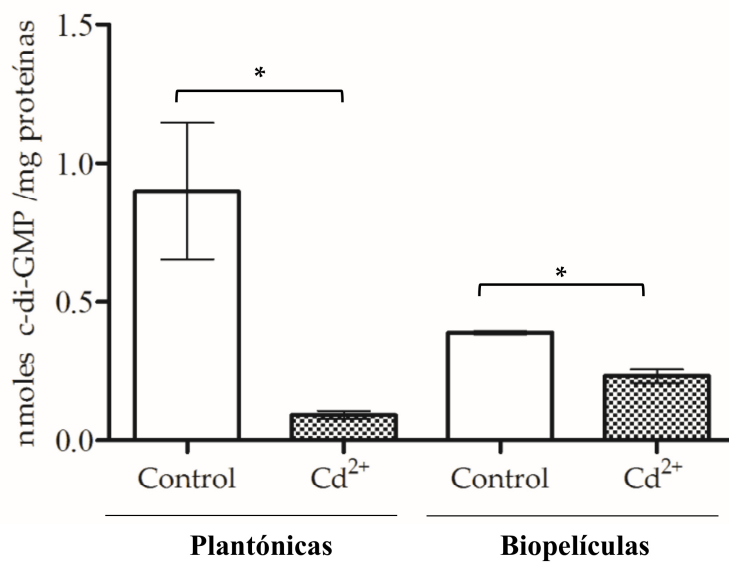


Figura 16. Efecto de la exposición a cadmio en los niveles celulares de c-di-GMP en células plantónicas y biopelículas. Se muestran los resultados promedios de tres réplicas biológicas \pm dS. Los símbolos representan los grados de significancia de las diferencias evaluadas mediante test de t de student. *: $p \leq 0.5$. ns: sin diferencias significativas.

3.4 Efecto de la exposición a cadmio en transcritos involucrados en la vía del c-di-GMP

***C. metallidurans* CH34**

Se estableció un sub conjunto de ORFs involucrados en la vía del c-di-GMP, con rol potencial en la respuesta a cadmio en *C. metallidurans* CH34 en base a tres criterios: i) contexto génico asociado a la resistencia metales o formación de biopelículas, ii) presencia de dominios accesorios vinculados a la detección de señales ambientales en las secuencias aminoacídicas que codifican, iii) homología con proteínas funcionalmente caracterizadas en *E. coli* o *P. aeruginosa*, modelos de estudio para esta vía de señalización.

3.4.1 Análisis del contexto génico en los genes involucrados en la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34

Dada la escasa disponibilidad de antecedentes sobre proteínas asociadas a esta vía de señalización que estén involucradas en la respuesta a metales pesados, se indagó en los contextos génicos de cada ORF codificante para dominios que fueron predichos como catalíticamente activos el metabolismo del c-di-GMP. Como resultado de esta búsqueda 7 ORFs se ubicaron en contextos relacionados a la resistencia a metales, a la formación de biopelículas y a respuestas quimiotácticas (Figura 17).

El primero de ellos corresponde al ORF *RMET_RS30470*, que codifica una proteína híbrida río abajo de *nccCBA*, agrupación genética silente ubicada al interior de la isla genómica “*cop-sil-nre-ncc*” del plasmidio pMOL30, del cual existen antecedentes de microarreglos que describen su aumento en 2,5 veces en presencia de cadmio (Monchy y cols., 2007).

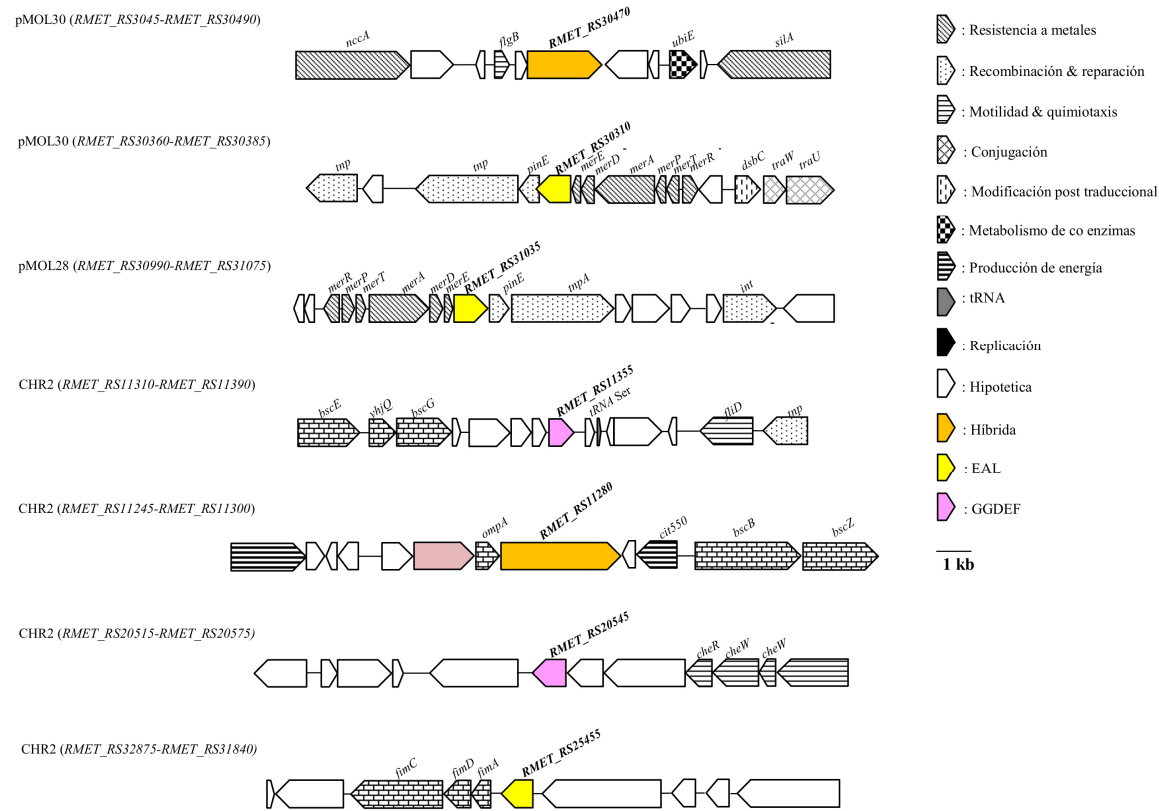


Figura 17. Conjunto de ORFs asociados al metabolismo del c-di-GMP con contextos génicos destacados en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Representación a escala de genes y regiones intergénicas. *nccA*: resistencia a níquel y cobalto, *flgB*: rotor flagelar, *ubiE*: metiltransferasa, *silA*: resistencia a plata, *repA*: proteína de replicación, *tnp*: transposasa, *pinE*: resolvasa, *merR*: regulador transcripcional, *merP*: proteína periplásmica de unión a mercurio, *merT*: transporte mercurio, *merA*: mercurio reductasa, *merD*: represor transcripcional de resistencia a mercurio, *merE*: transporte de mercurio *urf2*: “unknow related function”, *bcsG*: síntesis de celulosa, *bcsZ*: síntesis de celulosa, , *yhjQ*: celulosa sintasa, *bcsE*: síntesis de celulosa, *ompA*: biogénesis de envoltura celular, *cit550*: citocromo c550, *fliD*: freno del motor flagelar, *cheR*: metilasa/quimiotaxis, *cheW*: quinasa/quimiotaxis, *fimA*: sub-unidad de fimbria, *fimD*: chaperona de membrana externa, *fimC*: chaperona de fimbrias. *RMET_RS30310* sobrelapa con *pinE* en 94 nucleótidos.

El segundo caso lo constituye *RMET_RS30310*, ubicado dentro del operón de resistencia a mercurio asociado al transposón Tn4378, entre los genes *merE* y su recombinasa asociada, marco de lectura con el cuál se sobrepone en una región de 94 nt (Figura 17). El tercer caso fue el ORF *RMET_RS31035* que replicó la ubicación de *RMET_RS30310* en el operón de resistencia a mercurio, en este caso asociado al transposón Tn4380 en el plasmidio pMOL28, pero sin sobrepone su marco de lectura. El cuarto correspondió al ORF *RMET_RS11355*, que codifica una diguanilato ciclasa río abajo de una organización tipo operón “*bsc*”, responsable de la síntesis de celulosa. Por otro lado *RMET_RS11280*, codificante para una proteína híbrida, se ubicó río arriba de este operón. El sexto contexto destacado lo exhibió el gen *RMET_RS25455*, que codifica una fosfodiesterasa río abajo de la agrupación genética *fimADC*, que es responsable de la síntesis de fimbrias. El séptimo y último contexto destacado fue el gen *RMET_RS20545*, que codifica una proteína híbrida río abajo de una agrupación genética asociada a la regulación de quimiotaxis (Figura 17).

3.4.2 Análisis de los dominios accesorios identificados

La determinación de la arquitectura de dominios en cada una de las proteínas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34 permitió identificar la presencia de distintas familias de dominios accesorios en las secuencias analizadas.

Dominios accesorios específicos se presentaron sólo en ciertos componentes del metabolismo del c-di-GMP. Tal fue el caso de los dominios periplásmicos de transducción de señales

ambientales “HAMP” y de los dominios sensores de señales extracelulares “CACHE”, presentes exclusivamente en diguanilato ciclasas (Figura 18). Otro caso fueron los dominios “CBS”, sensibles a cambios de fuerza iónica (Biemans-Oldehinke y cols. 2006), identificados sólo en proteínas híbridas.

También se presentaron dominios accesorios presentes de forma única. Tal fue el caso del dominio asociado a respuestas quimiotácticas “Tar_Tsr”, presente en la diguanilato ciclasa codificada en *RMET_RS08460* (Tajima y cols., 2011). Otro fue el dominio “HisK”, característico de histidina kinasas (Willet y Kirby 2012), identificado en la diguanilato ciclasa codificada en *RMET_RS28515*. Se describió también el dominio sensor de ligandos extracelulares “MHYT” (Galperin y cols. 2001) en la proteína híbrida codificada en el gen *RMET_RS22980*. Por último se describió un dominio “GAF” en la proteína híbrida codificada en el gen *RMET_RS11280*, descrito con afinidad por c-di-GMP y como regulador de la actividad fosfodiesterasa (Ho y cols., 2000; Heikaus y cols., 2009). El dominio de inhibición “CSS” (Hengge y cols., 2016) se presentó en dos fosfodiesterasas codificadas en los ORFs *RMET_RS05485* y *RMET_RS26980*. De la misma forma el dominio “DUF3030”, de función desconocida, se presentó en el extremo carboxilo terminal de las fosfodiesterasas codificadas en los genes *RMET_RS30310* y *RMET_RS31035*.

Otros dominios accesorios se presentaron de forma transversal entre componentes del metabolismo del c-di-GMP. Este fue el caso de los dominios sensores de gases “Per-Arnt- Sim” (PAS) (Henry y Crosson 2011), presente en cinco diguanilato ciclasas y en ocho proteínas híbridas, conformándose como la familia de dominios accesorios más representativa en las proteínas analizadas. Finalmente se identificó dos dominios receptores de fosforilación “REC”, en la diguanilato ciclasa codificada en *RMET_RS20545* y en la fosfodiesterasa *RMET_RS20720*.

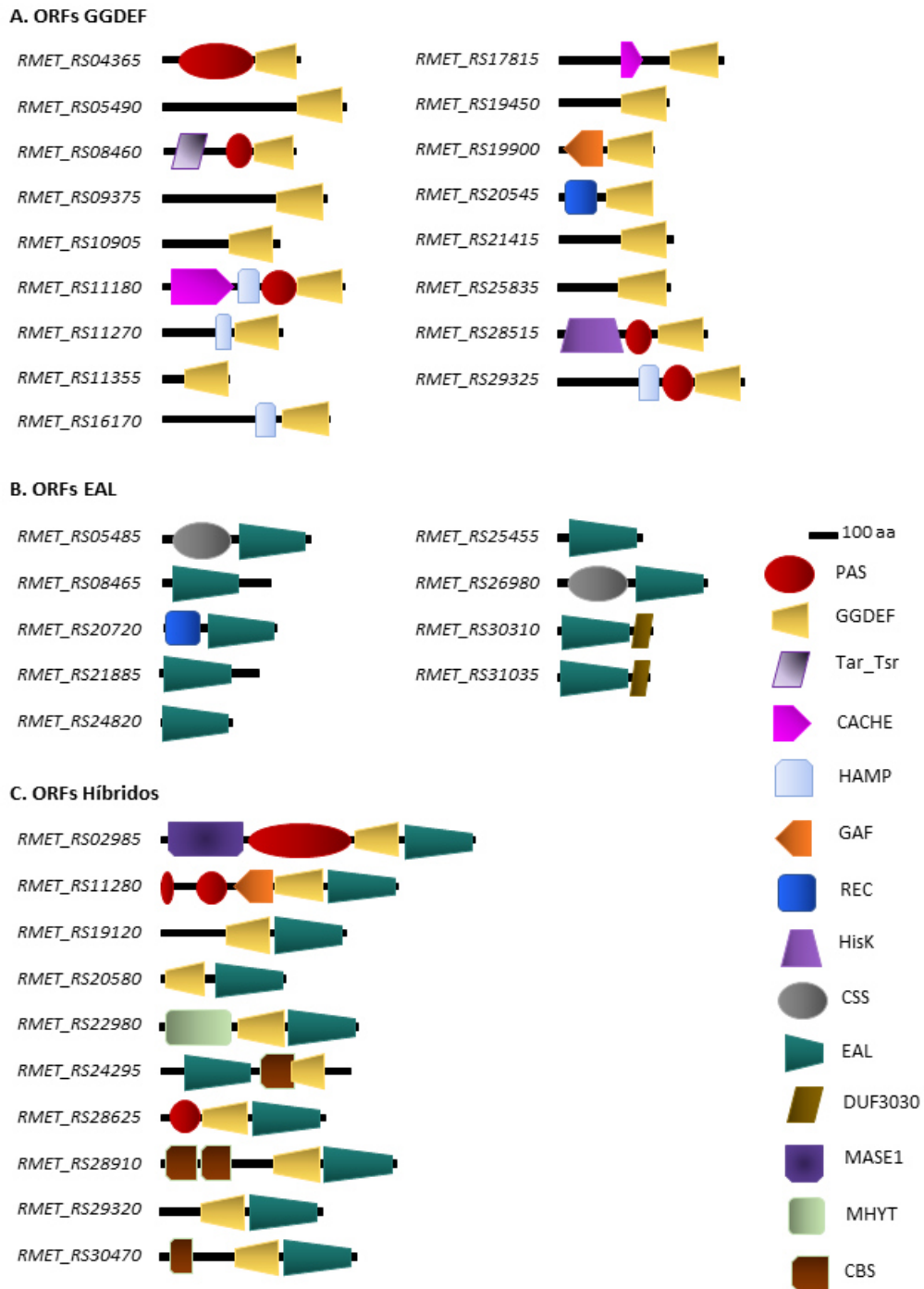


Figura 18. Arquitectura de dominios de enzimas predichas como catalíticamente activas en el metabolismo del c-GMP en *C. metallidurans* CH34.

3.4.3 Búsqueda de homología entre proteínas asociadas al metabolismo del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34, *E. coli* K12 y *P. aeruginosa* PAO1

La búsqueda de proteínas homólogas del metabolismo del c-di-GMP de *C. metallidurans* CH34 en *E. coli* K12 y *P. aeruginosa*, identificó 9 secuencias de alta identidad entre estos genomas, de las cuales 7 corresponden a proteínas con función conocida (Tabla 7). El primer caso corresponde a la secuencia aminoacídica codificada por *RMET_RS09375*, ortóloga de la diguanilato ciclasa YedQ, involucrada en la regulación de la síntesis de celulosa, adherencia y motilidad de *E. coli* (Sommerfeldt y cols., 2009; Sánchez - Torres y cols., 2011). El segundo fue la proteína codificada por *RMET_RS11270* y la diguanilato ciclasa TpbB, promotora del polisacárido Pel en biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 (Ku y cols., 2015; Liang y cols., 2015). El tercer caso, fue la homología exhibida entre la proteína codificada en el ORF *RMET_RS19900* y la diguanilato ciclasa YeaP, promotora de la expresión de proteínas del curli de *E. coli* (Sommerfeldt y cols., 2009). Entre las proteínas híbridas, el cuarto caso de homología se evidenció entre la secuencia aminoacídica asociada a *RMET_RS22980* y la proteína bifuncional (fosfodiesterasa y diguanilato ciclasa) MucR, cuyo rol se ha descrito como determinante en la dispersión de biopelículas de *P. aeruginosa* (Li y cols., 2013). El quinto caso lo constituyó la proteína codificada en *RMET_RS05485* y la fosfodiesterasa de *E. coli* YjcC, recientemente caracterizada por su dominio de inhibición “CSS” (Hengge y cols., 2016). El sexto se reveló entre la proteína codificada en *RMET_RS20720* y la fosfodiesterasa modelo RocR, que regula la expresión de la maquinaria de síntesis de fimbrias y genes de virulencia en *P. aeruginosa* PAO1 (Rao y cols., 2008).

Tabla 7. Análisis de homología en proteínas asociadas al metabolismo del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34, con proteínas codificadas en los genomas de *E. coli* K12 y *P. aeruginosa* PAO1. Se destacan en negrita las secuencias homólogas entre los genomas revisados.

Productos génicos de <i>C. metallidurans</i> CH34		Posibles productos génicos homólogos				
Locus	Arquitectura de dominios (aa)	Secuencia de referencia	Organismo	Función	% Id	Arquitectura de dominios (aa)
ORF GGDEF						
<i>RMET_RS04365</i>	PAS-GGDEF(492)	MorA	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	DGC-PDE	73	BaeS-PAS-GGDEF-EAL (1415)
<i>RMET_RS05490</i>	GGDEF (653)	NP_251560.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	33	GGDEF (525)
<i>RMET_RS08460</i>	Tar_Tsr-PAS-GGDEF (546)	NP_249266.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	44	PBP-PAS-PAS-PAS-GGDEF-EAL (1245)
<i>RMET_RS09375</i>	GGDEF (586)	YedQ	<i>E. coli</i> K12	DGC	27	GGDEF (558)
<i>RMET_RS10905</i>	GGDEF (416)	AID76695.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	43	DNAPolIII- SMCN-GGDEF (671)
<i>RMET_RS11180</i>	CACHE-HAMP-PAS-GGDEF (654)	EHS35231.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	30	CHASE-HAMP-PAS-GGDEF (638)
<i>RMET_RS11270</i>	HAMP-GGDEF (426)	TpbB	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	DGC	55	HAMP-GGDEF (435)
<i>RMET_RS11355</i>	GGDEF (237)	AID76049.1	<i>E. coli</i> K12	DGC	42	REC-REC-GGDEF (542)
<i>RMET_RS16170</i>	HAMP-GGDEF (599)	NP_251560.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	45	GGDEF (525)
<i>RMET_RS17815</i>	CACHE-GGDEF (587)	YedQ	<i>E. coli</i> K12	DGC	27	GGDEF (558)
<i>RMET_RS19450</i>	GGDEF (392)	NP_250418.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	37	MHYT- GGDEF (685)
<i>RMET_RS19900</i>	GAF-GGDEF (338)	YeaP	<i>E. coli</i> K12	DGC	41	GAF-GGDEF (341)
<i>RMET_RS20545</i>	REC-GGDEF (335)	EHS43875.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	72	REC-GGDEF (347)
<i>RMET_RS21415</i>	GGDEF (409)	AID74892.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	DGC	44	REC-GGDEF (347)
<i>RMET_RS25835</i>	GGDEF (400)	WP_077873855.1	<i>E. coli</i> K12	Hyp	35	GGDEF (252)
<i>RMET_RS28515</i>	HisK-PAS-GGDEF (530)	NP_252391.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	35	REC-REC-GGDEF (347)
<i>RMET_RS29325</i>	HAMP-PAS-GGDEF (662)	NP_249266.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	30	PBP-PAS-PAS-PAS-GGDEF (1245)
ORF EAL						
<i>RMET_RS05485</i>	CSS-EAL (530)	YJcC	<i>E. coli</i> K12	PDE	33	CSS-EAL (516)
<i>RMET_RS08465</i>	EAL (385)	MucR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	33	MHYT-GGDEF-EAL (685)
<i>RMET_RS20720</i>	REC-EAL (404)	RocR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	30	REC-EAL (392)

Continuación de la Tabla 7...

<i>RMET_RS21885</i>	EAL (353)	AID75563.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	33	GGDEF-EAL (687)
<i>RMET_RS24820</i>	EAL (254)	AID74466.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	42	EAL-CBS-GGDEF (582)
<i>RMET_RS25455</i>	EAL (298)	MorA	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	36	HisK-PAS-GGDEF- EAL (1415)
<i>RMET_RS26980</i>	CSS-EAL (529)	YJcC	<i>E. coli</i> K12	PDE	34	CSS-EAL (516)
<i>RMET_RS30310</i>	EAL-DUF3030 (333)	MorA	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	45	HisK-PAS-GGDEF- EAL (1415)
<i>RMET_RS31035</i>	EAL-DUF3030 (329)	MorA	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	45	HisK-PAS-GGDEF- EAL (1415)
ORF GGDEF-EAL						
<i>RMET_RS02985</i>	MASE-PAS-GGDEF-EAL (1121)	NP_249872.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	47	PAS-PAS-GGDEF- EAL (1120)
<i>RMET_RS11280</i>	PAS-PAS-GAF-GGDEF-EAL (850)	DosP	<i>E. coli</i> K12	PDE	32	PAS-PAS-GGDEF - EAL (799)
<i>RMET_RS19120</i>	GGDEF-EAL (660)	AID74522.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	33	MHYT-GGDEF-EAL (726)
<i>RMET_RS20580</i>	GGDEF-EAL (441)	AID75563.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	39	GGDEF-EAL (687)
<i>RMET_RS22980</i>	MHYT-GGDEF-EAL (709)	MucR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	65	MHYT-GGDEF-EAL (685)
<i>RMET_RS24295</i>	EAL-CBS-GGDEF (676)	WP_079279815.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	34	EAL-CBS-GGDEF (601)
<i>RMET_RS28625</i>	PAS-GGDEF-EAL (589)	MucR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	42	MHYT-GGDEF-EAL (685)
<i>RMET_RS28910</i>	CBS-CBS-GGDEF-EAL (839)	NP_249266.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	PDE	48	PBP - PAS - GGDEF-EAL (1245)
<i>RMET_RS29320</i>	GGDEF-EAL (581)	AID74522.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	41	MHYT-GGDEF-EAL (726)
<i>RMET_RS30470</i>	CBS-GGDEF-EAL (705)	AID71820.1	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Hyp	40	PBP-PAS-PAS-PAS-GGDEF-EAL (1245)

a: Proteínas con función determinada experimentalmente, fueron identificadas por su nombre

3.4.4 Análisis de identidad y conservación entre las proteínas codificadas en *RMET_RS30310* y *RMET_RS31035*

Los resultados de las secciones 3.1.4, 3.1.5 y 3.1.6 revelaron que *RMET_RS30310* y *RMET_RS31035* codifican para proteínas de 333 y 329 aa respectivamente. Se predijo también la presencia de un dominio EAL en ambas secuencias, compartiendo además la misma arquitectura de dominios, compuesta por un dominio accesorio de función desconocida (DUF3030) ubicado en su extremo carboxilo terminal. Más aún, ambos ORFs comparten el mismo contexto génico dentro de los operones *mer* Tn4378 y Tn4380. La reunión de estas características motivaron determinar el grado de identidad entre las proteínas codificadas por un alineamiento global de sus secuencias. Como resultado se determinó un alto grado de identidad y conservación entre ambas (I= 91,5 % y S= 92,1 %), concentrándose las diferencias en los extremos carboxilo terminal (Figura 19). Pese a estas discrepancias el grado de identidad entre sí, permitió clasificarlas como proteínas homólogas.

Para ahondar en la caracterización de esta proteína en otros genomas, se realizó una búsqueda usando la “herramienta conservación de arquitecturas” (CDART) (Geer y cols., 2002) disponible en NCBI.

Como resultado se determinó su presencia en 225 genomas de proteobacterias, bajo el nombre “Urf2” o “DUF3330 domain-containing protein”, ubicándose sin excepción en el mismo contexto dentro operones *mer* de la familia Tn21/Tn501. La búsqueda de antecedentes en la literatura reveló su temprana descripción como integrante del operón *mer* Tn501 (Brown y cols., 1986), de función no descrita (Liebert y cols., 1999), y mencionado a la fecha como un componente de función elusiva en el operón de resistencia mercurio (El Mouali y cols., 2017). Como resultado de estos análisis se decidió denominar a *RMET_RS30310* como “*urf2.1*” y a *RMET_RS31035* como “*urf2.2*”.

Como resumen de los resultados obtenidos en la sección 3.1 se propuso un sub conjunto de 27 ORFs (21 asociados al metabolismo y 6 a posibles efectores del c-di-GMP), posiblemente


```

RMET_RS30310/1-333 1 MSAFRPDGWTTPELAQAVERGQLELHYQPVVDLRSGGIVGAEALLRWRHPTLGLLPPGQFLPVVSSGLMPEIGAWVLGEACQMRDWRMLAWRP 95
RMET_RS31035/1-329 1 MSAFRPDGWTTPELAQAVERGQLELHYQPVVDLRSGGIVGAEALLRWRHPTLGLLPPGQFLPVVSSGLMPEIGAWVLGEACQMRDWRMLAWRP 95

RMET_RS30310/1-333 96 FRLAVNVSASQVGPDDFDGWVKGVLADAELPAEYLEIELTESVAFGDPAIFPALDALRQIGVRFAADDFGTGYSCLQHLKCCPISTLKIDQSFVAG 190
RMET_RS31035/1-329 96 FRLAVNVSASQVGPDDFDGWVKGVLADAELPAEYLEIELTESVAFGDPAIFPALDALRQIGVRFAADDFGTGYSCLQHLKCCPISTLKIDQSFVAG 190

RMET_RS30310/1-333 191 LANDRRDQTI VHTVIQLAHGLGMDVVAEGVETSASLDLLROADCDTGOGFLFAKPMPIAAFAVAVFSQWRGATMNASDSTTTSCCVCKEIPLDAA 285
RMET_RS31035/1-329 191 LANDRRDQTI VHTVIQLAHGLGMDVVAEGVETSASLDLLROADCDTGOGFLFAKPMPIAAFAVAVFSQWRGATMNASDSTTTSCCVCKEIPLDAA 285

RMET_RS30310/1-333 286 FTPEGAEYVEHF CGL ECYQRF EAQA HRLRPRQQLRPEPRTAARTDFGG 333
RMET_RS31035/1-329 286 FTPEGAEYVEHF CGL ECYQRF EARAK - - - TGNETDADP - NACDSLPSD 329

```

Figura 19. Alineamiento global entre las secuencias aminoacídicas codificadas en *RMET_RS30310* (*urf2.1*) y *RMET_RS31035* (*urf2.2*). Entre ambas secuencias hay una identidad del 91,5 % y una similitud del 92,1 %.

involucrados en la respuesta a cadmio y la formación de biopelículas en *C. metallidurans* CH34 (Tabla 8).

3.5 Efecto del cadmio en la abundancia de transcritos asociados a la vía del c-di-GMP

En una primera etapa, el grupo de ORFs de interés se compuso en 20 ORFs definidos en base a análisis de similitud de secuencias por alineamiento local, posesión de dominios transmembrana y contexto génico (Anexo 7), grupo del que se excluyó 4 ORFs (*RMET_RS02985*, *RMET_RS08460*, *RMET_RS11180*, *RMET_RS20720* y *RMET_RS24820*) que posteriormente fueron incorporados en otros ensayos posteriores.

3.5.1 Análisis semi cuantitativo de un sub conjunto de transcritos asociados a la vía del c-di-GMP en presencia de cadmio por RT-PCR

Para evaluar la expresión efectiva de los ORFs identificadas en presencia de cadmio, se realizó un estudio por RT-PCR de transcripción reversa en células expuestas a cadmio 2 mM (50 % del MIC) por 45 min. Los resultados se obtuvieron a partir de RNA obtenido de cultivos en fase exponencial (10 h), en fase exponencial tardía (13 h) y fase estacionaria (16 h) para evaluar la influencia de la fase de crecimiento en esta respuesta (Anexo 8). Se comparó estos resultados con biopelículas crecidas y tratadas en condiciones equivalentes (Anexo 9). Como controles de expresión basal se utilizaron los genes *gyrB*, codificante para la sub unidad beta de la DNA girasa y *rpoZ*, codificante para la sub unidad omega de la RNA polimerasa II. Como control positivo de exposición a cadmio se analizó la intensidad de la banda del amplicón asociado al gen *cadA*, bomba de eflujo de cadmio dependiente de ATP.

Tabla 8. Subconjunto de ORFs asociados al metabolismo del c-di-GMP candidatos a jugar un rol en la respuesta a cadmio y la formación de biopelículas de *C. metallidurans* CH34.

GGDEF	Criterio^a
<i>RMET_RS08460</i>	Dominio Tar_Tsr
<i>RMET_RS09375</i>	<i>yedQ</i>
<i>RMET_RS11180</i>	Dominio HAMP
<i>RMET_RS11270</i>	<i>tpbB</i>
<i>RMET_RS11355</i>	Contexto " <i>bsc</i> "
<i>RMET_RS19900</i>	<i>yeaP</i>
<i>RMET_RS20545</i>	Contexto " <i>che</i> "
<i>RMET_RS29325</i>	Dominio HAMP
EAL	Criterio
<i>urf2</i>	Contexto " <i>mer</i> "
<i>RMET_RS05485</i>	<i>yjcC</i>
<i>RMET_RS20720</i>	<i>rocR</i>
<i>RMET_RS25455</i>	Contexto " <i>fim</i> "
<i>RMET_RS26980</i>	<i>yjcC</i>
GGDEF-EAL	Criterio
<i>RMET_RS02985</i>	Dominio MASE1
<i>RMET_RS11280</i>	Contexto " <i>bsc</i> "
<i>RMET_RS22980</i>	<i>mucR</i>
<i>RMET_RS24295</i>	Dominio CBS
<i>RMET_RS28910</i>	Dominio CBS
<i>RMET_RS30470</i>	Dominio CBS
Efectores	Criterio
<i>RMET_RS08705</i>	PilZ
<i>RMET_RS05745</i>	PilZ
<i>RMET_RS11325</i>	PilZ
<i>RMET_RS21490</i>	<i>pelD</i>
<i>RMET_RS29670</i>	GGDEF & EAL inactivos
<i>RMET_RS18290</i>	<i>bcam1349</i>

a: ORF homólogos de función conocida fueron representados por su nombre. Tas_Tsr: Dominio citoplasmático de unión a ligandos, asociado a quimorreceptores. **HAMP:** Dominio de membrana, sensor de señales extracelulares. **CBS:** Dominio sensible a cambios de fuerza iónica en citoplasma. **PilZ:** Dominio de unión a c-di-GMP.

En estas condiciones se evaluó las intensidades de banda de amplicones correspondientes a un grupo de 18 ORFs. Como resultado no fue posible apreciar diferencias cualitativamente significativas en las respuestas transcriptómicas exhibidas entre los tres tiempos de incubación ensayados (Anexo 9).

A la luz de este resultado se decidió enfocar los análisis en cultivos con 13 h de incubación, tiempo que permite la generación de biomasa suficiente para la extracción de RNA en biopelículas y al mismo tiempo la cosecha en paralelo de células plantónicas aún en fase exponencial (tardía), (Anexo 8).

En este contexto, la mayoría de los ORFs involucrados en la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34 exhibieron una disminución en su expresión producto del tratamiento en células plantónicas como en biopelículas (Tabla 9). Excepción a ello fue el transcrito codificante para la PDE de tipo EAL *urf2* (Figura 20), cuya intensidad se observó aumentada producto de la exposición a cadmio sólo en biopelículas y no así en células plantónicas. Cabe destacar que los partidores diseñados para cuantificar la abundancia de este transcrito no permiten diferenciar entre los transcritos *urf2.1* y *urf2.2* por lo que fueron tratados como un único transcrito “*urf2*”.

3.5.2 Análisis cuantitativo de transcritos asociados a la vía del c-di-GMP en células plantónicas y biopelículas expuestas a cadmio

Establecidas las condiciones de cultivo y exposición a cadmio en ambos estilos de vida, se procedió a replicar las condiciones experimentales descritas en 3.2.1. Se cuantificó los cambios de abundancia en un nuevo grupo de ORFs redefinido de 22 transcritos

Tabla 9. Efecto de la exposición a cadmio en células plantónicas y biopelículas sobre la abundancia de 18 transcritos asociados a la vía del c-di-GMP por RT-PCR.

GGDEF	Plantónicas	Biopelículas
<i>RMET_RS05490</i>	↓	↓
<i>RMET_RS11180</i>	↓	↓
<i>RMET_RS11270</i>	↓	↓
<i>RMET_RS16170</i>	↓	↓
<i>RMET_RS20545</i>	↓	↓
<i>RMET_RS29325</i>	↓	↓
GGDEF-EAL		
<i>RMET_RS11280</i>	—	—
<i>RMET_RS28910</i>	↓	↓
<i>RMET_RS22980</i>	—	—
<i>RMET_RS30470</i>	↓	↓
EAL		
<i>urf2</i>	—	↑
<i>RMET_RS05485</i>	—	—
<i>RMET_RS20720</i>	—	—
Posibles efectores		
<i>RMET_RS05745</i>	↓	↓
<i>RMET_RS08705</i>	↓	↓
<i>RMET_RS11325</i>	↓	↓
<i>RMET_RS21490</i>	↓	↓
<i>RMET_RS29670</i>	↓	↓

↓: Disminución, ↑: Aumento, —: Sin cambios. *n*=2.

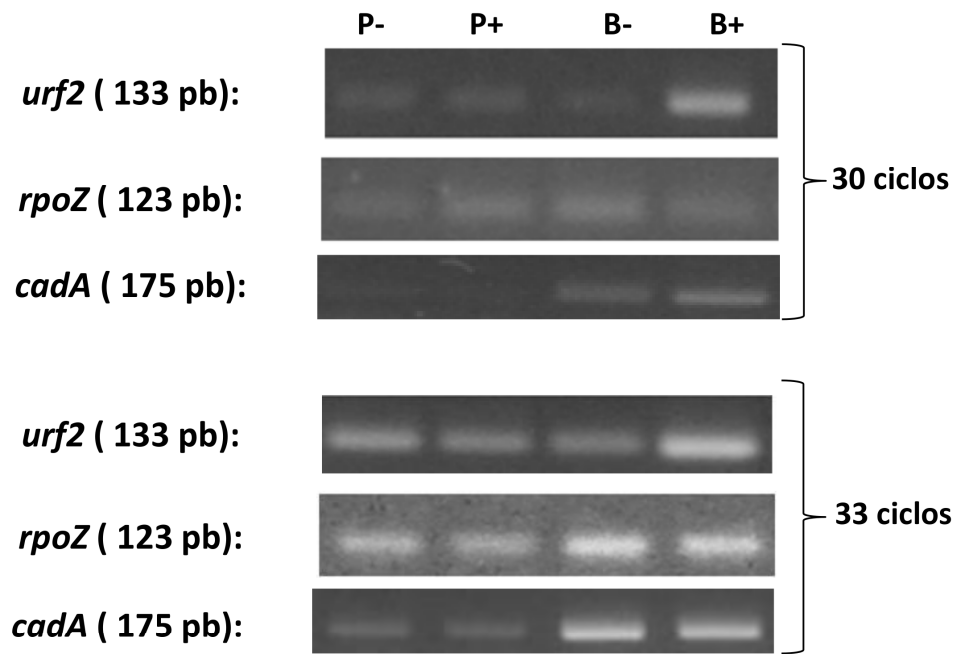


Figura 20. RT-PCR a partir de las muestras obtenidas desde células platónicas y sésiles bajo el diseño experimental expuesto. P-: Plantónicas control, P+: Plantónicas expuestas a cadmio 2mM, B-: Biopelículas control, B+: Biopelículas expuestas cadmio 2mM.

asociados al metabolismo del c-di-GMP (Figura 21A) y 6 a posibles efectores (Figura 21B). Para disponer de un control positivo de tratamiento se agregó a este grupo el transcrito *cadA*, que codifica una bomba de eflujo de cadmio dependiente de ATP (Figura 21C). Dada la localización de los genes *urf2.1* y *urf2.2* en los operones de resistencia a mercurio Tn4378 y Tn4380 se cuantificó el transcrito *merA*, como parámetro de inducción de ambos operones (Figura 21C).

El resultado del análisis sobre transcritos asociados al metabolismo de c-di-GMP, mostró el número de veces de cambio de magnitud de los transcritos en las biopelículas tratadas que en sus contrapartes planctónicas. La mayoría de los cambios observados no fueron considerados como significativos (Figura 21A).

En células planctónicas, sólo tres transcritos asociados al metabolismo del c-di-GMP exhibieron cambios significativos. El transcrito *RMET_RS11180* ($-5,04 \pm 1,57$) que codifica una diguanilato ciclasa de membrana con dominios accesorios CACHE, HAMP y PAS (Tabla 7). Los transcritos *urf2* ($2,71 \pm 0,21$) asociados a los ORFs *RMET_RS31035* y *RMET_RS30310* que codifican una fosfodiesterasa.

Las biopelículas exhibieron un número mayor transcritos con cambios significativos. Tal como sucedió en la condición planctónica, el transcrito *RMET_RS11180* mostró una significativa disminución ($-3,54 \pm 0,37$). Compartieron esta categoría dos transcritos codificantes para proteínas híbridas. El primero fue *RMET_RS28910* ($-4,700 \pm 1,25$), que codifica para una proteína que posee dos dominios CBS. El segundo fue *RMET_RS02985* ($-6,240 \pm 1,540$) que codifica para una proteína integral de membrana con un dominio MASE1 (Nikolskaya y cols., 2003). En mayor magnitud

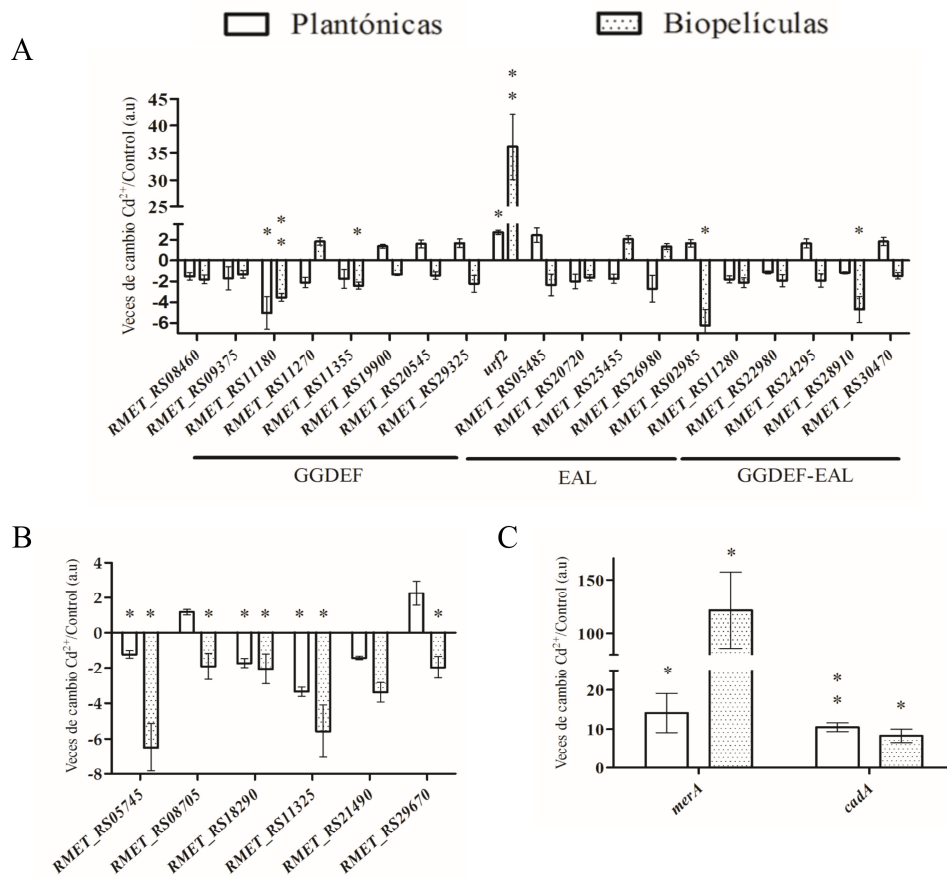


Figura 21. Efecto de la exposición a cadmio en transcritos involucrados en la vía del c-di-GMP y en la resistencia a metales pesados. A: Genes asociados al metabolismo del c-di-GMP. **B:** Genes asociados a efectores de la vía. **C:** Genes asociados a la resistencia a metales pesados. Determinaciones de “veces de cambio” realizadas mediante cuantificación relativa respecto a la condición control. Se muestran los valores promedio de tres réplicas biológicas \pm dS. Exposiciones realizadas durante 45 min. Los símbolos señalan los transcritos con cambios de abundancia significativos, fuera del rango [+1, -1], evaluados mediante test de t de student de una muestra. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

destacó el significativo incremento del transcrito *urf2* ($36,140 \pm 6,07$) (Figura 21A).

El efecto del cadmio en la transcripción de posibles efectores de esta vía de señalización fue de una disminución generalizada en ambos estilos de vida. Este efecto se vio incrementado en las biopelículas, que exhibieron una significativa disminución del transcrito *RMET_RS05745* ($-6,48 \pm 1,35$), que codifica para una proteína homóloga de YgcR, responsable del freno del motor flagelar en *E. coli* (Paul y cols., 2010). Se observó la disminución del transcrito *RMET_RS11325* ($-5,57 \pm 1,48$), que codifica una proteína homóloga del efector BscA, regulador de la síntesis de celulosa en *E. coli* (Morgan y cols., 2014).

Al analizar los transcritos asociados a la resistencia a metales se observó el incremento equivalente de *cadA* tanto en células plantónicas ($8,30 \pm 1,70$) como en biopelículas ($10,5 \pm 1,1$). Distinto fue el caso del transcrito *merA*, que pese a incrementar su abundancia en ambos estilos de vida, mostró una magnitud significativamente mayor en las biopelículas tratadas ($121,41 \pm 35,70$) respecto a sus contrapartes plantónicas ($14,10 \pm 5,0$).

3.5.3 Evaluación de la actividad fodiesterasa codificada por el gen *urf2* mediante complementación en *P. aeruginosa* PAO1 Δ *rocR*

En vista de los resultados obtenidos en la sección 3.3, que dan cuenta de una disminución de los niveles de c-di-GMP en las biopelículas expuestas a cadmio, acompañada de un significativo incremento en la abundancia del transcrito *urf2* (3.5.1 y 3.5.2) se procedió a evaluar de forma experimental su funcionalidad.

Con el objetivo de obtener evidencias experimentales de la actividad fosfodiesterasa de la proteína codificada por el gen *urf2*, se evaluó su capacidad de complementación en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 Δ *rocR*, mutante nula para la fosfodiesterasa RocR. Se ha señalado a RocR como responsable de la inhibición transcripcional del sistema de síntesis de fimbrias tipo Cup B/C,

involucradas en la adherencia a superficies en *P. aeruginosa* PAO1 (Rao y cols., 2008). Así la disponibilidad de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$ (Kuchma y cols., 2004), ofreció la posibilidad de realizar ensayos de complementación heteróloga para evaluar la restitución de fenotipos y de niveles de c-di-GMP intracelular. Se evaluó la funcionalidad de la proteína codificada por el gen *urf2* vía complementación con el ORF *urf2.2*, evaluando restitución del fenotipo de adherencia exacerbada, como también la restitución de los niveles intracelulares de c-di-GMP. Esta complementación logró disminuir de forma significativa la adherencia en etapas tempranas (Figura 22A). También esta complementación disminuyó los niveles intracelulares de c-di-GMP (Figura 22B). La reunión de ambos resultados entrega los primeros indicios experimentales que soportan la funcionalidad de la proteína codificada por el gen *urf2.2* como fosfodiesterasa, codificada en este caso al interior del operón *mer* Tn4380 en el genoma de *C. metallidurans* CH34.

3.5.4 Efecto de la sobreexpresión del gen *urf2.2* en la formación de biopelículas y la susceptibilidad a cadmio en *C. metallidurans* CH34.

3.5.4.1 Desarrollo de un sistema de sobreexpresión de genes en *C. metallidurans*.

Para llevar a cabo esta actividad se desarrolló un sistema de sobreexpresión en esta bacteria. En base a los antecedentes que señalan a *C. metallidurans* como aceptora de plasmidios de amplio espectro de hospedero (grupo IncP-1) (Diels y cols., 1993; Janssen y cols., 2010; Rojas y cols., 2011), se implementó una estrategia de sobreexpresión vía conjugación biparental. Como vector de expresión se seleccionó el plasmidio pJBTc19 (Pérez Mendoza y cols., 2014), dada su pertenencia a la familia IncP-1, y la inclusión de un “cassette” de resistencia a tetraciclina en su secuencia (Blatny

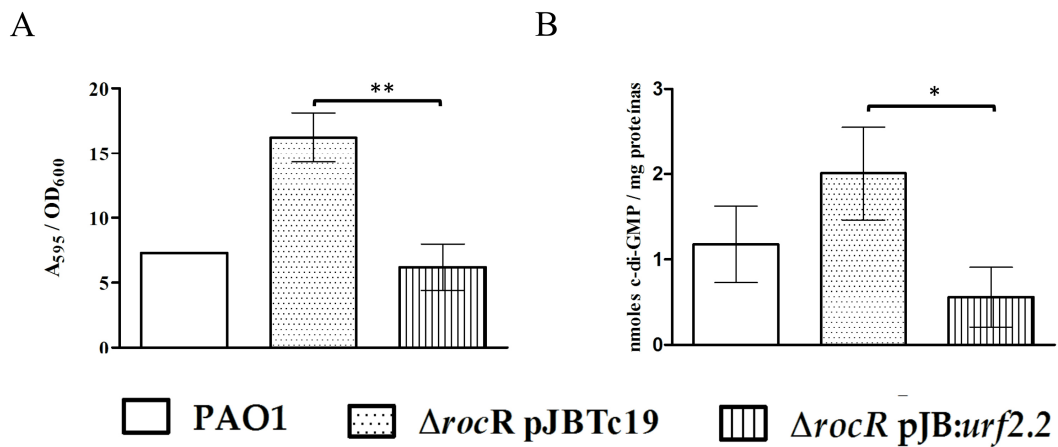


Figura 22. Efectos de la complementación de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$ con el ORF *urf2.2*.
 A: Biomasa adherida en microplacas cuantificada por tinción con Cristal Violeta. B: Niveles celulares de c-di-GMP en cultivos en matraz. Cuantificaciones realizadas tras 6 h de incubación a 30°C en agitación a 150 rpm. Se muestran los valores promedios de tres experimentos independientes \pm dS. Los símbolos representan grados de significancia de las diferencias evaluadas mediante test de t de student. *: $p \leq 0.5$. **: $p \leq 0.01$.

y cols., 1997), ofreciendo así la posibilidad de seleccionar transformantes de *C. metallidurans* con este vector. Se adjuntó a la donación de este vector, la construcción pjBTc19:*pleD**, portadora del inserto *pleD** (Paul y cols., 2004; Pérez-Mendoza y cols., 2014), que codifica para una versión constitutivamente activa de la diguanilato ciclasa PleD de *C. crescentus* obtenida mediante mutaciones puntuales. La disposición de la construcción pjBTc19:*pleD** ofreció la posibilidad de evaluar los efectos de un aumento constitutivo de los niveles de c-di-GMP en la susceptibilidad a cadmio.

Para prevenir una posible incompatibilidad de pJBTc19 con plasmidios nativos, en primera instancia se optó por transformar la cepa *C. metallidurans* AE104, carente de pMOL28 y pMOL30. Como se esperaba, la cepa AE104 pjBTc19:*pleD** exhibió un aumento de EPS en sus macrobiopelículas, revelado por un evidente incremento en la retención del colorante Rojo Congo (Figura 23A). Este resultado se condice con el fenotipo autoagregante exhibido por su cultivo en medio líquido (Figura 23B).

Para conocer los efectos de esta transformación en la formación de biopelículas, se cuantificó la biomasa adherida mediante tinción y cuantificación por absorbancia del colorante Cristal Violeta. En paralelo se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias por unidad de superficie. Ambas determinaciones fueron sobre biopelículas formadas en el sistema CBD (Figura 6). La cepa AE104 pjBTc19:*pleD** exhibió un incremento en la cantidad de biomasa adherida (Figura 24A); pese a ello este incremento no se tradujo en una mayor cantidad de células adheridas (Figura 24B).

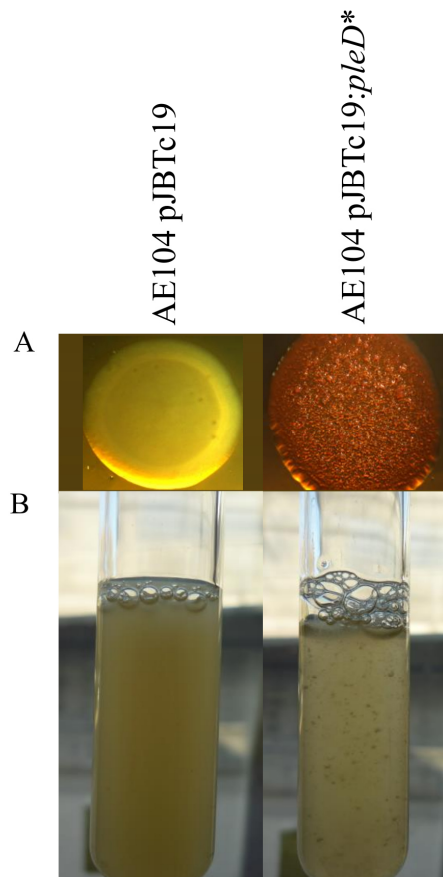


Figura 23. Efecto de la expresión heteróloga de la diguanilato ciclasa PleD* en la presencia de sustancias exopoliméricas de la cepa *C. metallidurans* AE104. A) Macrobiopelículas tras 4 días de crecimiento en agar Rojo Congo. B) Cultivos de 16 h en medio caldo nutritivo. pJBTc19: Vector vacío. pJBTc19:*pleD: Vector con el inserto *pleD**.**

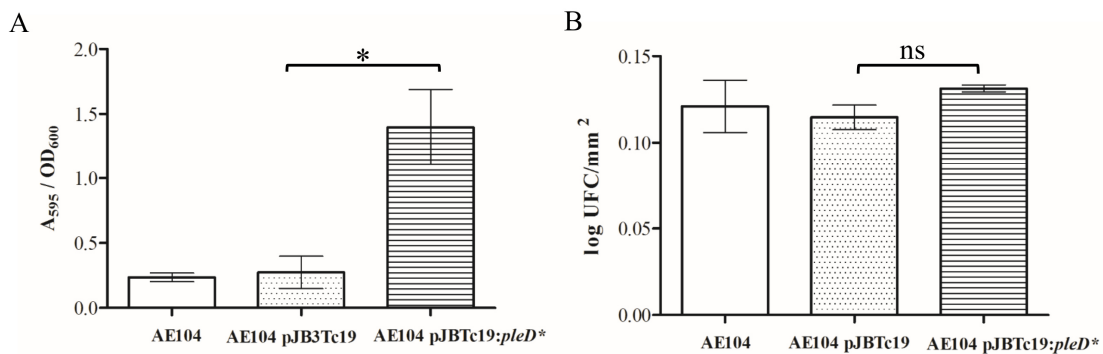


Figura 24. Efecto de la expresión heteróloga de la diguanilato ciclasa PleD* en la formación de biopelículas de la cepa de *C. metallidurans* AE104. Los resultados corresponden a valores promedios de tres experimentos independientes \pm dS. A) Cuantificación espectrofotométrica del colorante Cristal violeta retenido en biomasa adherida. B) Unidades formadoras de colonia adheridas por unidad de superficie. Grados de significancia según test de t de student de las diferencias evaluadas. ns: no significativa, *: $p \leq 0.05$.

3.5.4.2 Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en biopelículas de *C. metallidurans* CH34.

Establecido un protocolo de sobreexpresión de genes, se procedió a la transformación de *C. metallidurans* CH34, con los vectores pJBTc19 y pJBTc19:*pleD**. El resultado obtenido replicó los fenotipos exhibidos por las cepas derivadas del genotipo AE104, un aumento en la presencia de EPS en macrobiopelículas y en una mayor formación de biopelículas (Figura 25).

Asimismo, *C. metallidurans* CH34 fue transformada con el constructo pJBTc19:*urf2.2* para evaluar los efectos de la sobreexpresión de Mrp, tanto en la formación de biopelículas, como en la susceptibilidad a cadmio. A diferencia de lo observado con el inserto *pleD**, la transformación con pJBTc19:*urf2.2* no generó cambios en la formación de biopelículas (Figura 26).

3.5.4.3 Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP, en la resistencia cadmio de *C. metallidurans* CH34

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la concentración mínima inhibitoria (MIC) de biopelículas de *C. metallidurans* CH34 a cadmio vía cultivo de las cepas derivadas de *C. metallidurans* CH34 pJBTc19, pJBTc19:*urf2.2* y pJBTc19:*pleD** en medios sólidos suplementados con Rojo Congo a diferentes concentraciones del metal pesado. La presencia de Rojo Congo en el medio permitió visualizar el contenido de EPS en las macrobiopelículas, bajo las mismas condiciones ensayadas en la sección 3.2.2 (Figura 25). Se estableció así una disminución significativa de la MIC de cadmio para la cepa CH34 pJBTc19:*pleD**, la que además de incrementar su contenido de EPS, no replicó el fenotipo de disminución de EPS dosis dependiente de cadmio descrito en la cepa parental (Figura 12).

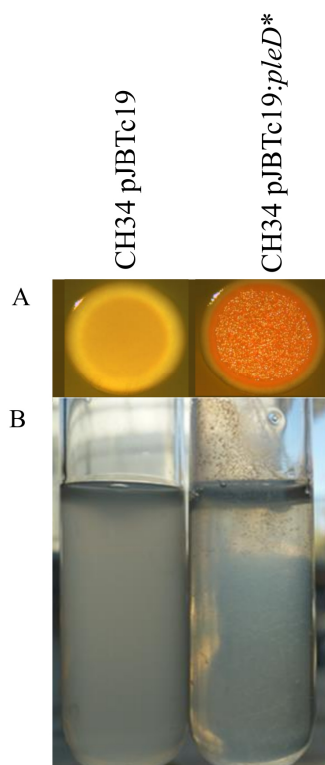


Figura 25. Fenotipos de cepas transformadas de *C. metallidurans* CH34. A) Macrobiopelículas tras 4 días de crecimiento en agar Rojo Congo. B) Cultivos de 16 h en medio mínimo LPTMS. pJBTe19: Vector vacío. pJBTe19:pleD*: Vector con el inserto *pleD**.

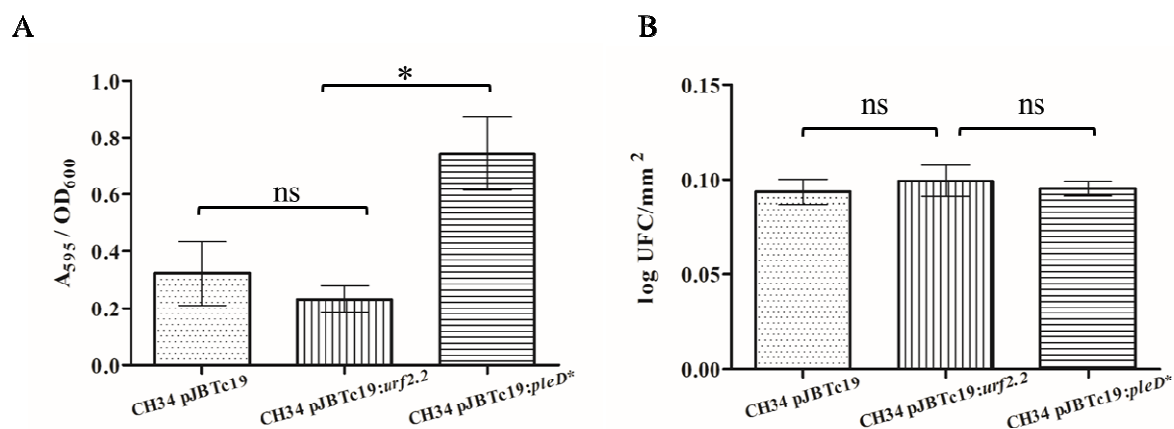


Figura 26. Formación de biopelículas en cepas transformadas de *C. metallidurans* CH34 transformadas. A) Cuantificación biomasa adherida mediante tinción Cristal Violeta. B) Unidades formadoras de colonias adheridas por unidad de superficie. Los resultados corresponden a valores promedios de tres experimentos independientes \pm dS. Grados de significancia según test de t de student de las diferencias evaluadas. ns: no significativa, *: $p \leq 0.05$.

La sobreexpresión de Mrp no tuvo efecto en el contenido de EPS, ni en la MIC de este estilo de vida en *C. metallidurans* CH34 (Figura 27).

3.5.4.4 Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la susceptibilidad a cadmio de *C. metallidurans* CH34

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la susceptibilidad a cadmio de *C. metallidurans* CH34, se replicó las condiciones utilizadas en la determinación de la susceptibilidad a cadmio de la cepa parental (Anexo 10). Así, se estableció un significativo incremento de susceptibilidad en la cepa CH34 pJBTc19:*pleD**, tanto en la fracción planctónica como en biopelículas (Figura 28).

3.5.4.5 Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP, en los niveles intracelulares de este segundo mensajero en presencia de cadmio

Con el objetivo de conectar los efectos de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP con alteraciones a la disminución de los niveles de este segundo mensajero, se cuantificó los niveles de c-di-GMP en células planctónicas y biopelículas expuestas a cadmio bajo las mismas condiciones descritas para la cepa parental.

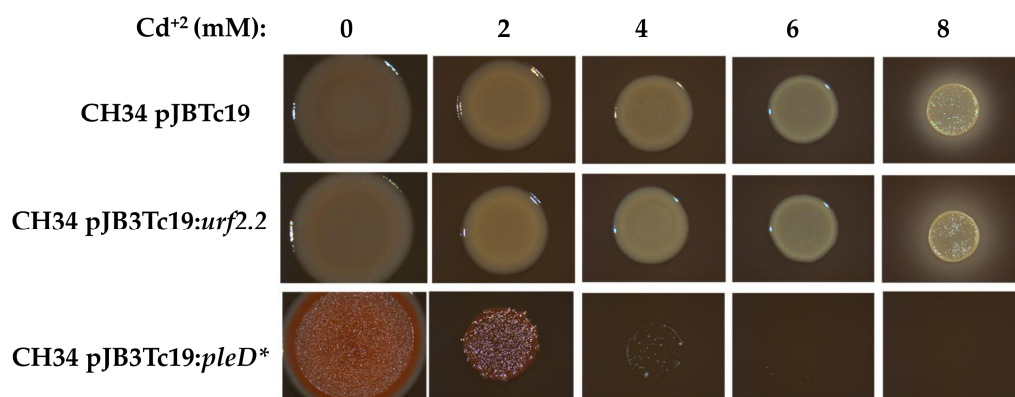


Figura 27. Efectos de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la presencia de EPS y su resistencia a cadmio en macrobiopelículas de *C. metallidurans* CH34. Coloración proporcional al contenido de EPS presente en cada matriz. Cultivos en medio LB libre de NaCl suplementados con Rojo Congo. Incubaciones de 5 días a temperatura ambiente en oscuridad. Imagen representativa de tres experimentos independientes.

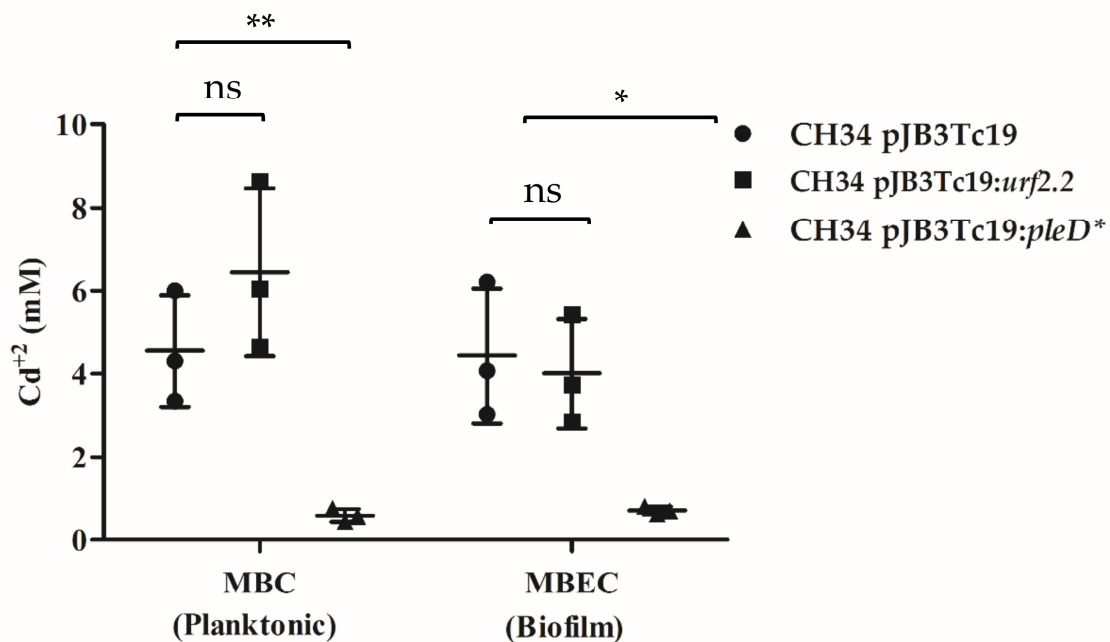


Figura 28. Efectos de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP en la susceptibilidad a cadmio en células plantónicas y biopelículas de *C. metallidurans* CH34. Se muestran los valores promedio calculados dentro de un IC 95 % definido por las variaciones entre parámetros descritos por curvas exponenciales de pérdida de viabilidad celular, obtenidas desde regresiones no lineales. La significancia de las diferencias fueron evaluadas mediante test de t de student. *: $p \leq 0.05$, ns: no significativa.

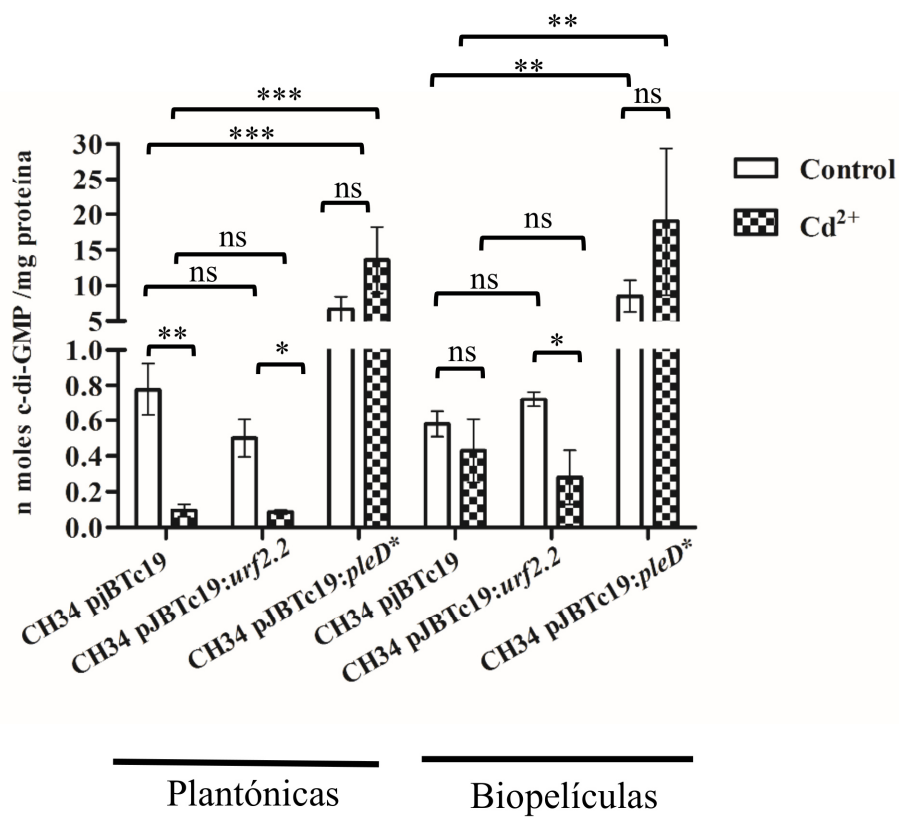


Figura 29. Efecto de la sobreexpresión de genes del metabolismo del c-di-GMP, en niveles intracelulares de este segundo mensajero en presencia de cadmio. Se muestran los valores promedios obtenidos a partir de tres experimentos independientes \pm dS. La significancia de las diferencias fueron evaluadas mediante test de t de student. *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ns: no significativa

No se observaron diferencias significativas producto de la sobreexpresión del gen *urf2.2* en *C. metallidurans* CH34. Si bien las biopelículas de esta cepa exhiben una disminución de los niveles de c-di-GMP de mayor magnitud la cepa CH34 pJBTc19, el hecho de que la cepa control no haya replicado la disminución de c-di-GMP descrita en la cepa CH34 parental (Figura 16) no permite atribuir esta disminución a la sobreexpresión del gen *urf2.2*.

Respecto a la cepa CH34 pJBTc19:*pleD**, esta mostró niveles de c-di-GMP significativamente elevados en todas las condiciones, aún en presencia de cadmio (Figura 29).

4. DISCUSIÓN

4.1 Relaciones entre componentes de la vía del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34 y sus fenotipos característicos.

Este trabajo identificó 36 ORFs que codifican dominios GGDEF o EAL que se predicen con actividad catalítica en la síntesis o degradación de c-di-GMP. Estos datos se corresponden con la descripción realizada por el grupo de biología computacional de NCBI, la que ha abordado la presencia de este tipo de dominios en 1116 genomas bacterianos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/c-di-GMP.html) (Römling y cols. 2013). Este trabajo profundizó en la predicción de funcionalidad catalítica de estos dominios. De las 12 proteínas híbridas GGDEF-EAL codificadas en este genoma, este trabajo descartó la funcionalidad de 3 proteínas codificadas por las secuencias codificantes *RMET_RS23955*, *RMET_RS24490* y *RMET_RS29670*. *RMET_RS23955* se encuentra anotado como “pseudogen”, por lo que no codificaría para una proteína funcional. *RMET_RS24490* y *RMET_RS29670* no reúnen las características estructurales mínimas para predecir una actividad catalítica en sus dominios GGDEF y EAL (Tabla 5).

Dentro del conjunto de las 36 ORFs analizados, destaca la presencia de 6 ORF (16,7 %) compuestos exclusivamente por un dominio GGDEF. Esto contrasta con el 0,03 % de este tipo de arquitecturas en la base de datos Pfam (El Mouali y cols., 2017). Estos resultados muestran la posesión de un número excepcional de diguanilato ciclasas, que se encuentran desprovistas de dominio accesorio alguno o en su defecto de dominios accesorios aún no descritos. Siendo *C. metallidurans* CH34 una bacteria adaptada a nichos particulares, y esta vía de señalización un tópico aún poco estudiado en cepas ambientales, es posible la existencia de dominios sensores particulares aun no caracterizados.

Entre los dominios accesorios identificados fue posible distinguir dos categorías, aquellos asociados a funciones sensoras y dominios asociados a transducción de señales. Dentro del conjunto de dominios sensores, definidos como dominios sensibles a la unión de ligandos o alteraciones fisicoquímicas en el espacio extracelular (Galperin y cols., 2004), se detectaron dos dominios CACHE (Upadhyay y cols., 2016) ubicados en la región amino terminal de proteínas codificadas en dos ORFs con dominio GGDEF (*RMET_RS11180* y *RMET_RS17815*). Pese a que la especificidad de unión de este tipo de dominios se ha restringido a nutrientes y hormonas, el espectro de señales afines a dominios CACHE aún permanece abierto (Upadhyay y cols., 2016). Se sumó a este grupo el dominio de membrana asociado a la detección de gases “MHYT”, presente exclusivamente en la proteína híbrida codificada en *RMET_RS22980*, homóloga de la fosfodiesterasa MucR (Tabla 7), esencial en la dispersión de biopelículas inducida en *P. aeruginosa* (Li y cols., 2013).

Otro dominio sensor descrito fue el “CBS”, cuyo rol en bacterias ha sido vinculado experimentalmente a la regulación del transportador tipo ABC OpuA, el cual supedita su actividad a la interacción con el extremo carboxilo terminal de dos dominios CBS organizados en tándem, interacción solo generada en condiciones de alta osmolaridad citoplasmática (Biemans-Oldehinke y cols., 2006). Este fue el caso de la proteína híbrida codificada en el gen *RMET_RS28910*, ubicado en un contexto génico codificante para un transportador de fosfato tipo ABC (*RMET_RS28925*) (no mostrado) sugiriendo una eventual interacción entre ambas proteínas. La proteína codificada en el gen *RMET_RS30470*, que está ubicado dentro de la isla genómica de resistencia a metales pesados “*cop-sil-nre-ncc*”, exhibió un dominio CBS. No se ha descrito un rol de este tipo de dominios en la respuesta a metales pesados. Un caso aparte lo constituyó la arquitectura de la proteína híbrida codificada en el gen *RMET_RS24295*, en la que el dominio CBS está localizado entre los dominios GGDEF y EAL. A pesar de su significativa identidad con la proteína WP_079279815.1 de *P. aeruginosa*, no se puede realizar inferencias sobre su rol.

El último de los dominios clasificados en esta categoría fue el dominio sensor “CSS”, sensible alteraciones del estado redox del citoplasma y presente en dos fosfodiesterasas homólogas,

codificadas en los genes *RMET_RS05485* y *RMET_RS26980*, que su vez mostraron alta identidad con la fosfodiesterasa YjcC de *E. coli*, que también se ha descrito en *Klebsiella pneumoniae* y que juega un rol en la sobrevivencia en condiciones de estrés oxidativo (Huang y cols., 2013).

En 8 proteínas ligadas al metabolismo del c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34 se describió la presencia de dominios PAS, que están clasificados en la interfase entre funciones sensoras y de transducción de señales. Se le ha atribuido a este dominio roles en la detección de gases, vía grupos hemo en su estructura (Lechauve y cols., 2010), pero también se le han asociado funciones en la transducción de señales, a través de interacciones proteína - proteína (Henry y Crosson 2011; Römling y cols., 2013; Sarenko y cols., 2017). Se podría postular un rol para este tipo de arquitecturas a partir de definiciones recientes acerca del nicho y estilo de vida nativo de *C. metallidurans* CH34 (Nies, 2016). Esta bacteria es quimiolitotrofa facultativa, hidrógeno oxidante y nativa de suelos enriquecidos en metales pesados, por lo que se han postulado que los complejos minerales rocosos presentes en este ambiente son su hábitat natural. *C. metallidurans* CH34 habita en forma de biopelículas sobre estas superficies (Nies, 2016), donde es posible distinguir dos subpoblaciones, definidas por su ubicación dentro de estas estructuras, dando lugar a la co-existencia de dos perfiles metabólicos distintos. Una subpoblación ubicada en la superficie del complejo mineral, complejo que al disolverse genera hidrógeno molecular junto a iones metálicos solubles, ambos productos con los que *C. metallidurans* habría co-evolucionado (Nies, 2016). Una segunda subpoblación representada por células que no tienen contacto directo con el mineral, ubicada en regiones de las biopelículas expuestas al medio y por lo tanto expuestas a una mayor concentración de oxígeno y compuestos orgánicos, lo que favorece un metabolismo heterótrofo y plantónico. En este contexto sería posible postular un rol de las arquitecturas PAS-GGDEF/GGDEF-EAL, en la transición entre ambos estados metabólicos, uno quimiolitotrofo formador de biopelículas y otro heterótrofo y plantónico.

Pasando a la categoría de dominios involucrados en transducción de señales, se encontró la presencia de dominios periplasmáticos “HAMP”, asociados a la transducción de señales

ambientales (Matamouros y cols. 2015). Este dominio mostró distribución exclusiva en proteínas con dominio GGDEF (*RMET_RS08460*, *RMET_RS11180* y *RMET_RS11270*). Entre estas se identificó a la proteína codificada en *RMET_RS11270* como homóloga se la diguanilatociclasa TpbB de *P. aeruginosa*, cuya actividad se encuentra controlada por la fosfatasa TpbA vía desfosforilación de dos residuos periplásmicos de tirosina (Xu y cols., 2015). La disposición de este *RMET_RS11270* en contexto con *RMET_RS11280*, codificante para una proteína híbrida, y ambos en contexto a *RMET_RS11325*, codificante para una proteína homóloga de BscA, sugiere la conformación de un módulo de regulación entorno al dominio PilZ presente en *RMET_RS11325* vía antagonismo entre *RMET_RS11270* y *RMET_RS11280*.

El segundo dominio vinculado a la transducción de señales presente en este conjunto de proteínas corresponde al dominio “REC”, receptor de fosforilación localizado hacia el extremo amino terminal del dominio GGDEF codificado en *RMET_RS20545*. Dicha arquitectura replica la descrita para la diguanilato ciclasa WspR, enzima homóloga de *P. aeruginosa* y determinante en el crecimiento sobre superficies (De y cols., 2009; Huangyutitham y cols., 2013). El gen *RMET_RS20545* se localizó río abajo de la agrupación genética *RMET_RS20570-RMET_RS20565-RMET_RS20560*, asociada a la maquinaria de regulación de quimiotaxis *cheWRR*, lo que permite suponer su participación en esta respuesta.

4.2 Asociaciones entre fenotipos de *C. metallidurans* CH34 asociados a la formación de biopelículas y las respuestas descritas en la vía del c-di-GMP frente a cadmio

Los resultados descritos en esta tesis evidenciaron un efecto inhibitorio de cadmio en la formación de biopelículas de *C. metallidurans* CH34. Esto mostró ser dosis dependiente tanto en la inhibición de la adherencia como en la pérdida de EPS en biopelículas de esta bacteria.

Ambos fenotipos se corresponden con los datos obtenidos de células expuestas a este metal pesado, que mostraron una significativa disminución en los niveles de c-di-GMP tanto en el estado

plantónico ($p = 0,0048$) como en biopelículas ($p = 0,0004$). Consistente con lo anterior, la exposición a cadmio mostró inducir un significativo aumento de la abundancia del transcrito *urf2* tanto en el estado plantónico ($p = 0,0052$) como en biopelículas ($p = 0,0098$). Según la evidencia experimental obtenida en este trabajo vía ensayos de complementación en la mutante PAO1 Δ *rocR* con la construcción pJBTc19:*urf2.2*, la proteína codificada por el gen *urf2* correspondería a una fosfodiesterasa funcional. El incremento de la formación de biopelícula y la susceptibilidad a cadmio, como consecuencia de la expresión heteróloga y constitutiva de la diguanilato ciclasa PleD* es coherente (Figura 29).

Se han descrito distintos efectos de los metales pesados sobre la formación de biopelículas, que varían según la bacteria, el tiempo de exposición, la edad de la comunidad microbiana y el metal pesado en cuestión (Harrison y cols., 2007; Koechler y cols., 2015). Se ha descrito un efecto inhibitorio de cadmio sobre la formación de biopelículas vía represión transcripcional de sistemas de “quorum sensing” en *B. multivorans* (Vega y cols., 2014) y *Chromobacterium violaceum* (Thornhill y cols., 2017). Sin embargo, otros estudios describen un efecto promotor de cadmio sobre el estilo de vida sésil en *Rhizobium alami* (Schue y cols., 2011) y *Staphylococcus epidermis* (Wu y cols., 2015).

Se ha descrito un efecto promotor del cadmio sobre la motilidad de *C. metallidurans* CH34 (Shamim y cols., 2014). Si bien esto se condice con la definición de *C. metallidurans* CH34 como una cepa con estrategias particulares de adaptación a metales pesados en el medio, previo a este trabajo, no existían antecedentes en la literatura que abordaran los mecanismos moleculares subyacentes a esta respuesta. La disminución de los niveles de c-di-GMP por presencia de cadmio en el medio constituye la primera evidencia que involucra una vía de transducción de señales en la respuesta a cadmio en *C. metallidurans* CH34 y cómo esta vía influye en el estilo de vida de la bacteria.

Esta disminución en los niveles de c-di-GMP, junto a la inhibición de la formación de biopelículas, tras una exposición aguda a cadmio 2 mM (50 % del MIC) podría ser parte de un

fenómeno de “dispersión de biopelículas inducida”, respuesta descrita en condiciones de hambruna (Gjermansen y cols., 2006), exposición a succinato, mercurio y arsénico en especies del género *Pseudomonas* (Morgan y cols., 2006). Apoyan esta hipótesis antecedentes que describen roles determinantes de fosfodiesterasas específicas en su manifestación como es el caso de el caso de DipA en *P. aeruginosa* (Roy y cols., 2012) o YhjH en *P. putida* (Gjermansen y cols., 2010).

La evaluación de una posible “dispersión de biopelículas inducida”, mediada por la fosfodiesterasa MrP, establece la necesidad de disponer de una cepa doble mutante nula en CH34 *Δurf2.1Δurf2.2*, además de disponer de sistemas de cultivo de biopelículas en condiciones hidrodinámicas de flujo.

Este trabajo además permitió establecer una disminución significativa de los niveles de c-di-GMP en *C. metallidurans* CH34 tras la exposición a cadmio 2 mM por 45 min tanto en células plantónicas como biopelículas (Figura 16). Pese a presentarse esta respuesta en ambos estilos de vida, los cambios transcriptómicos aquí descritos señalan diferencias entre los posibles componentes del metabolismo del c-di-GMP que la generan. En general, células plantónicas expuestas cadmio no mostraron cambios transcriptómicos de mayor magnitud, salvo la excepción del transcrito *RMET_RS11180* ($-5,02 \pm 1,60$), codificante para una diguanilato ciclasa de membrana poseedora de un dominio HAMP (Matamouros y cols., 2015), vinculado a la detección de señales ambientales en bacterias (Figura 18). Al contrastar dicha respuesta con la caída en los niveles de c-di-GMP descrita, sería posible señalar a la inhibición transcripcional de *RMET_RS11180*, diguanilato ciclasa de membrana, como responsable de la caída en los niveles de este segundo mensajero en presencia de cadmio en células plantónicas. Cabe mencionar en este punto los antecedentes que describen un incremento de 2,3 veces del transcrito *urf2* en datos de microarreglos obtenidos desde células plantónicas expuestas a cadmio 0,6 mM durante 30 min (Monsieur y cols., 2011). Se corresponden estos cambios con la magnitud de veces de cambio descrito para el transcrito *urf2* en este trabajo ($2,710 \pm 0,210$), resultado que permite suponer la participación de Mrp en la caída de los niveles intracelulares de c-di-GMP en esta condición.

La respuesta transcriptómica en las biopelículas expuestas a cadmio fue de mayor magnitud respecto a las células platónicas. Las biopelículas exhibieron un número mayor de transcritos con cambios significativos de abundancia producto de este tratamiento. Tales fueron los casos de la diguanilato ciclasa antes mencionada codificada en *RMET_RS11180* ($-3,540 \pm 0,370$) y los transcritos *RMET_RS02985* ($-6,240 \pm 1,54$) y *RMET_RS28910* ($-4,70 \pm 1,25$) ambos codificantes para proteínas híbridas predichas como bifuncionales según los criterios utilizados. Cabe destacar también la significativa caída en la abundancia del transcrito *RMET_RS05745*, que codifica una proteína homóloga del motor flagelar YcgR, efector de la vía del c-di-GMP en *E. coli* (Koushik y cols., 2010), entregando antecedentes que apoyan la existencia de un fenómeno de promoción de motilidad en presencia de cadmio en *C. metallidurans* CH34. Sobre todos los cambios destacó el ya mencionado significativo incremento del transcrito *wrf2* ($36, 1 \pm 6,1$). Estos resultados permiten postular la existencia de una respuesta de degradación de c-di-GMP en las biopelículas expuestas a cadmio, en la cual la fosfodiesterasa Mrp tendría un rol importante, sin poder descartarse un rol de las proteínas híbridas codificadas por los genes *RMET_RS02985* y *RMET_RS28910*.

Por otro lado, pese al significativo mayor incremento de abundancia del transcrito *wrf2* en las biopelículas tratadas respecto a sus contrapartes platónicas ($p = 0,0007$), esta diferencia contrastó con una menor magnitud de la disminución en los niveles de c-di-GMP. Esto sugiere la participación de otras enzimas del metabolismo de c-di-GMP o de mecanismos post transcripcionales en la promoción de una eventual degradación de c-di-GMP. Si bien la disminución de los niveles de este segundo mensajero, es coherente con una inhibición de la formación de biopelículas por cadmio, la disminución de este segundo mensajero en las células platónicas, permite sugerir un rol de esta vía de señalización en respuestas al cadmio que excederían a la inhibición de la formación de biopelículas. Antecedentes al respecto se pueden obtener del rol de fosfodiesterasas particulares en la respuesta frente a estrés oxidativo. La fosfodiesterasa CdgR tiene un rol fundamental en la sobrevivencia frente a ROS asociadas a fagolisosomas en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Hisert y cols., 2005). El segundo antecedente corresponde a YgfF,

fosfodiesterasa de *E. coli* K12 y miembro de un regulón *fnr* señalado como esencial en la sobrevivencia a peróxido de hidrógeno (Lacey y cols., 2010). La fosfodiesterasa YjcC en *K. pneumoniae* CG43 posee un rol determinante en la respuesta a estrés oxidativo (Huang y cols., 2013). Es interesante la homología de YjcC con la fosfodiesterasa codificada por el gen *RMET_RS05485*, transcrito incrementado en las células planctónicas de *C. metallidurans* CH34 expuestas a cadmio aunque no de forma significativa ($p = 0,0727$).

Los cambios transcriptómicos observados tras la exposición a cadmio 2 mM, no necesariamente reflejarían los perfiles proteómicos presentes durante el tratamiento. No se puede descartar un rol de enzimas involucradas en el metabolismo del c-di-GMP expresadas de forma previa al tratamiento, que no tendrían necesidad de responder a nivel transcriptómico para ejercer influencia en los niveles de este segundo mensajero.

4.3 Relaciones entre estilo de vida y susceptibilidad a cadmio en *C. metallidurans* CH34

Las biopelículas de *C. metallidurans* CH34 mostraron ser igualmente susceptibles a cadmio que sus contrapartes planctónicas (Figura 15), lo que es contrario a lo anticipado en otros estudios (Teitzel y Parsek 2002; Harrison y cols. 2007; Prabhakaran y cols. 2017). Sin embargo, estos resultados están de acuerdo con las susceptibilidades a cadmio descritas en *E. coli* JM109, *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, en las que no se describe influencia del estilo de vida (Harrison y cols., 2004). Un resultado similar se ha descrito en la susceptibilidad de *E. coli* JM109 a especies oxianiónicas como trióxido de teluro (Harrison y cols., 2005). Antecedentes más recientes describen la menor susceptibilidad de biopelículas de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* JM109 a plata, respecto a sus contrapartes planctónicas (Gugala y cols., 2017). Los estudios antes mencionados, comparten con este trabajo, la obtención de parámetros de susceptibilidad en el sistema “Calgary Biofilm Device”, determinaciones realizadas por el “Biofilm Research Group” de la Universidad de Calgary, que es grupo de investigación en el que se realizaron las

determinaciones de esta tesis. Estos estudios describen a la formación de biopelículas no como un mecanismo de resistencia a metales pesados *per se*, sino más bien un “mecanismo de tolerancia tiempo dependiente”, dado que incrementos en la capacidad de sobrevivencia de estas estructuras a tiempos cortos de exposición (2 h), desaparecen tras períodos más extensos (24 h) (Harrison y cols., 2004). En base a lo anterior no es posible descartar este fenómeno en *C. metallidurans* CH34.

La naturaleza eminentemente intracelular de la biosorción de cadmio en *C. metallidurans* CH34 contradice al modelo de complejamiento superficial de los metales pesados por grupos funcionales extracelulares, como mecanismo universal de interacción de las bacterias con estos elementos (Desaunay y Martins 2014). Este estudio descartaría a la matriz expolimérica de esta bacteria como una barrera para ingreso de cadmio al citoplasma, en las condiciones experimentales utilizadas en el sistema “Calgary Biofilm Device”.

La cepa CH34 pJBTc19:*pleD** exhibió un significativo aumento de susceptibilidad a cadmio (Figura 28), tanto en células plantónicas como en biopelículas, pese a un significativo aumento en su capacidad de formación de biopelículas y niveles cualitativamente mayores de EPS en estas estructuras (Figuras 26 y 27). La disminución de los niveles de c-di-GMP en presencia de cadmio en *C. metallidurans* CH34 y la mantención constitutiva de niveles elevados de c-di-GMP en la cepa CH34 pJBTc19:*pleD**, dan sustento a la existencia de una respuesta adaptiva vía disminución de los niveles de c-di-GMP (Figura 29). Una explicación alternativa a este fenotipo es la alta demanda energética requerida para la síntesis de los distintos componentes de la matriz expolimérica (Hobley y cols., 2015), que iría en directo perjuicio de los mecanismos de detoxificación citoplasmáticos de cadmio dependientes de ATP, como la bomba P-ATPasa CadA. De esta manera la síntesis constitutiva de c-di-GMP en *C. metallidurans*, estaría reclutando la maquinaria transcripcional hacia construcción de matriz extracelular en lugar de activar mecanismos de resistencia a cadmio.

4.4 Evaluación de Urf2 como determinante en la respuesta y sobrevida a cadmio en *C. metallidurans* CH34

Existen dos genes *urf2* codificados en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Por un lado el gen *urf2.1* (*RMET_RS30310*) codifica una proteína de 333 aa mientras que el gen *urf2.2* (*RMET_RS31035*) codifica una proteína de 329 aa (Tabla 7, Figura 18). En ambas proteínas existe un dominio EAL, entre las posiciones 13 y 250 que conserva la totalidad de los aminoácidos claves para la actividad fosfodiesterasa (Tabla 1). Pese a la descripción temprana de este gen como componente del operón de resistencia mercurio *Tn501* (Brown y cols., 1986), a la fecha ha permanecido como un componente de rol desconocido dentro de esta maquinaria. Es interesante destacar que el gen *urf2* corresponde al primer ORF codificante de un dominio EAL descrito en la literatura (Brown y cols., 1986; Galperin y cols., 2010), un año después de la descripción de c-di-GMP como un activador de la síntesis de celulosa en *G. xylinus* (Ross y cols., 1985), y mucho antes de su descripción como segundo mensajero universal en el dominio Bacteria (Römling y cols., 2005).

Si bien esta proteína ha sido recientemente señalada como representativa de una sub clase filogenética denominada “proteínas de dominio EAL solitario” (El Mouali y cols., 2017), análisis bioinformáticos realizados en este estudio cuestionan la ausencia de dominios accesorios en su arquitectura. La base de datos de NCBI describe en Mrp1 y en Mrp2 un dominio de función desconocida “DUF3330” en su región carboxilo terminal, entre los residuos 261 y 329 (o 333), no descrita en otros componentes representativos de esta sub clase de fosfodiesterasas, como las fosfodiesterasas ToxR de *P. aeruginosa* y BvgR de *Bordetella pertussis* (Anexo 11).

Se determinó la funcionalidad de la proteína codificada por el gen *urf2.2* como fosfodiesterasa en base a los ensayos de complementación heteróloga en *P. aeruginosa* PAO1 Δ *rocR* que mostraron la capacidad de restituir la adherencia a superficies y los niveles de c-di-GMP a valores equivalentes a la cepa silvestre. Sin embargo, llama la atención en este punto la

discrepancia a lo descrito para la cepa PAO1 $\Delta rocR$ en la literatura, donde se le asocia una capacidad de formación de biopelículas equivalente a la silvestre (Kulasekara y cols., 2005). En contraste a los antecedentes obtenidos en cultivos estáticos, los resultados de adherencia aquí presentados corresponden a datos obtenidos en condiciones de agitación (150 rpm), que constituyen fuerzas de arrastre (“shear forces”), que al oponerse a la adherencia a superficies, promueven la compactación y menor viscosidad de la matriz exopolimérica (Goeres y cols., 2005), cuyo resultado es la conformación de biopelículas más resistentes a la erosión (Koechler y cols., 2015). En este contexto, estos resultados respaldan la definición de las biopelículas como arquitecturas, cuya estructuración responde a las condiciones particulares en que estas se formen (Harrison y cols., 2005; Yadav y cols., 2013). Otro factor que explica el fenotipo de adherencia de PAO1 $\Delta rocR$ pJBTc19, es la etapa de la formación de la biopelícula a la cual la biomasa adherida fue cuantificada, que según los datos publicados corresponde a 20 h de incubación. Esto correspondería a una etapa muy posterior a los datos de adherencia a las 6 h de nuestro trabajo, que involucran procesos de estructuración y división celular, procesos no abordados por las condiciones experimentales desarrolladas en este estudio. El papel de RocR en la formación de la biopelículas es sustentado por su rol inhibitorio sobre la expresión de las adhesinas “CupB/C”, componentes determinantes en etapas tempranas de adhesión (Vallet y cols., 2001).

De esta manera, los efectos de la complementación en *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$ con el constructo pJBTc19:*urf2.2* sustentaron el la denominación de la proteína codificada por el gen *urf2* (“unknown related function 2”) como Mrp por “metal regulated phosphodiesterase”.

Pese a que los resultados obtenidos de la complementación de la mutante de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta rocR$ apoyan a Mrp como una fosfodiesterasa catalíticamente funcional, no se encontró efecto fenotípicos significativos asociados a su sobreexpresión en su contexto nativo. La cepa CH34

pjBTc19:*urf2.2* no exhibió alteraciones en la presencia de EPS en macrobiopelículas, en la formación de biopelículas, como tampoco en sus niveles celulares c-di-GMP en condiciones control. Pese a ello, se encontró algunas diferencias. Una fue el incremento de la disminución en c-di-GMP tras la exposición a cadmio, incrementada también en las biopelículas de la cepa CH34 pjBTc19:*urf2.2* respecto a la cepa CH34 pjBTc19. La ausencia de análisis fenotípicos bajo el modelo de exposición a cadmio (Figura 4), no permitió establecer de forma concluyente el rol de esta proteína en esta condición.

En vista de los antecedentes que describen distintas fases temporales en la respuesta a metales pesados (Monchy y cols., 2007; Monsieur y cols., 2011), cabe la posibilidad de la contribución de Mrp en la resistencia a cadmio en etapas tempranas de la exposición, que no estaría siendo detectada dado el tiempo de exposición de 20 h utilizado para obtener los parámetros de susceptibilidad. En este sentido, será establecer criterios de viabilidad en el mismo modelo experimental donde fue descrito el aumento del transcrito *urf2* y la disminución en los niveles de c-di-GMP (Figura 4).

Los resultados de transcriptómica obtenidos en este estudio dieron cuenta de la inducción de los operones *mer* Tn4380 y Tn4378 en presencia de cadmio. Estos resultados se correlacionan con antecedentes que describen una superposición de respuestas a metales pesados, bajo el concepto de “respuesta múltiple”, respuesta transiente de resistencia multimetálica, a la que suceden respuestas más específicas tras tiempos más prolongados de exposición (Nies y cols., 2006; Monchy y cols., 2007). Si bien el incremento de un transcrito, no es sinónimo de su contribución a una respuesta adaptativa, existen antecedentes que describen un aumento de 1,6 veces en la MIC a cadmio de *C. metallidurans* CH34 producto de la sobreexpresión de maquinaria de resistencia a mercurio, en la cepa transconjugante *C. metallidurans* MSR33 (Rojas y cols., 2011a), portadora de un plasmidio ambiental que contiene el operón de resistencia a mercurio Tn50580 (Rojas 2011b). Estos antecedentes apoyan la efectiva contribución del operón *mer*, en la resistencia a cadmio, que

podría ser ejercida mediante el secuestro del cadmio en el citoplasma por los distintos grupos sulfhidrilos descritos en las proteínas que componen esta maquinaria (Boyd y cols., 2012).

Las respuestas transcriptómicas descritas dan cuenta de una respuesta de mayor magnitud del operón *mer* en biopelículas que en células plantónicas sometidas al mismo tratamiento. Una posible explicación para este resultado, serían las diferencias en la relación de átomos de cadmio por célula, a la que fueron expuestos ambos estilos de vida. Si bien ambos cultivos comenzaron con el mismo número bacterias, su cantidad al tiempo final al que fueron expuestas no fue determinada. Pese a ello, la respuesta de magnitud equivalente en el caso del gen *cadA*, descarta este argumento (Figura 21C). Sería posible postular entonces, una mayor actividad del factor transcripcional MerR en biopelículas que en sus contrapartes plantónicas en presencia de cadmio.

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

1. Cadmio ejerce un efecto inhibitor del estilo de vida formador de biopelículas en *C. metallidurans* CH34 mediada por la disminución en los niveles de c-di-GMP.
2. La exposición a cadmio aumentó significativamente la transcripción de los genes en los operones *mer* Tn4378 y Tn4380 de *C. metallidurans* CH34 incluyendo los transcritos del gen *merA*, y del gen *urf2.2*.
3. La complementación heteróloga de *P. aeruginosa* PAO1 Δ *rocR* con la construcción pJBTC19:*urf2.2* indicó que el gen *urf2.2* de *C. metallidurans* CH34 codifica una fosfodiesterasa tipo EAL, la cual denominamos Mrp (Metal response phosphodiesterase).
4. La expresión heteróloga de una diguanilato ciclasa constitutivamente activa en *C. metallidurans* CH34 incrementó de forma sostenida los niveles de c-di-GMP en presencia de cadmio y la susceptibilidad a este metal pesado.
5. Para establecer la existencia de una respuesta de degradación de c-di-GMP en presencia de cadmio en esta bacteria, es necesario realizar ensayos de actividad fosfodiesterasa en células expuestas a este metal pesado.
6. La realización de ensayos de susceptibilidad a cadmio en cepas de *C. metallidurans* CH34 Δ *urf2.1* Δ *urf2.2* permitirán dilucidar el efectivo rol de la fosfodiesterasa Mrp en esta respuesta.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nies, D. H. The biological chemistry of the transition metal ‘transportome’ of *Cupriavidus metallidurans*. *Metallomics* **8**, 481–507 (2016).
2. Wu, X., Santos, R. R. & Fink-Gremmels, J. Cadmium Modulates Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12**, 2878–2894 (2015).
3. Nies, D. H. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 730–50 (1999).
4. Begg, S. L. *et al.* Dysregulation of transition metal ion homeostasis is the molecular basis for cadmium toxicity in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
5. Harrison, J. J., Ceri, H. & Turner, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 928–38 (2007).
6. Vallee, B. L. & Ulmer, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu. Rev. Biochem.* **41**, 91–128 (1972).
7. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. *WHO food Addit. Ser.* 692 p (2007).
8. Butterman W.C, Plachy, R. Geological Survey Mineral Commodity Profiles Cadmium. *USAGOV* (2000).
9. Vivanco, E. *Pasivos ambientales mineros en Chile*. (2012).
10. COCHILCO. *Anuario de estadísticas del cobre y otros metales 1997-2016*. (2016).
11. Malik, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* **30**, 261–278 (2004).
12. Mosa, K. A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M. & Dhankher, O. P. Potential Biotechnological Strategies for the Cleanup of Heavy Metals and Metalloids. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–14 (2016).
13. Dixit, R. , Wasiullah, M., Deepti, P., Kuppusamy, S., Udai, B., Sahu, A., Shukla, R., Singh, B. P., Rai, J. P., Sharma, P. K., Lade, H. Paul, D. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability.* **7**, 2189–2212 (2015).
14. Mergeay, M., Nies, D., Schlegel, H. G., Gerits, J., Charles, P., Van Gijsegem, F. *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.* **162**, 328–34 (1985).
15. Janssen, P. J., van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M. A., Leys, N.,Vallaey, T. Lapidus, A. Monchy, S., Médigue, C., Taghavi, S., Mccorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D. Mergeay, M. The complete genome sequence of *Cupriavidus metallidurans* strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments. *PLoS One* **5**, (2010).
16. Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J. Lelie, D., Wattiez, R. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of

- metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 385–410 (2003).
17. Diels, L., Van Roy, S., Taghavi, S. & Van Houdt, R. From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**, 247–58 (2009).
 18. Boyd, E. S. & Barkay, T. The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Front. Microbiol.* **3**, 349 (2012).
 19. Monsieurs, P., Moors, H., Van Houdt, R., Janssen, P. J., Coninx, I., Mergeay, M. & Leys, N. Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals* **24**, 1133–51 (2011).
 20. Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V. & Fernández, L. a. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat. Biotechnol.* **18**, 661–5 (2000).
 21. Rojas, L. A^a, Yáñez, C., González, M., Lobos, S., Smalla, K., Seeger, M. Characterization of the metabolically modified heavy metal-resistant *Cupriavidus metallidurans* strain MSR33 generated for mercury bioremediation. *PLoS One* **6**, (2011).
 22. Biondo, R., da Silva, F. A., Vicente, E. J., Souza Sarkis, J. E. & Schenberg, A. C. G. Synthetic phytochelatin surface display in *Cupriavidus metallidurans* CH34 for enhanced metals bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 8325–32 (2012).
 23. Halan, B., Buehler, K. & Schmid, A. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends Biotechnol.* **30**, 453–65 (2012).
 24. Singh, R., Paul, D. & Jain, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* **14**, 389–97 (2006).
 25. Edwards, S. J. & Kjellerup, B. V. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9909–21 (2013).
 26. Mangwani, N., Kumari, S. & Das, S. Bacterial biofilms and quorum sensing: fidelity in bioremediation technology. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **32**, 43–73 (2017).
 27. Pal, A. & Paul, K. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J. Microbiol.* **48**, 49–64 (2008).
 28. Reith, F., Etschmann, B., Grosse, C., Moors, H., Benotmane, M., Monsieurs, P., Grass, G., Doonan, C., Vogt, S.,
 29. Lai, B., Martinez-Criado, G., George, G.N., Nies, D., Mergeay, M., Pring, A. Southam, G., Brugger, J. Mechanisms of gold biomineralization in the bacterium *Cupriavidus metallidurans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

- A. **106**, 17757–62 (2009).
30. Fairbrother, L. Etschmann, B., Brugger, J., Shapter, J., Southam, G., Reith, F.. Biomineralization of gold in biofilms of *Cupriavidus metallidurans*. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 2628–35 (2013).
 31. Teitzel, G. M. & Parsek, M. R. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **69**, 2313–2320 (2003).
 32. Priester, J. H., Olson, S. G., Webb, S. M., Mary, P., Hersman, L. E., Holden, P. A., Neu, M. P. Enhanced Exopolymer Production and Chromium Stabilization in *Pseudomonas putida* Unsaturated Biofilms. (2006).
 33. Sarkar, S. & Chakraborty, R. Quorum sensing in metal tolerance of *Acinetobacter junii* BB1A is associated with biofilm production. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**, 160–5 (2008).
 34. Yadav, K. K., Mandal, A. K. & Chakraborty, R. Copper susceptibility in *Acinetobacter junii* BB1A is related to the production of extracellular polymeric substances. *Antonie Van Leeuwenhoek* **104**, 261–9 (2013).
 35. Perrin, C., Romain B Jublein. G. Lejeune, Mandrand-Berthelot Philippe , Rodriguez A. Mandrad M.A., D. C. Nickel promotes biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 strains that produce curli. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 1723–33 (2009).
 36. Cologgi, D. L., Speers, A. M., Bullard, B. A, Kelly, S. D. & Reguera, G. Enhanced uranium immobilization and reduction by *Geobacter sulfurreducens* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 6638–46 (2014).
 37. Navarrete, F. & De La Fuente, L. Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1097–107 (2014).
 38. Chua, S. L., Sivakumar, K., Rybtke, M., Yuan, M., Andersen, J., Nielsen, T. E., Givskov, M. Tolker-Nielsen, T. Cao, B., Kjelleberg, S., Yang, L. C-di-GMP regulates *Pseudomonas aeruginosa* stress response to tellurite during both planktonic and biofilm modes of growth. *Sci. Rep.* **5**, 1–13 (2015).
 39. Cusick, K. D., Dale, J. R., Fitzgerald, L. A., Little, B. J. & Biffinger, J. C. Adaptation to copper stress influences biofilm formation in *Alteromonas macleodii*. *Biofouling* **33**, 505–519 (2017).
 40. Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S.-H., Hassett, D. J. & Sauer, K. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 7335–43 (2006).
 41. Roy, A. B., Petrova, O. E. & Sauer, K. The phosphodiesterase DipA (PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion. *J. Bacteriol.* **194**, 2904–15 (2012).
 42. Shamim, S., Rehman, A. & Qazi, M. H. Swimming, swarming, twitching, and chemotactic responses of *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2 in the presence of cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **66**, 407–14 (2014).

43. Thornhill, S. G., Kumar, M., Vega, L. M. & McLean, R. J. C. Cadmium ion inhibition of quorum signalling in chromobacterium violaceum. *Microbiol. (United Kingdom)* **163**, 1429–1435 (2017).
44. Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, C., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Meyer, R., Benziman, M. An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Lett.* **186**, 191–196 (1985).
45. Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, H., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Benziman, M. Control of cellulose synthesis *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase. *Carbohydr. Res.* **149**, 101–117 (1986).
46. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Benziman, M. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**, 279–281 (1987).
47. Amikam, D. & Benziman, M. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **171**, 6649–6655 (1989).
48. 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., Benziman, M. 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**, 4416–4425 (1998).
49. Galperin, M. Y., Nikolskaya, A. N. & Koonin, E. V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**, 11–21 (2001).
50. Romling, U. Galperin, M. Y., Gomelsky, M. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial Second Messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 1–52 (2013).
51. Simm, R., Lusch, A., Kader, A., Andersson, M. & Römling, U. Role of EAL-containing proteins in multicellular behavior of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* **189**, 3613–3623 (2007).
52. Tischler, A. D. & Camilli, A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **53**, 857–869 (2004).
53. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., Jenal, U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes Dev.* **18**, 715–27 (2004).
54. Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M. & Römling, U. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in *rdar* morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol. Microbiol.* **60**, 602–616 (2006).
55. Merritt, J. H., Brothers, K. M., Kuchma, S. L. & O’Toole, G. A. SadC reciprocally influences biofilm formation

- and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *J. Bacteriol.* **189**, 8154–64 (2007).
56. Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehliis, A., Hengge, R. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **22**, 2434–2446 (2008).
 57. Newell, P. D., Yoshioka, S., Hvorecny, K. L., Monds, R. D. & O'Toole, G. A. Systematic analysis of diguanylate cyclases that promote biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *J. Bacteriol.* **193**, 4685–98 (2011).
 58. Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., Lindberg, M. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **204**, 163–167 (2001).
 59. Ryjenkov, D. A., Tarutina, M., Moskvin, O. V. & Gomelsky, M. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: Insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* **187**, 1792–1798 (2005).
 60. Hecht, G. B. & Newton, A. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **177**, 6223–9 (1995).
 61. Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U., Schirmer, T. Structure of BeF3 modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure* **15**, 915–27 (2007).
 62. De, N., Pirruccello, M., Krasteva, P., Violinova, Bae, N., Raghavan, R. V., Sondermann, H. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR. *PLoS Biol.* **6**, 0601–0617 (2008).
 63. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., Jenal, U. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes & development.* **18**, 715–727 (2004)
 64. De, N., Navarro, M. V. a S., Raghavan, R. V & Sondermann, H. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J. Mol. Biol.* **393**, 619–33 (2009).
 65. Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., Meuwly, M., Jenal, U. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol. Chem.* **281**, 32015–32024 (2006).
 66. Tchigvintsev, A., Xu, X., Singer, A., Chang, C., Brown, G., Proudfoot, M., Cui, H., Flick, R., Anderson, W. F., Joachimiak, A., Galperin, M. Y., Savchenko, A. Yakunin, A., F. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J. Mol. Biol.* **402**, 524–538 (2010).

67. Chang, A. L. Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., Gilles-Gonzalez, M. A. Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry* **40**, 3420–3426 (2001).
68. Schmidt, A. J., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. *J. Bacteriol.* **187**, 4774–4781 (2005).
69. Bobrov, A. G., Kirillina, O. & Perry, R. D. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 123–130 (2005).
70. 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. Benziman, M. Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: Genetic organization and occurrence of conserved. *J. Bacteriol.* **180**, 4416–4425 (1998).
71. Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. & Liang, Z. X. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**, 3622–3631 (2008).
72. Barends, T. R. M. *et al.* Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**, 1015–1018 (2009).
73. Andrew L. Lovering, Michael J. Capeness, Carey Lambert, Laura Hobley, and Sockett R. E. The Structure of an Unconventional HD-GYP Protein from *Bdellovibrio* Reveals the Roles of Conserved Residues in this Class of Cyclic-di-GMP Phosphodiesterases. *MBio* **2**, 1–8 (2011).
74. Crossman, L. C., Spiro, S., He, Y. W., Zhang, L.H., Heeb, S. Cámara, M., Williams, P., Maxwell, J., Ryan, R. P.,
75. Fouhy, Y., Lucey, J. F. Retraction for Ryan et al., Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E7031–E7031 (2017).
76. Cohen, D., Mechold, U., Nevenzal, H., Yarmiyhu, Y., Randall, T. E. Bay, D., C. Rich, J. D. Parsek, M. R. Kaever, V., Harrison, J. J., Banin, E.. Oligoribonuclease is a central feature of cyclic diguanylate signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 11359–11364 (2015).
77. Kumar, M. & Chatterji, D. Cyclic di-GMP: A second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **154**, 2942–2955 (2008).
78. Gomelsky, M., Wolfe, A. & Visick, K. in *The Second Messenger Cyclic Di-GMP Messenger Cyclic Di-GMP ...*

- (2009).
79. Orr, M. W., Galperin, M. Y. & Lee, V. T. Sustained sensing as an emerging principle in second messenger signaling systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **34**, 119–126 (2016).
 80. Beyhan, S. & Yildiz, F. H. Cyclic Di-GMP Signaling in *Vibrio cholerae*. *Second Messenger Cycl. Di-GMP* 266–282 (2010).
 81. Lee, V. T., Matewish, J.M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. & Lory, S. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**, 1474–1484 (2007).
 82. Jain, R., Sliusarenko, O. & Kazmierczak, B. I. Interaction of the cyclic-di-GMP binding protein FimX and the Type 4 pilus assembly ATPase promotes pilus assembly. *PLoS Pathog.* **13**, 1–23 (2017).
 83. Amikam, D. & Galperin, M. Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**, 3–6 (2006).
 84. Ko, J., Ryu, Kyoung, S., Kim, H., Shin, J. S., Lee, J. O., Cheong, C., Choi, B.. Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by pilz domain proteins. *J. Mol. Biol.* **398**, 97–110 (2010).
 85. Habazettl, J., Allan, M. G., Jenal, U. & Grzesiek, S. Solution structure of the PilZ domain protein PA4608 complex with cyclic di-GMP identifies charge clustering as molecular readout. *J. Biol. Chem.* **286**, 14304–14314 (2011).
 86. Overmars, L., Kerkhoven, R., Siezen, Roland, J. & Francke C. MGcV: the microbial genomic context viewer for comparative genome analysis. *BMC Genom.* **14**, 209 (2013).
 87. Jenal, U., Reinders, A. & Lori, C. Cyclic di-GMP: Second messenger extraordinaire. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 271–284 (2017).
 88. Tatusov, R. L. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**, 33–36 (2000).
 89. Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. & Römling, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessibility to motility. *Mol. Microbiol.* **53**, 1123–1134 (2004).
 90. Hengge, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 263–273 (2009).
 91. Dahlstrom, K. M. & O’Toole, G. A. A Symphony of Cyclases: Specificity in Diguanylate Cyclase Signaling. *Annu. Rev. Microbiol.* **71**, annurev-micro-090816-093325 (2017).
 92. Andrade, M. O. Alegria, M. C., Guzzo, C. R., Docena, C., Pareda Rosa, M. C., Ramos, C. H., Farah, C. The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv citri. *Mol. Microbiol.* **62**, 537–

- 551 (2006).
93. Bobrov, A.G., Kirillina, O., Perry, R. D. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **247**, 123-130 (2005).
 94. Oglesby, L. L., Jain, S. & Ohman, D. E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology* **154**, 1605–1615 (2008).
 95. Tuckerman, J. R., Gonzalez, G. & Gilles-Gonzalez, M. A. Cyclic di-GMP activation of polynucleotide phosphorylase signal-dependent RNA processing. *J. Mol. Biol.* **407**, 633–639 (2011).
 96. Sarenko Olga, Klauck Gisela, M. W. F. & Pfiffer Vanessa, Richter Anja M., Herbst Susanne, Volkhard Kaever, Hengge, R. More than Enzymes That Make or Break Cyclic Di-GMP—Local Signaling in the Interactome of GGDEF/EAL Domain Proteins of *Escherichia coli*. *MBio* **8**, 1–18 (2017).
 97. Hisert, K. B., MacCoss, M., Shiloh, M., U., Darwin, K. H., Singh, S., Jones, R., Ehrh, S., Zhang, Z. Gaffney, B. L., Gandotra, S. Holden, D.W., Murray, D. Nathan, C. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP. *Mol. Microbiol.* **56**, 1234–45 (2005).
 98. Kulasekara, H. D., Ventre, I. Kulasekara, B. R., Lazdunski, A., Filloux, A., Lory, S. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol. Microbiol.* **55**, 368–380 (2005).
 99. Hengge, R., Grundling, A., Jenal, U., Ryan, R. & Yildiz, F. Bacterial Signal Transduction by Cyclic Di-GMP and Other Nucleotide Second Messengers. *J. Bacteriol.* **198**, 15–26 (2016).
 100. Galperin, M. Y. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ. Microbiol.* **6**, 552–567 (2004).
 101. Tarnawski, M., Barends, T. R. M., Hartmann, E. & Schlichting, I. Structures of the catalytic EAL domain of the *Escherichia coli* direct oxygen sensor. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1045–1053 (2013).
 102. Henry, J. T. & Crosson, S. Ligand-binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 261–86 (2011).
 103. Tarutina, M., Ryjenkov, D. A. & Gomelsky, M. An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodospirillum rubrum* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J. Biol. Chem.* **281**, 34751–34758 (2006).
 104. Zähringer, F., Lacanna, E., Jenal, U., Schirmer, T., Boehm, A. Structure and Signaling Mechanism of a Zinc-Sensory Diguanylate Cyclase. *Structure* **21**, 1-9 (2013).
 105. Karatan, E. & Watnick, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 310–47 (2009).

106. Chekabab, S. M., Harel, J. & Dozois, C. M. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence* **5**, 786–793 (2014).
107. Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Mac Coss, M. J. Zhang, Z., Jones, R. A. Miller, S. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, 1171–1175 (2005).
108. Malone, J. G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A. J., Rainey, P. B. The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology* **153**, 980–994 (2007).
109. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
110. Thompson, J. D, Higgins, D. G., Gibson, T J. Clustal-W-Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
111. Lee, V. T., Matewish, J. M., Kessler, J. L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**, 1474-1484 (2007).
112. Whitney, J. C. Colvin, K. M., Marmont, L. S. Robinson, H., Parsek, M. R. Howell, Lynne, P.. Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **287**, 23582–93 (2012).
113. Benach, J., Swaminathan, S. S., Tamayo, R., Handelman, S. K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J. E., Forouhar, F., Neely, H., Seetharaman, J., Camilli, A. Hunt, J. F. The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J.* **26**, 5153–5166 (2007).
114. Amikam, D., Galperin, M. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**, 3-6 (2006).
115. Fazli, M., O'Connell, A., Nilsson, M., Niehaus, K. Dow, J. M., Givskov, M. Ryan, R., Tolker-Nielsen, T.. The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia*. *Mol. Microbiol.* **82**, 327–41 (2011).
116. Brenner, S. E., Chothia, C. & Hubbard, T. J. P. Assessing sequence comparison methods with reliable structurally identified distant evolutionary relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 6073–6078 (1998).
117. Pearson, W. R. in *Current Protocols in Bioinformatics* Suppl. 42 (2013).
118. Geer, L. Y., Domrachev, M., Lipman, D. J. & Bryant, S. H. CDART: Protein Homology by Domain Architecture CDART: Protein Homology by Domain Architecture. *Genome Res.* **12**, 1619–1623 (2002).

119. Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. The rate of processing and degradation of antisense RNAI regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell* **65**, 1233–1242 (1991).
120. Bernstein, J. A., Khodursky, A. B., Lin, P.-H., Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 9697–9702 (2002).
121. Lin, P., Singh, D., Bernstein, J. A. & Lin-Chao, S. *Chapter 3 Genomic Analysis of mRNA Decay in E. coli with DNA Microarrays. Methods in Enzymology* **447**, (Elsevier Inc., 2008).
122. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19.
123. Blatny, J. M., Brautaset, T., Haugan, K., Brautaset, T. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 370-379.
124. Pérez-Mendoza, D., Aragón, I. M., Prada-Ramírez, H. A., Romero-Jiménez, L., Ramos, C., Gallegos, M. Trinidad, Sanjuán, J. Responses to elevated c-di-GMP levels in mutualistic and pathogenic plant-interacting bacteria. *PLoS One* **9**, e91645 (2014).
125. Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R. Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *PNAS* **107**, 2230-2234.
126. Stephanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Irkovic, I., Ruzicka, F. Quantification of Biofilm in Microtiter Plates: Overview of Testing Conditions and Practical Recommendations for Assessment of Biofilm Production by Staphylococci. *APMIS* **115** 891-899 (2007)
127. O’Toole, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 10–11 (2011).
128. Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R. & Morck, D. The Calgary Biofilm Device : New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 1771–1776 (1999).
129. Harrison, J. J. Stremick, C., Turner, R. J., Allan, N. D., Olson, M., Ceri, H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat. Protoc.* **5**, 1236–54 (2010).
130. Bryce, C. C., Le Bihan, T., Martin, S. F., Harrison, J. P., Bush, T., Spears, B., Moore, A., Leys, N., Byloos, B. Rock geochemistry induces stress and starvation responses in the bacterial proteome. *Environ. Microbiol* (2015).
131. Monchy, S. S., Benotmane, M. A., Janssen, P., Vallaeys, T., Taghavi, S., Van der Lelie, D. and Mergeay, M.

- Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J. Bacteriol.* **189**, 7417–25 (2007).
132. Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T. & Howell, P. L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* **2**, 167 (2011).
133. Guzzo, C. R., Salinas, R. K., Andrade, M. O. & Farah, C. S. PILZ Protein Structure and Interactions with PILB and the FIMX EAL Domain: Implications for Control of Type IV Pilus Biogenesis. *J. Mol. Biol.* **393**, 848–866 (2009).
134. Biemans-Oldehinkel, E., Mahmood, N. A. B. N. & Poolman, B. A sensor for intracellular ionic strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10624–10629 (2006).
135. Tajima, H. , Imada, K., Sakuma, M., Hattori, F., Nara, T., Kamo, N., Homma, M. & Kawagishi, I. Ligand specificity determined by differentially arranged common ligand-binding residues in bacterial amino acid chemoreceptors Tsr and Tar. *J. Biol. Chem.* **286**, 42200–42210 (2011).
136. Willett, J. W. & Kirby, J. R. Genetic and Biochemical Dissection of a HisKA Domain Identifies Residues Required Exclusively for Kinase and Phosphatase Activities. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
137. Ho, Y.-S. J. Structure of the GAF domain, a ubiquitous signaling motif and a new class of cyclic GMP receptor. *EMBO J.* **19**, 5288–5299 (2000).
138. Heikaus, C. C., Pandit, J. & Klevit, R. E. Cyclic Nucleotide Binding GAF Domains from Phosphodiesterases: Structural and Mechanistic Insights. *Structure* **17**, 1551–1557 (2009).
139. Ku, X., Shanshan, L., Wen, Y., Kan, L., Yuwei, B., Yueyang, X., Jin, J., Yingying, W. Structural and biochemical analysis of tyrosine phosphatase related to biofilm formation A (TpbA) from the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PLoS One* **10**, 1–16 (2015).
140. Liang, Z.X. The expanding roles of c-di-GMP in the biosynthesis of exopolysaccharides and secondary metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **32**, 663-683 (2015).
141. Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., Hengge, R. Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology* **155**, 1318–31 (2009).
142. Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K. Frankenberg-Dinkel, N. NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J. Bacteriol.* **195**, 3531-3542.
143. Rao, F., Yang, Y., Qi, Y., Liang, Zhao, X. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**, 3622-3631.
144. Brown, N. L., Misra, T. K., Winnie, J. N., Schmidt, A., Seiff, M., Silver, S. The nucleotide sequence of the

- mercuric resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: further evidence for mer genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. & Gen. Genetics* **202**, 143-151.
145. Liebert, C. A., Hall, R. M., Summers, A. O. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *MMBR* **63**, 507-522.
146. Mouali, Y. E., Kim, H., Ahmad, I., Brauner, A., Liu, Y., Skurnik, M., Galperin, M., Römling, U. Stand-alone EAL domain proteins form a distinct subclass of EAL proteins involved in regulation of cell motility and biofilm formation in enterobacteria. *J. Bacteriol.* **18**, 1-17 (2017).
147. Nikolskaya, A. N., Mulikidjanian, A. Y., Beech, I. B., Galperin, M. MASE1 and MASE2: Two novel integral membrane sensory domains. *J. Mol. Microbiol. & Biotech.* **5**, 11-16 (2003).
148. Morgan, J. L. W., McNamara, J., T. Zimmer, J. Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic di-GMP. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* **5**, 489-496.
149. Kuchma, S. L., Connolly, J. P. & Toole, G. A. O. A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 1441–1454 (2005).
150. Diels, L., Springael, D., van der Lelie, N., Top, E. & Mergeay, M. Use of DNA probes and plasmid capture in a search for new interesting environmental genes. *Sci. Total Environ.* **139–140**, 471–478 (1993).
151. Upadhyay, A. A., Fleetwood, A. D., Adebali, O., Finn, R. D. & Zhulin, I. B. Cache Domains That are Homologous to, but Different from PAS Domains Comprise the Largest Superfamily of Extracellular Sensors in Prokaryotes. *PLoS Comput. Biol.* **12**, 1–21 (2016).
152. Huang, C.J. J., Wang, Z. C. , Huang, H.Y, Huang, H. D & Peng, H.L. YjcC, a c-di-GMP phosphodiesterase protein, regulates the oxidative stress response and virulence of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *PLoS One* **8**, e66740 (2013).
153. Lechauve, C., Bouzahir-Sima, L., Yamashita, T., Marden, M. C., Vos, M. H., Liebl, U. Kiger, L. Heme ligand binding properties and intradimer interactions in the full-length sensor protein Dos from *Escherichia coli* and its isolated heme domain. *J. Biol. Chem.* **284**, 36146–36159 (2009).
154. Matamouros, S., Hager, K. R. & Miller, S. I. HAMP domain rotation and tilting movements associated with signal transduction in the PhoQ sensor kinase. *MBio* **6**, 1–12 (2015).
155. O'Connor, J. R. Kuwada, N. J. Huangyutitham, V. Wiggins, P. A. Harwood, C. S. Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol. Microbiol.* **86**, 720-729.
156. Koechler, S., Farasin, J., Cleiss-Arnold, J. & Ene-Ploetze, A. N. Toxic metal resistance in biofilms: diversity of microbial responses and their evolution. *J. Bacteriol.* **6**, 1–8 (2015).

157. Vega, L. M. Mathieu, J., Yang, Y., Pyle, B., H., McLean, Alvarez, R. J.C., Pedro J.J. Nickel and cadmium ions inhibit quorum sensing and biofilm formation without affecting viability in *Burkholderia multivorans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **91**, 82–87 (2014).
158. Schue, M., Fekete, A., Ortet, P., Brutusco, C., Heulin, T., Schmitt-Kopplin, P., Achouak, W., Santaella, C. Modulation of metabolism and switching to biofilm prevail over exopolysaccharide production in the response of *Rhizobium alamii* to cadmium. *PLoS One* **6**, e26771 (2011).
159. Wu, X., Santos, R. R. & Fink-Gremmels, J. Cadmium Modulates Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Int. J. Env. Res. & Pub. Health* **12**, 2878-2894.
160. Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L. & Tolker-Nielsen, T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: Genetic elements and molecular mechanisms. *Mol. Microbiol.* **75**, 815–826 (2010).
161. Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W. C., Blair, D. F. Harshey, R. M. The c-di-GMP Binding Protein YcgR Controls Flagellar Motor Direction and Speed to Affect Chemotaxis by a "Backstop Brake" Mechanism. *Mol. Cell.* **38**, 128-139.
162. Lacey, M., Partridge, M., Green, J. *Escherichia coli* K-12 YfgF is an anaerobic cyclic di-GMP phosphodiesterase with roles in cell surface remodelling and the oxidative stress response. *Microbiology* **156**, 2873-2886 (2010).
163. Prabhakaran, P., Ashraf, M. A. & Aqma, W. S. Microbial stress response to heavy metals in the environment. *RSC Adv.* **6**, 109862–109877 (2016).
164. Harrison, J. J., Ceri, H., Stremick, C. A. & Turner, R. J. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ. Microbiol.* **6**, 1220–7 (2004).
165. Harrison, J. J., Ceri, H., Roper, N., Badry, E., Sproule, K. M., Turner, R. J. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiology* **151**, 3181–95 (2005).
166. Gugala, N., Lemire, J. A. & Turner, R. J. The efficacy of different anti-microbial metals at preventing the formation of, and eradicating bacterial biofilms of pathogenic indicator strains. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **70**, 775–780 (2017).
167. Desaunay, A. & Martins, J. M. F. F. Comparison of chemical washing and physical cell-disruption approaches to assess the surface adsorption and internalization of cadmium by *Cupriavidus metallidurans* CH34. *J. Hazard. Mater.* **273**, 231–238 (2014)
168. Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E. & Stanley-Wall, N. R. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol. Rev.* 1–21 (2015).

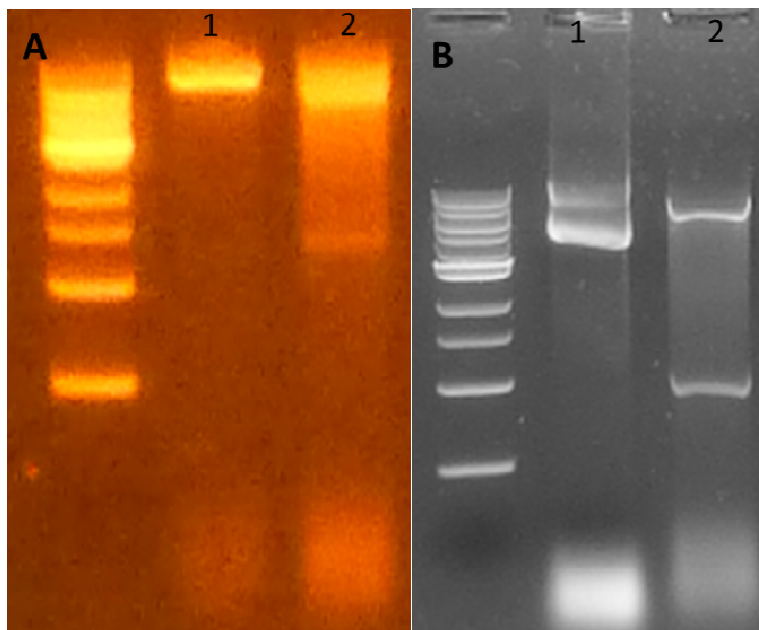
169. Goeres, D. M., Loetterle, L. R., Hamilton, M. A., Murga, R. Kirby, D. W. Donlan, R. M. . Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* **151**, 757–762 (2005).
170. Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A. & Filloux, A. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6911–6 (2001).
171. Rojas Araya, L^b. Estudios de biorremediación bacteriana en microcosmos de suelos contaminados con especies de mercurio (II), cadmio y cobre. (Universidad Técnica Federico Santa María, 2011)

7. ANEXO

Anexo 1. Eficiencias de amplificación en amplicones cuantificados mediante q-RT-PCR

Amplicón	T° ann*	Eficiencia	r²
<i>merA</i>	60	107,327	0,992
<i>cadA</i>	62	83,09	0,992
<i>rpoZ</i>	60	101	0,9995
<i>gyrB</i>	64	83,16	0,998
<i>RMET_RS08460</i>	60	91,3	0,994
<i>RMET_RS09375</i>	60	89,5	0,997
<i>RMET_RS11180</i>	60	107,1	0,992
<i>RMET_RS11270</i>	60	109,1	0,993
<i>RMET_RS11355</i>	60	92,3	0,998
<i>RMET_RS19900</i>	62	104,1	0,995
<i>RMET_RS21415</i>	60	87,2	0,998
<i>RMET_RS29325</i>	60	92,6	0,991
<i>urf2</i>	60	97,0	0,980
<i>RMET_RS05485</i>	60	103,6	0,995
<i>RMET_RS08465</i>	60	103,0	0,999
<i>RMET_RS20720</i>	60	99,7	0,996
<i>RMET_RS25455</i>	60	94,4	0,998
<i>RMET_RS26980</i>	60	91,7	0,996
<i>RMET_RS02985</i>	60	102,4	0,997
<i>RMET_RS11280</i>	60	104,048	0,992
<i>RMET_RS22980</i>	60	111,67	0,986
<i>RMET_RS24295</i>	60	85,7	0,987
<i>RMET_RS28910</i>	62	102,98	0,997
<i>RMET_RS30470</i>	60	111,402	0,992
<i>RMET_RS05745</i>	60	90,348	0,991
<i>RMET_RS08705</i>	60	107,851	0,978
<i>RMET_RS11325</i>	60	98,732	0,999
<i>RMET_RS21490</i>	64	90,2	0,995
<i>RMET_RS29670</i>	60	92,267	0,996
<i>RMET_RS18290</i>	60	87,153	0,997

*: Las temperaturas corresponden a la temperatura de hibridación de cada par de partidores. (n=2)



Anexo 2. Confirmación de la transformación de *C. metallidurans* CH34 con las construcciones pJBtc19:*pleD (A) y pJBtc19:*urf2.2* (B).** Electroforesis del producto de extracción plasmidial a partir de cultivos de colonias de *C. metallidurans* CH34 recuperadas del protocolo de conjugación biparental. 1: Producto sin digerir, 2: Producto de digestión doble *EcoRI/HindIII*.

```

PleD/1-156      DQLTGLNRRYMTGQDLSIVKRRATLGG-----CDPVSALLIDIDFEEKINDFEGHDIQDLEVRERFLRLASN--VRAIDIPCRVGGEEFVVMFMDTA-LADRLRIERIRMHVSGSFFTVAHGRE-----MLNVTISIGVSATAGE-DTP-EALIKRABEVCVOKMASGRN--
WspR/1-159      DGLTGLSNRRHFEDEYLELEWRRAMRD-----QTQLSLMIDVDDEFKTYNDSFGHVEGDEALRKVAATIREAS--SRPDDLPAKYGGEEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS2029851-156 DALTGLPNRAWEFEKRLREACEQARLL-----GHRALCFIDLDRKIVNDTAGHAGDVLRELGLVYLRHH--VRPDDLARLGGDEFALLLKDCS-IDHAEQVCKVINAIRERRFPWEGRV-----YDVGASIGAAIDADAP--PVSELMRSRADVACYAARAAGRNRV
RMET_RS2043651-149 DVLTKLYNKAYYEDELARLGRKGPWP-----VSVIADVNLKGLAVNDQFHGGDGLLRRTEGEVKKKA--VGEQACIARTGGDEFEMVLLPGRD-ERGAATVVEQIEVEVVLLNNQYYPGAR-----LSFSIGSATCMQGGDR--LTDVAVKTADRMRVDKRRAYEAE-
RMET_RS204901-156 DALTGLANRRYFENAAQKAVMHARKQ-----GSALSALDLDLDFKRVNDTYGHAAGDRVQVYRROFEQA--LRSTDLAGARGGEEFTAILFDTA-LGQQVIAERIRAAIQVPTIILESGE-----AITQTVSIIQIAYREDES--DLAAQERADAALISAKAAGRNR-
RMET_RS208460-1155 DMLTGLPNRFLIDERLESQALARARRM-----PQVAVMLFDLDGFKAVNDTLDGVEGDELILICRDEQNA--VRSDTYARLGGDEFVIVELGIDAQDHPMLARSLIRMSARQIIEGHQVFT-----SSEICISVYPTDAITP--GELKKAVAMVHARRNKRDA-
RMET_RS208751-160 DALTGLANRRYFASRFADAYAWCKRD-----AVPVSILMLDIDRKKINDRWGHASGVVVRTLADALRAN--VRNVDLPARLGGEEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS1109051-154 DDLTDVLSRGAFEWELELACKQAERS-----RKPLTVAFMDLDHFKAINDLVYHLAGDSVIRHFAGLRKV--AAPDSVIGRLGGEEFVIVPMATG-LETGRAISVRLSALVRATPCPEPDP-----IAYTVSIGMAEWQLGE--NADAVMRRSDRALVDKQMRGNC-
RMET_RS111801-156 DDLTGLNRRKGFDRRLQEQAMARADSAD-----HGAALLVLDLDFKAVNDSYGVPPGDRLLVAFERLRTC--VRSGDVAVRIGGDEFVILHEHTTIPSIVERIGHAVHVHAALRPFIT-DGQTLV-----STCSVGSIAHQSGQAS--VSELEIRADMALVDKRRHKKAC-
RMET_RS112701-156 DSLTGLNRAAETEAADLAVRTAAARN-----QYAAVLYLSDDFEKINDRVYHAGADAVLAVGQRLRGC--LRGDSVARRLGGDEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS112801-159 DALTGLPNRQQLLSRADDVAVRANAHG-----TFLALEFINLNNKRVNDVQVGAQDRFLVRSRQFATAEHARDATVCRISGDFAVLEFGHG-HAELALADELLRALDPTPIVHAGLSPS-----PSASIGESMLTEQFDRR--ETELHHADLVCOAKKRSQFV-
RMET_RS113551-147 DLTGLANR-----GAVIDRATAALA-----RGLSLALVVIDHFKRINDDFHPVGDVACVGTACEKDDTV-RMEG-VICNMGEEFTALLPDFT-IDAAATLADQMRQAIACHRFPAPVNR-----EVTASEFC--VSWSPQGRPFEEH--AYGRDEALVCAKRCGRN--
RMET_RS161701-157 DALTGLNRRLEARACDLCASPAAD-----KPYVALVMPDIDHFKRINDTYGHVAGDRAEIVGAVCREV--LGTGDLAARLGGEEFVAVSVLST-PGEALRLAEQLKELREIRVLTLESARP-----FGMTVSLGVAIGRRDEVGQDLSALIRQADLMLVAKRGGRN--
RMET_RS178151-165 DPLTGLANRRRSEEQFKKETARRQD-----GTPALMMLDIDHFKRINDVYHAGADAVLAVGQRLRGC--LRGDSVARRLGGDEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS1912035-190 SVSVDLDRTEAEARWLDQSIHARLA-----ETGC AVLIIHADVREDEVEFVRADLLAQDAGALAAQ--LEPHDFLAKLAERDAGVGNPLVHHSRHDLSRVLGSLAEVVAARGLMQIQ-----VNGCIAIYPRDAATS--EGEMQALCVSLSEARESGNOC-
RMET_RS1945030-184 DSMTGLNRCGLLAEIKATMECNAISF-----LRSALYLLDGGFKRINDVYHAGADAVLAVGQRLRGC--LRGDSVARRLGGDEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS19901-158 DALTGLNRRALHGEGLLARATRD-----ESHVVYVIDLDFKRIINDVYHAGADAVLAVGQRLRGC--LRGDSVARRLGGDEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS205451-159 DGLTSESNRRYFDEYLGAEWKRAQRE-----QTQALMLDIDHFKRINDTYGHVAGDRAEIVGAVCREV--LGTGDLAARLGGEEFVAVSVLST-PGEALRLAEQLKELREIRVLTLESARP-----FGMTVSLGVAIGRRDEVGQDLSALIRQADLMLVAKRGGRN--
RMET_RS205801-154 DPLTGVAVRQSELNKLETRHSEATP-----RFSLELVGIDDFRAFNDMHGMEGDAIILQVARRLDA--ARPDVAVRGGDEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS214151-157 DALTGLNRCGLLAEIKATMECNAISF-----LRSALYLLDGGFKRINDVYHAGADAVLAVGQRLRGC--LRGDSVARRLGGDEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS225801-155 DMLTGLPNRFLIDERLESQALARARRM-----PQVAVMLFDLDGFKAVNDTLDGVEGDELILICRDEQNA--VRSDTYARLGGDEFVIVELGIDAQDHPMLARSLIRMSARQIIEGHQVFT-----SSEICISVYPTDAITP--GELKKAVAMVHARRNKRDA-
RMET_RS244901-129 -----HPLAIVVLRDRQFACETIGSRRTLLRAVEKSRVACGV--VMPAVMHWLSPADLGIACLPTATAEMAELOSIALRLLPYSVDGFELFLS-----CSIGTADSPESATER-----NLQQAIFAMQLNRRCGGIA-
RMET_RS258351-162 DHTTACFNRRHLHTLLPQVLERARA--E-----RRWLLMVCDIDHFKRINDVYHAGADAVLAVGQRLRGC--LRGDSVARRLGGDEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS258351-157 DALTGLPNRRYFQRESHAAVTRAYER-----GTEIGLELIDVDLEKQFNIDYGHPRGDECRQVATATTCV--LDGTQFCARLGGEEFVAVLPDST-SEERTIARRMVAAVRGLPIPHHTP-----VQPFVTVISGAVCAVPDAP--RLEPLHRRADSAMVAKRAGRNR-
RMET_RS289001-96 -----PFRIVRRV--VGARGIACRLGGEEFVLLVLPNTS-PGGARLVAEKLRMAVAALKIPIHIAFTE-----GSSLTISIGLSTMTPOQ-GTDCROVIVAADKGLVTAHNGRNO-
RMET_RS289251-154 DPLTGVGNRAYIGKRIEYTSGRKAG-----QPFAVALMDDGFKAVNDTLDGVEGDELILICRDEQNA--VRSDTYARLGGDEFVIVELGIDAQDHPMLARSLIRMSARQIIEGHQVFT-----SSEICISVYPTDAITP--GELKKAVAMVHARRNKRDA-
RMET_RS289101-155 DPLTGLPNRFLIDERLESQALARARRM-----PQVAVMLFDLDGFKAVNDTLDGVEGDELILICRDEQNA--VRSDTYARLGGDEFVIVELGIDAQDHPMLARSLIRMSARQIIEGHQVFT-----SSEICISVYPTDAITP--GELKKAVAMVHARRNKRDA-
RMET_RS289201-155 DALTGLPNRSELEHERCEVLLAEARRR-----GSGVALLDLDHFKHINETLGHVPGDGLRTIADRIKGA--VRPRDVAARMGGDEFVAVLGDRLRDFGEELVAAKILARVSEDLPLAGEHVRVT-----PSLGMIAFFPDGNSL--TDLMKSDAAMVYAKRHGKRAQ-
RMET_RS293251-155 DHTTGLQNRNFAFESQLRDMMLSRAEQ-----QLMALYLDMRFAVNDTLDGVEGDELILICRDEQNA--VRSDTYARLGGDEFVIVELGIDAQDHPMLARSLIRMSARQIIEGHQVFT-----SSEICISVYPTDAITP--GELKKAVAMVHARRNKRDA-
RMET_RS293401-156 DSLTGLPNRRLFDRLGHAIERSANK-----TEFSELEFLNLRKEDVNDTLDGVEGDELILICRDEQNA--VRSDTYARLGGDEFVIVELGIDAQDHPMLARSLIRMSARQIIEGHQVFT-----SSEICISVYPTDAITP--GELKKAVAMVHARRNKRDA-
RMET_RS2967027-113 DPNVNSMHAERDRDLFESDRE-----QHAVLAQVLES--APQAPLDSICLAAADRETTTS--LRSDSVRSSEGRFVILARNSEPDIVAIIARRIAACYEARPTTGGELRER-----ARTGALFFVDAETS--DAVLSAKKAATVSAHP--
RMET_RS133601-155 DPLTGLVNRPEFERRLETAIIRARQ-----GCTHTLMLYLDLDFKAVNDTLDGVEGDELILICRDEQNA--VRSDTYARLGGDEFVIVELGIDAQDHPMLARSLIRMSARQIIEGHQVFT-----SSEICISVYPTDAITP--GELKKAVAMVHARRNKRDA-
RMET_RS242951-114 DLIRATTVEYRMEAAARYANPLTFPLPGNILLNQHVDRLLIAGSAFHACVYDLNQEKNFNDRYGVYKGDMLKGAANAIQAQC--DPARDLGHVGGDDLVLYQGDH-----WEVRIIDAIAAR-----

```

Anexo 3. Alineamiento múltiple de 30 dominios GGDEF encontrados por homología en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Los dominios “GGDEF” encontrados fueron identificados en la plataforma de predicción “PROSITE” y luego extraídos para efectuar el alineamiento entre sí. Como referencia se utilizó el dominio GGDEF de la diguanilatociclasa WspR de *P. aeruginosa*. Como control positivo de la estrategia de predicción se incluyó la diguanilatociclasa funcional PleD de *Caulobacter crescentus*. Círculo amarillo: Sitio de inhibición secundario, Círculo rojo: Sitio de inhibición primario, Estrella azul: Sitio Activo.


```

Bcam1349/1-260      1 MLHLHS SYS ANA ILAALPEDS IRTIAPHL ELVRIKAG -MLDRVGEPMRHLHFPTTAMMSVQHLMEDGAMVE 70
RMET_RS18290/1-242 1 MITHRSDLHVNHL LNALPRHEWEALSRHFELVRLRAGELLTDSGQRIVHVYFPTTSVVSLLSLLEDGATVE 71

Bcam1349/1-260     71 VAVVREGV VGLGTLVGGVAASSRVEVRIGGMAYRVPSCVMRAEFERSPQTYRLL LNTCQATMAQISRSAL 141
RMET_RS18290/1-242 72 FAAVGNEGLVGIPVVTGGDTMPSRVEVRSPGFAYRIPARVLRSELGQLPALQRVTLLYVQAVLTQIAQTAA 142

Bcam1349/1-260     142 CNRHHSVSEQLSRWLLLAHDRIDGDEL TVTQQTIANMLGVRREGVTEAAGNLQEAGLIRQRRGRITVLDRD 212
RMET_RS18290/1-242 143 CNRHHS LNKQLCRWLLLAIDRMS TNELVITQQVIANMLGVRREGVTEAAGKLEDLGLIHHSRGHITVLDRD 213

Bcam1349/1-260     213 GLEHHACECYDLIRADYRRLGTRGNTRPATVVRPRMPEGRCGFP AHGA 260
RMET_RS18290/1-242 214 GLEKHSCECYKLVKREYDRLL - - - - - PALA - - - - - DVHA - 242

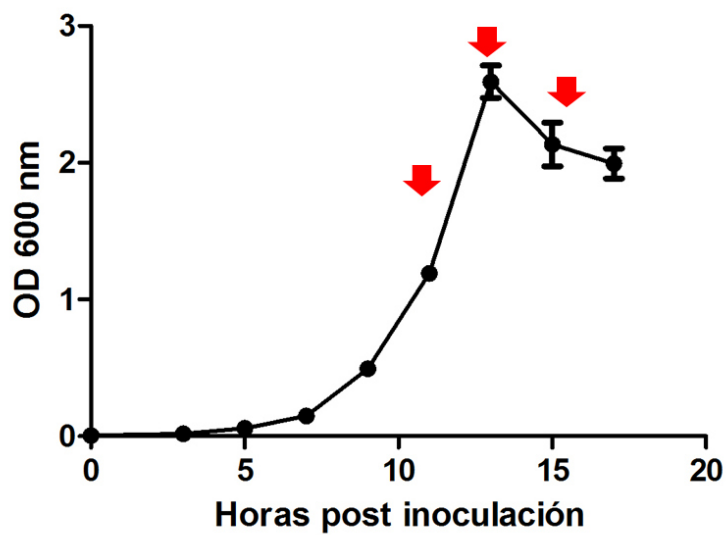
```

Anexo 6. Alineamiento global entre las secuencias aminoacídicas de Bcam1349 (*B. cenocepacia*) y la proteína codificada en *RMET_RS18290* en el genoma de *C. metallidurans* CH34. Secuencias con I = 47,1% y S = 63.2 %.

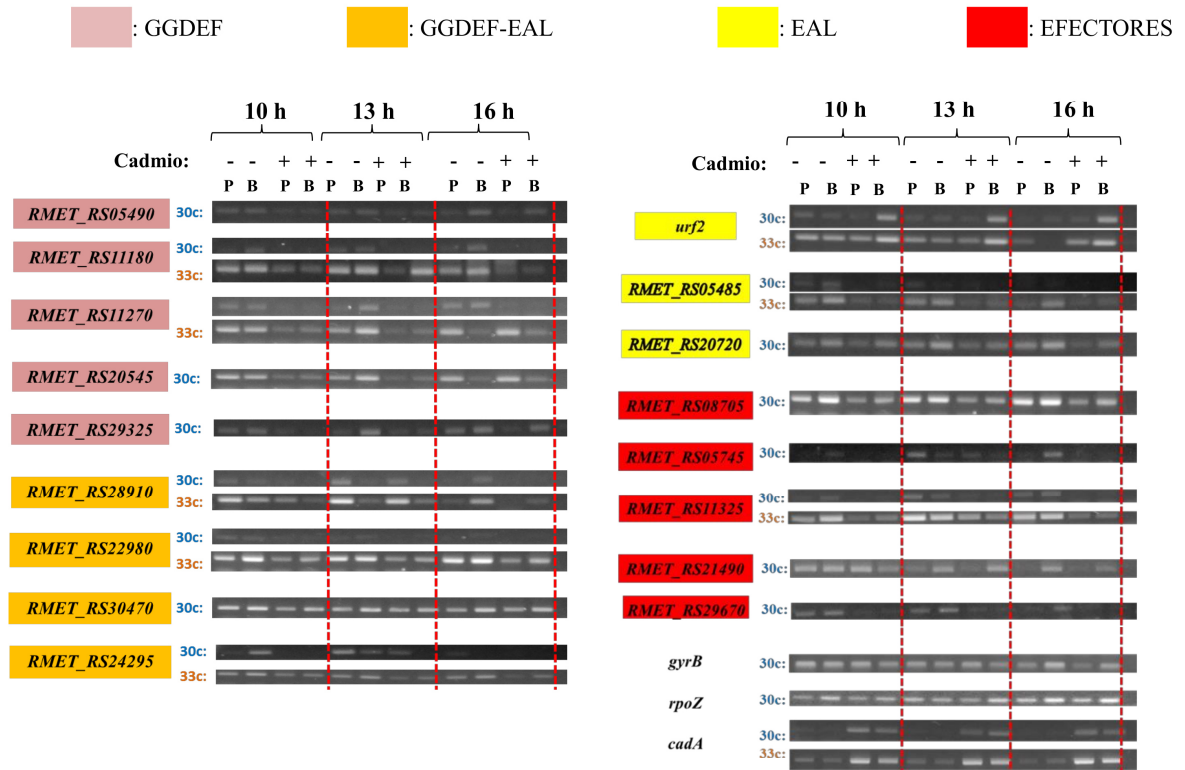
Anexo 7. Conjunto de ORF seleccionados para ensayos semi cuantitativos de transcriptómica mediante RT-PCR

GGDEF (8 de 17)	Criterio ^a
<i>RMET_RS05490</i>	Codireccional a <i>RMET_RS05485</i>
<i>RMET_RS11180</i>	Posee dominio HAMP
<i>RMET_RS11270</i>	<i>tpbB</i>
<i>RMET_RS20545</i>	Codireccional a operon <i>che</i>
<i>RMET_RS29325</i>	Divergente a <i>RMET_RS29320</i>
GGDEF-EAL (4 de 9)	Criterio
<i>RMET_RS28910</i>	Posee dominios CBS
<i>RMET_RS22980</i>	<i>mucR</i>
<i>RMET_RS30470</i>	Dentro de <i>cop-sil-nre-ncc</i>
<i>RMET_RS24295</i>	Posee dominios CBS
PDE (5 de 9)	Criterio
<i>RMET_RS05485</i>	<i>yjcC</i>
<i>RMET_RS20720</i>	<i>rocR</i>
<i>RMET_RS25455</i>	En contexto con <i>fimADC</i>
<i>RMET_RS30310</i>	<i>wrf2.1</i>
<i>RMET_RS31035</i>	<i>wrf2.2</i>
Efectores (6 de 6)	Criterio
<i>RMET_RS08705</i>	PilZ
<i>RMET_RS05745</i>	PilZ
<i>RMET_RS11325</i>	PilZ
<i>RMET_RS21490</i>	<i>pelD</i>
<i>RMET_RS29670</i>	GGDEF & EAL degenerados
<i>RMET_RS18290</i>	<i>bcam1349</i>

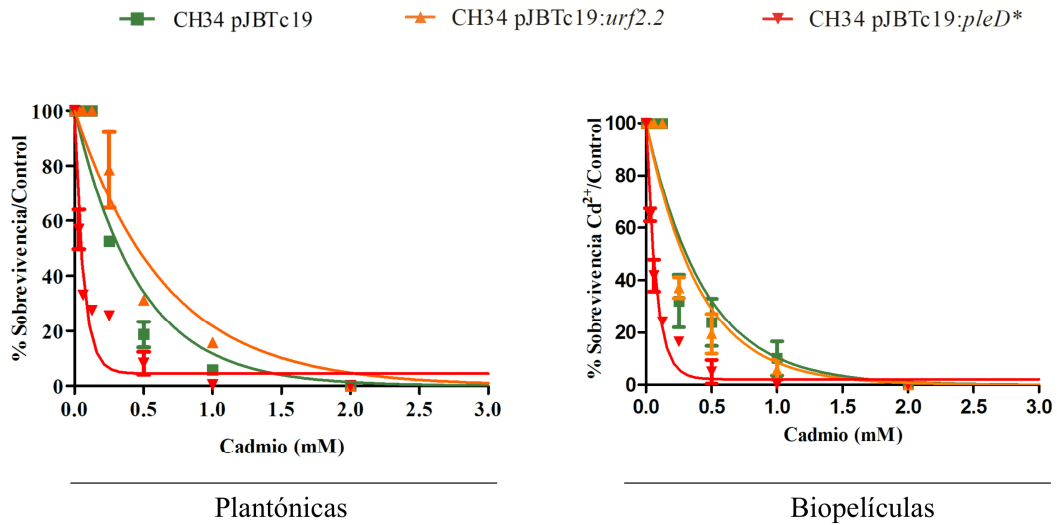
a:ORF homólogos de función conocida fueron representados por su nombre.



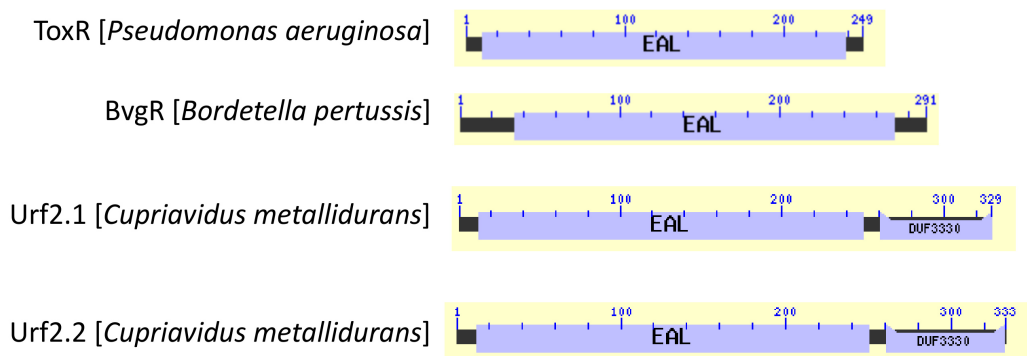
Anexo 8. Cinética de crecimiento de *C. metallidurans* CH34 en medio LPTMS. Los cultivos fueron realizados a partir de una densidad celular inicial de 1×10^7 células /mL. Esta curva fue realizada en cultivos de 10 mL a partir de un inóculo equivalente al utilizado en el cultivo de biopelículas (1×10^8 células totales). Las flechas indican los tiempos de incubación representativos de cada fase de crecimiento, designados para los experimentos de RT-PCR. Incubaciones realizadas a 30°C y 150 rpm.



Anexo 9 Análisis semicuantitativo de 18 transcritos involucrados en la vía del c-di-GMP mediante RT-PCR. Se realizó la amplificación de cada ORF a partir de cDNA sintetizado desde 500 ng de RNA total de cada una de las muestras obtenidas. Como control de expresión referencial se utilizaron los genes *gyrB* y *rpoZ*. Como control positivo del tratamiento se utilizó el gen *cadA*.



Anexo 10. Curvas de viabilidad celular tras 20 horas de exposición a cadmio en células plantónicas y biopelículas de cepas derivadas de *C. metallidurans* CH34. Los porcentajes fueron calculados según a la concentración de unidades formadoras de colonias respecto a la condición control. Cada punto corresponde al promedio de tres réplicas biológicas. Cada curvas representan el producto de regresión no lineal con 1000 iteraciones



Anexo 11. Arquitectura de dominios de proteínas compuestas por dominios “EAL solitarios” según la literatura. Se muestran las arquitecturas descritas por la herramienta de análisis de conservación de arquitecturas CDART.